



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO NUTRACEUTICO DE LOS TANINOS CONDENSADOS
LIBRES DE *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) benth SOBRE LA INFESTACIÓN
PARASITARIA Y RESPUESTA PRODUCTIVA DE BORREGOS
PELIBUEY**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

CÉSAR GARCÍA HERNÁNDEZ

COMITÉ DE TUTORES

DR. ROLANDO ROJO RUBIO

DR. JAVIER ARECE GARCÍA

DR. JOSÉ FERNANDO VÁZQUEZ ARMIJO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, Noviembre de 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**EFFECTO NUTRACEUTICO DE LOS TANINOS CONDENSADOS LIBRES DE
Lysiloma acapulcensis (Kunth) benth SOBRE LA INFESTACIÓN PARASITARIA Y
RESPUESTA PRODUCTIVA DE BORREGOS PELIBUEY**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA:

CÉSAR GARCÍA HERNÁNDEZ

COMITÉ DE TUTORES

DR. ROLANDO ROJO RUBIO

DR. JAVIER ARECE GARCÍA

DR. JOSÉ FERNANDO VÁZQUEZ ARMIJO

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca Estado de México, Noviembre de 2016

RESUMEN

Se usaron tres niveles de taninos condensados libres de *Lysiloma acapulcensis* (TCL: 12.5, 25.0 y 37.5 mg/kg de PV) con el objetivo de evaluar la disminución de excreción de huevos por gramo de heces (HPG), valor del volumen celular aglomerado (VCA), coloración de la mucosa ocular (CMO), ganancia diaria de peso (GDP) y conteo de vermes adultos, en 45 ovinos de pelo de la raza pelibuey infectados artificialmente con una mezcla de nematodos. Los tratamientos fueron los tres niveles de TCL, y como controles se utilizó agua (placebo) e ivermectina (0.22 mg/kg de PV). Los datos se analizaron mediante un análisis de varianza. Las tres dosis de TCL disminuyeron significativamente ($P < 0.05$) la excreción de huevos, presentó los mejores resultados en la dosis alta de TCL (37.5 mg/kg de PV). No se observaron diferencias estadísticas ($P > 0.05$) en el VCA y CMO. Las ganancias de peso vivo fueron mayores con el grupo que recibió la dosis alta de TCL. El conteo de vermes adultos (hembras y machos), en la dosis alta fue similar al tratamiento químico. Se concluye que la mejor dosis fue la de 37.5 mg/kg de PV, en la reducción de excreción de huevos y en el mejoramiento de la ganancia de peso vivo en los ovinos de pelo, por lo cual esta dosis podría ser utilizada en la alimentación de los ovinos como suplemento alimenticio.

Palabras clave: Ovinos de pelo, Nematodos, Taninos, *Lysiloma acapulcensis*, Ivermectina.

SUMMARY

Forty-five Pelibuey sheep were experimentally infected with nematodes to evaluate the effect of three free condensed tannin (FCT) levels of *Lysiloma acapulcensis* on faecal egg counts (FECs), packed cell volumes (PCV), ocular mucosa colours (OMC), average daily gain (ADG), and adult nematode count. Five treatments were used: 12.5, 25.0, and 37.5 mg of FCT kg⁻¹ of body weight (BW); sterile water (control); and ivermectin (0.22 mg kg⁻¹ of BW) as chemical group. The data were processed through repeated measurement analysis. Even though the three FCT doses decreased ($P < 0.05$) the FEC, the highest reduction was obtained with 37.5 mg kg⁻¹ of BW. No differences were observed in PCV and OMC. Higher ADG ($P < 0.05$) was observed with 37.5 mg kg⁻¹ of BW of FCT. The count of adult nematodes (females and males) in the higher dose of FCT was similar to chemical treatment. Dose of 37.5 mg kg⁻¹ of BW decreased the parasite infection and improved the lamb performance. Therefore, this dose could be used as a nutraceutical product in sheep production.

Keywords: Pelibuey Sheep, Tannins, Nematodes, *Lysiloma acapulcensis*, Ivermectin

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

	Página
Cuadro 1.- Reportes de resistencia antihelmíntica en el sureste de México, lugar, antihelmínticos, géneros de nematodos gastrointestinales involucrados, autor y año	23
Figura 1. Representación esquemática del ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes.	15

ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
AQP	Análisis químico proximal
AHs	Antihelmínticos
°C	Centígrado
CFH	Conteo fecal de huevos
D	Densidad
EM	Energía metabolizable
E/S	Excreción- secreción
FDA	Fibra detergente ácido
FDN	Fibra detergente neutro
G	Gramo
H	Hidrogeno
H	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
Iver	Ivermectina
Kg	Kilogramo
kDa	Kilo Dalton
L1	Larva de primer estadio
L2	Larva de segundo estadio
L3	Larva de tercer estadio o infectiva
L4	Larva de cuarto estadio
LA	<i>Lysiloma acapulcensis</i>
LV	Levamisol
Mg	Miligramo
mL	Mililitro
MO	Materia orgánica
MS	Materia seca
NaOH	Hidróxido de sodio
NGI	Nematodos gastrointestinales
OH	Hidroxilos
PBS	Solución básica fosfatada
PC	Proteína cruda
TC	Taninos condensados
TCF	Taninos condensados ligados a la fibra
TCP	Taninos condensados ligados a la proteína
TCT	Taninos condensados totales
TH	Taninos hidrolizables
TL	Tanino libre
S5	Larva de quinto estadio o estado pre- adulto
µL	Micro litro
VCA	Volumen celular aglomerado

CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA	i
RESUMEN	ii
SUMMARY	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS	vi
ABREVIATURAS	vii
I. INTRODUCCIÓN	8
II. REVISIÓN DE LITERATURA	10
2.1. <i>Impacto de las nematodiasis en los rumiantes</i>	10
2.2. <i>Las enfermedades parasitarias y su impacto en la ovinocultura</i>	11
2.3. <i>Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales</i>	12
2.3.1. <i>La fase de vida libre</i>	13
2.3.2. <i>La fase parasitaria</i>	13
2.3.3. <i>Biología de las larvas infectantes</i>	14
2.4. <i>Efectos de los NGI sobre la fisiología digestiva</i>	15
2.4.1. <i>Disminución de la ingestión</i>	15
2.4.2. <i>Mala digestión y mala absorción</i>	16
2.4.3. <i>Modificaciones y reorientaciones del metabolismo</i>	16
2.4.4. <i>Los mecanismos patogénicos</i>	17
2.4.5. <i>Los efectos mecánicos</i>	17
2.4.6. <i>Efectos de los productos de excreción y secreción</i>	18
2.5. <i>El control convencional de los NGI</i>	18
2.6. <i>Resistencia antihelmíntica</i>	19
2.7. <i>Alternativas de control de NGI en ovinos</i>	21
2.7.1. <i>Innovaciones en los sistemas de pastoreo</i>	21
2.7.2. <i>Control biológico</i>	21

2.7.3. <i>Plantas con propiedades antihelmínticas</i>	22
2.7.3.1. <i>Papel de los taninos en las plantas</i>	24
2.7.3.2. <i>Localización de los taninos en los tejidos vegetales</i>	24
2.7.3.3. <i>Efecto de los taninos condensados</i>	25
2.7.3.4. <i>Plantas ricas en taninos condensados (TC)</i>	25
2.7.3.5. <i>Efectos sobre la ingestión voluntaria de alimentos</i> <i>(consumo voluntario)</i>	26
2.7.3.6. <i>Efectos sobre la digestión de los alimentos</i>	26
2.7.3.7. <i>Efectos en la fermentación ruminal</i>	26
2.7.3.8. <i>Efectos post ruminales</i>	26
2.7.3.9. <i>Mejora de las producciones</i>	27
2.7.3.10. <i>Efectos sobre la salud de los animales</i>	28
2.7.3.10.1. <i>Prevención de la meteorización espumosa</i>	28
2.7.3.10.2. <i>Prevención de episodios diarreicos</i>	28
2.8. <i>Efectos de los taninos condensados sobre los parásitos</i> <i>gastrointestinales de los rumiantes</i>	29
2.8.1. <i>Estudios in vitro: evidencias de efectos antihelmínticos</i>	29
2.8.2. <i>Estudios en condiciones de infestación experimental. Efecto</i> <i>sobre larvas infectantes (L₃)</i>	30
2.8.3. <i>Efectos sobre los vermes adultos</i>	31
III. JUSTIFICACIÓN	33
IV. HIPÓTESIS	34
V. OBJETIVOS	35
5.1. <i>General</i>	35
5.2. <i>Específicos</i>	35
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	36
6.1. <i>Zona de estudio</i>	36
6.2. <i>Colecta de material vegetal</i>	36

6.3. <i>Procesamiento de las muestras vegetales</i>	37
6.4. <i>Obtención de las larvas (L3)</i>	37
6.5. <i>Diseño experimental</i>	38
6.6. <i>Fase 1: Efecto del follaje en el establecimiento de las larvas L₃</i>	38
6.7. <i>Fase 2: Magnitud de la infestación parasitaria</i>	38
6.8. <i>Mediciones</i>	39
6.9. <i>Análisis de los resultados</i>	39
VII. RESULTADOS	40
7.1. <i>Artículo científico</i>	41
VIII. DISCUSIÓN GENERAL	48
IX. CONCLUSIÓN GENERAL	49
X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	50

I. INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que aquejan a los pequeños rumiantes en las regiones con clima tropical y subtropical es el efecto de los nematodos gastrointestinales (NGI), situación que se agrava si consideramos las deficiencias nutricionales en los sistemas extensivos. El efecto de los NGI es de primordial importancia, desde el punto de vista biológico, así como económico (Muñiz-Lagunes et al., 2015); los problemas para el control de los NGI se agravan cuando no se manejan adecuadamente los rebaños y se abusa de los desparasitantes químicos, provocando que se desarrolle resistencia a los mismos (Wolstenholme et al., 2004; Arece et al., 2004); a partir de esto surge la necesidad de buscar otras estrategias para controlar los NGI, como es el uso de agentes biológicos como los hongos (Fitz-Aranda et al., 2015) y acaros nematófagos (García-Ortiz et al., 2015) y uso de plantas o extractos con propiedades nematocidas (Olmedo-Juárez et al., 2014; Von son de- Fernex et al., 2015).

En la región sur del Estado de México, que comprende los municipios de Temascaltepec, valle de Bravo, Zacazonapan, Santo Tomás de los Plátanos, Otzoloapan, Luvianos, Tejupilco, Amatepec, Tlatlaya, Sultepec y San Simón de Guerrero, los rebaños de pequeños rumiantes son más comunes y están ganando importancia; sin embargo, debido a los sistemas de producción extensiva, se han elevado también los problemas asociados a los parásitos gastrointestinales (Olmedo-Juárez et al., 2014).

El control de los parásitos en el sur del Estado de México recae sobre métodos de control químico, los cuales se encuentran a libre venta ya que no se requiere la receta por parte de un veterinario ni los estudios de laboratorio que confirmen la presencia de los parásitos en los rebaños, por lo que se han empezado a presentar casos de resistencia a los antihelmínticos químicos (Olmedo-Juárez et al., 2014). Sin embargo existe la alternativa del uso de plantas con principios bioactivos para el control de los NGI. En la región suroccidente del Estado de México se tienen diversas especies forestales y arbustivas que se pueden utilizar para complementar la dieta de los pequeños rumiantes y aprovechar el contenido de los metabolitos secundarios para el control de los NGI, entre las especies que se pueden encontrar en el esta región se pueden mencionar la *Leucaena leucocephala*, *Enterolobium cyclocarpum*, *Pithecellobium dulce*, *Lysiloma acapulcensis*, entre otros (Camacho et al., 2010; Olmedo Juárez et al., 2014).

En este sentido, se han realizado diversas investigaciones al respecto para probar los compuestos de diversas plantas como antihelmínticos, (Torres-Acosta et al., 2011; Alonso-Díaz et al., 2009; Olmedo-Juárez et al., 2014) que han encontrado que los compuestos responsables de la acción antihelmíntica son los taninos condensados libres (TCL), que se encuentran en diversas cantidades en las plantas.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del follaje de *Lysiloma acapulcensis* agregado a la dieta sobre el establecimiento de la infección y la proliferación de nematodos gastrointestinales en ovinos

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Impacto de las nematodiasis en los rumiantes

El ganado que se produce en condiciones de pastoreo se encuentra expuesto al ambiente que le rodea, este hecho tiene entre otras consecuencias la presencia más destacada de enfermedades parasitarias que provocan alta mortalidad y por ende pérdidas económicas significativas en las unidades de producción. Particularmente las enfermedades parasitarias originadas por los nematodos gastrointestinales (NGI), también llamadas helmintiasis, son las principales que afectan un gran porcentaje de las unidades de producción ovina. Las helmintiasis son la principal causa de pérdidas económicas en las regiones de producción animal del trópico y subtrópico a nivel mundial, incluyendo por supuesto a Latinoamérica (Torres-Acosta et al., 2011). Las consecuencias negativas de las infecciones son difíciles de observar porque éstas se desarrollan generalmente de forma subclínica, esta es la principal razón por la que suelen ocasionar pérdidas económicas directas e indirectas muy elevadas que se reflejan en indicadores de vital importancia como la mortalidad en adultos y crías, disminución de la fertilidad, ganancias de peso muy bajas, disminución de la producción de leche, además de los gastos que se derivan de los tratamientos utilizados para el control de los NGI y honorarios del médico veterinario (López-Arellano y Mendoza-de-Gives, 2011). El control químico de los nematodos es el método más utilizado en la actualidad para el control de los parásitos de rumiantes alrededor del mundo, disponibles en diferentes presentaciones y con diferentes mecanismos de acción de acuerdo con la familia química a la que pertenecen (Coles et al., 2006). Este método de control fue muy efectivo y económicamente viable hasta hace unos años, cuando a nivel mundial se empezó a presentar un fenómeno general de disminución de la eficacia de estos tratamientos antihelmínticos en ovinos y en las otras especies de rumiantes, esto debido a varios factores entre los que destacan la frecuencia de los tratamientos, la subdosificación, el uso reiterado de un sólo antihelmíntico o una reinfección muy rápida; desarrollando en las poblaciones la resistencia a los fármacos antihelmínticos (Waller, 2006). A nivel mundial se han buscado estrategias de control de los NGI que sean alternativas viables para poder disminuir el uso de fármacos y conservar la eficacia de los antihelmínticos que aún poseen su efecto vigente; aumentar las poblaciones de parásitos susceptibles a los tratamientos y mejorar los procesos ecológicos de la cría de ovinos, llevando esta actividad a un plano más sustentable.

2.2. Las enfermedades parasitarias y su impacto en la ovinocultura

Las enfermedades parasitarias se encuentran entre las causas más frecuentes e importantes de ineficiencia biológica y económica en los sistemas pecuarios. El impacto más fuerte se tiene en la disminución de la productividad de los animales, lo que provoca que el productor abandone la actividad por el desaliento ante el problema. Tomando en cuenta los rumiantes domésticos, los ovinos son la especie con mayor susceptibilidad a las enfermedades parasitarias, siendo los NGI los parásitos de mayor impacto en los sistemas de producción (Hoste et al., 2008). Entre las consecuencias biológicas en los animales por la presencia de los NGI se encuentran trastornos en el consumo de alimento, mala digestión, mala absorción y secreción de metabolitos. El efecto de las infecciones puede variar en severidad dando lugar a una marcada disminución en la productividad caracterizada principalmente por retardo en el crecimiento y pubertad, reducción en las ganancias de peso hasta en un 50%, y mortalidades que oscilan entre un 20 a 50% (Luna et al., 2010). En Latinoamérica, para el 2006, se estimó un gasto en tratamiento antiparasitario en ovinos superior a los 770 millones de dólares (IFAH, 2006). Estos gastos, se deben a la administración de fármacos con actividad antihelmíntica, los cuales han sido utilizados desde la década de 1960 y han sido el método de control más efectivo y económico en ovinos (Coles et al., 2006). El éxito del control químico de las helmintiasis ha sido muy claro y ha permitido tener control sobre la gravedad y extensión de los efectos de los NGI durante todos estos años. Sin embargo, existen factores que limitan su aplicación y su permanencia como método de control en un futuro, entre ellos podemos mencionar el uso continuo o exclusivo de los antiparasitarios, la administración de dosis menores a las terapéuticamente recomendadas, el sobrepastoreo, entre otros, que han ocasionado una disminución en la eficacia de estos tratamientos (Torres-Acosta et al., 2011).

2.3. Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales

El ciclo biológico de los NGI de los rumiantes es monóxeno, posee un sólo hospedero definitivo (figura 1), y comprende dos fases: una libre en el medio exterior (exógena) y otra parasitaria en el hospedero (endógena) (Urquhart et al., 1996).

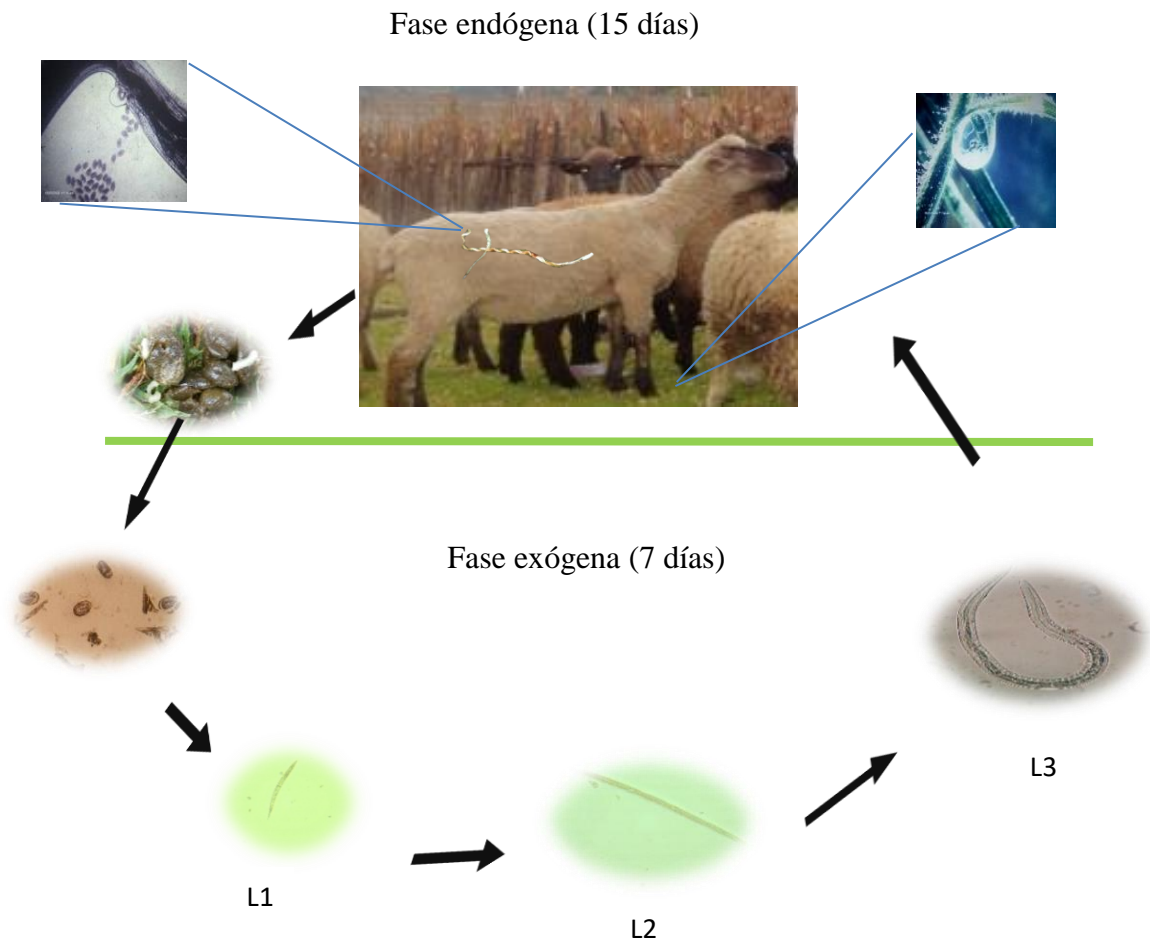


Figura 1. Representación esquemática del ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes

2.3.1. La fase de vida libre

Esta fase exógena del ciclo de vida de los NGI se inicia por la eliminación por las heces de huevos ovipositados por las hembras de los parásitos al medio exterior. Este elemento asegura la contaminación de las praderas las cuales con condiciones externas favorables (temperatura mínima de 10 °C; humedad relativa de 60%) los huevos embrionan y eclosionan liberando larvas del primer estadio (L₁) (Euzéby, 1963; Urquhart et al., 1996).

Después de dos mudas sucesivas, las L₁ evolucionan hasta la larva del tercer estadio o larva infectante (L₃). Contrariamente a los huevos y las larvas L₃ las L₁ y L₂ son poco resistentes a las condiciones adversas del medio ambiente. En zonas templadas y según las condiciones ambientales, las L₃ pueden sobrevivir varios meses en las praderas (O'Connor et al., 2006). Al contrario, en zonas tropicales/subtropicales, la sobrevivencia de las L₃ es menor pudiendo ser de algunas semanas debido al incremento de la actividad física favorecida por las elevadas temperaturas y humedad que agota sus reservas lipídicas (Urquhart et al., 1996; O'Connor et al., 2006).

2.3.2. La fase parasitaria

Esta fase comienza después de la ingestión de las larvas L₃ por el hospedero. La primera etapa de la invasión del tubo digestivo por las L₃ corresponde a su desenvainamiento (pérdida de la vaina procedente de las L₃). Este fenómeno marca la transición entre la vida libre y la vida parasitaria (Hertzberg et al., 2002). En la fase endógena, la larva infectante muda en el rumen, al haber un pH ligeramente ácido (5.5- 6.5), existe una secreción de la enzima leucinoaminopeptidasa a través de las células neurosecretoras de la larva, en seguida la larva penetra al abomaso entre los 10 y 20 minutos después de haber sido ingerida, en donde se transforma en L₄ (desenvainamiento) (Dakkak et al., 1981). Después del desenvainamiento, las L₄ penetran en la mucosa de los órganos digestivos, lugar donde mudan. Inmediatamente alcanzan el estado 5 (S₅), también denominado estado pre-adulto o adulto juvenil. El paso del S₅ al estado adulto corresponde la adquisición de la madurez sexual. Después de la fecundación por los machos, las hembras depositan sus huevos en la materia fecal de los hospederos (Euzéby, 1963).

La cronología del desarrollo de los estados parasitarios de los NGI difiere en función de la especie, de la importancia de la infección o del hospedero (resistencia). El tiempo entre la ingestión de las L₃ por el hospedero y la primera puesta de huevos por los adultos se denomina periodo pre-patente. En general, este dura de 2 a 3 semanas por la mayor parte de las especies de los ovinos y caprinos. Puede durar hasta cinco semanas para ciertas especies de *Strongyloidea* de los bovinos, por ejemplo, *O. radiatum* (Urquhart et al., 1996).

En periodos invernales, en zonas templadas o durante un prolongado periodo seco en zonas tropicales, es muy frecuente que las larvas se enquisten dentro de la mucosa digestiva y entran en hipobiosis larvaria lo cual retarda su desarrollo. Estas larvas enquistadas continúan su evolución en la primavera o en los periodos lluviosos siguientes (Euzéby, 1963). En este caso, la duración del periodo pre-patente pasa de 3 semanas a 3 o 4 meses.

2.3.3. Biología de las larvas infectantes

En el pasto, las larvas L₃ de los NGI poseen una vaina que es un vestigio de la cutícula de la L₂. Por la presencia de esta vaina, las L₃ son más resistentes a las condiciones exteriores (O'Connor et al., 2006). La sobrevivencia de las L₃ depende de la especie de parásito, de las condiciones climáticas y del ambiente externo (O'Connor et al., 2006). En general, las L₃ de *H. contortus*, sobreviven de 10 a 15 semanas en la primavera, mientras que durante el periodo seco y caluroso este periodo se acorta a 3 o 4 semanas. Los musgos y la materia fecal ofrecen condiciones óptimas para la sobrevivencia de las L₃, por la creación de condiciones microclimáticas favorables (Rogers y Sommerville, 1963).

Además de los factores físicos, las larvas L₃ son muy resistentes a los agentes químicos o biológicos. Sin embargo, estas larvas son presas o sustratos naturales de otros organismos bacterianos (*Bacillus thuringiensis*) o ciertos hongos calificados como nematófagos (*Duddingtonia flagrans*) (Chandrawathani et al., 2004)

Las L₃ son muy móviles y se desplazan horizontal y verticalmente sobre la hierba siguiendo un hidrotropismo positivo (en busca de la humedad), un fototropismo negativo (huyen fuertemente de la luz) y un geotropismo negativo (Euzéby, 1963; Rogers y Sommerville, 1963). Este movimiento favorece la ingestión de los animales de cantidades considerables de larvas y por

tanto lograr la parasitación de los rumiantes. Sin embargo, estos movimientos constantes son perjudiciales para la sobrevivencia de las L₃ ya que estas son incapaces de nutrirse, por lo que agotan sus reservas energéticas en esos movimientos (Rogers y Sommerville, 1963; O'Connor et al., 2006).

La infección del hospedero por las L₃ se inicia con el desenvainamiento. Este fenómeno ocurre en el órgano digestivo que le antecede. De este modo, las larvas L₃ de las especies abomasales se desenvainan en el rumen, mientras que las especies intestinales en el abomaso (Rogers y Sommerville, 1963). El desenvainamiento ocurre de 60-80 minutos después de la ingestión de la larva infectante (Hertzberg et al., 2002).

2.4. Efectos de los NGI sobre la fisiología digestiva

2.4.1. Disminución de la ingestión

En general, las infecciones por los NGI están asociadas a una pérdida del apetito. Se ha encontrado que en infecciones severas esta disminución del apetito puede llevar a una anorexia total (Urquhart et al., 1996; Hoste et al., 1997; Knox et al., 2006). Sin embargo, los mecanismos patogénicos implicados no están totalmente identificados, aunque a veces se ha mencionado el posible papel de hormonas peptídicas secretadas por las células digestivas (por ejemplo, la gastrina, colecistoquinina, Dynes et al., 1998)

2.4.2. Mala digestión y mala absorción

Los nematodos que parasitan los diversos órganos digestivos inducen las lesiones mayores en los epitelios. En el abomaso, la presencia de vermes está asociada a modificaciones de las glándulas gástricas, incluyendo una menor densidad de células diferenciadas, especialmente las células que producen el ácido clorhídrico.

Las mayores alteraciones descritas en el intestino a escala tisular o celular son abrasiones de las vellosidades, con hiperplasia de las glándulas Lieberkühn y, una alteración severa (menor diferenciación) de los eritrocitos (Hoste et al., 1997).

Lógicamente, esas modificaciones estructurales poseen repercusiones funcionales notables sobre la digestión de los alimentos y la absorción de los nutrientes a lo largo del tracto digestivo. En el estómago funcional de los rumiantes (abomaso), el parasitismo gastrointestinal provoca un aumento del pH gástrico dando lugar a una caída de la actividad de la pepsina, así como un agotamiento profundo de las actividades enzimáticas asociadas con enterocitos intestinales. La presencia de los vermes es el origen de las alteraciones de la permeabilidad de los epitelios y los trastornos del peristaltismo que reducen el tiempo de contacto entre las membranas mucosas y el quimo (Hoste et al., 1997).

La combinación de estos diversos procesos que afectan tanto las estructuras o funciones digestivas, explica los fenómenos de la mala digestión/absorción clásica que se describe en las infecciones por NGI estrogílidos (Hoste et al., 1997; Knox et al., 2006).

2.4.3. Modificaciones y reorientaciones del metabolismo

Mientras los efectos negativos del parasitismo en la ingestión y digestión de los alimentos aumentan, ocurre un cambio en la reorientación del metabolismo del hospedero (Hoste et al., 1997). La reducción de la ingestión y de la absorción resulta en una disminución de la disponibilidad de nutrimentos. Paralelamente, la presencia de los parásitos aumenta las necesidades nutricionales de los hospederos para mantener la homeostasis sanguínea (en el caso de los vermes hematófagos) y la integridad de sus epitelios y mucosas digestivas y, también para desarrollar una respuesta inmunitaria efectiva (Kyriazakis et al., 1996). La conjugación de estos fenómenos, conducen a una demanda de nutrientes, especialmente proteínas para reparar las lesiones provocadas a nivel de los sitios de acción de los parásitos, en detrimento de los sitios habituales de síntesis de proteínas por los hospederos (glándula mamaria, folículo piloso, músculo), lo cual aumenta las pérdidas en producción.

Estas profundas perturbaciones del metabolismo energético y proteico contribuyen a mantener las pérdidas zootécnicas por las infecciones parasitarias (Hoste et al., 1997). Además, Knox et al. (2006) sugirieron que el metabolismo del fósforo, del calcio y del hierro también se modifica por la presencia de los NGI.

2.4.4. Los mecanismos patogénicos

Las perturbaciones pato-fisiológicas son el resultado de efectos puramente mecánicos asociados a los efectos de excreción-secreción de los nematodos.

2.4.5. Los efectos mecánicos

Las lesiones de la mucosa digestiva se deben en parte al efecto mecánico de los vermes, relacionado con su adhesión a los epitelios ocasionando daños a las estructuras anatómicas especializadas del hospedero (Hoste et al., 1997). Determinadas especies de *Strongylidae* (*Chabertia ovina*, por ejemplo), presentan una cápsula bucal bien desarrollada que le permite fijarse al epitelio digestivo (Euzéby, 1963; Urquhart et al., 1996).

Sin embargo, *Trichostrongyloidea* posee una cápsula bucal reducida. Sólo los hematófagos como *H. contortus* presentan una neoformación dental. Por otra parte, para las especies intestinales como *Trichostrongylus* o *Cooperia* spp., ha sido descrito un efecto abrasivo de su cutícula sobre los enterocitos (Hoste et al., 1997).

2.4.6. Efectos de los productos de excreción-secreción

La mayoría de los nematodos gastrointestinales liberan dentro de su ambiente productos de excreción-secreción (E/S). La naturaleza bioquímica de estos productos presenta ciertas propiedades enzimáticas (proteasas, acetilcolinoesterasas) (Hoste et al., 1997), pero también glicoproteínas y monosacáridos, lípidos, prostanoídes (Garretson, 2007).

El papel de estos productos de E/S no está del todo claro, pero se sospecha de su participación en la instalación de las L₃, su nutrición y la reproducción de los parásitos adultos en el hospedero (Huby et al., 1999).

Algunas moléculas liberadas también afectan las mucosas del hospedero, participando en la génesis de las perturbaciones patofisiológicas, y también contribuyen a mantener el equilibrio parásito-hospedero (Huby et al., 1999).

2.5. El control convencional de los NGI

De manera convencional en la actualidad, médicos veterinarios y aún los productores han aprendido que la mejor manera de controlar los NGI en ovinos es la desparasitación regular de todos los animales; esta estrategia les permitió ver un beneficio inmediato en todo el rebaño. Sin embargo, la dependencia exclusiva del método de control químico para los nematodos gastrointestinales ha demostrado ser poco sustentable ni eficiente a largo plazo. (Galina y Cuellar, 2009). Hasta ahora la desparasitación con medicamentos químicos ha sido la propuesta más efectiva para el control de los parásitos; a pesar de que científicos y productores han trabajado en la búsqueda de diversas estrategias de control de los nematodos causantes de enfermedades parasitarias (Coles et al., 2006). Los antihelmínticos disponibles en la actualidad, se agrupan de acuerdo a su naturaleza química y efectos sobre los parásitos, siendo los benzimidazoles, imidazotiazoles y las lactonas macrocíclicas los más utilizados para el tratamiento de las nematodiasis en ovinos por ser considerados antihelmínticos de amplio espectro. Estos compuestos son efectivos en el control de los NGI de los ovinos, con las indicaciones y dosis adecuadas basadas en criterios técnicos, con el fin de obtener respuestas clínicas favorables. A pesar de esto, existen factores como la naturaleza química del compuesto, las propiedades farmacocinéticas, las características de los animales y de los parásitos que limitan el efecto de dichos medicamentos, lo que puede favorecer la aparición de resistencia en los parásitos a estos principios activos (Márquez, 2007).

2.6. Resistencia antihelmíntica

La resistencia a los antihelmínticos es un fenómeno que se ha presentado en todo el mundo, se caracteriza porque disminuye gradualmente el efecto antihelmíntico sobre los parásitos de todas las especies (Jabbar et al; 2006). La resistencia antihelmíntica por definición es la capacidad de los parásitos de sobrevivir a tratamientos antihelmínticos que a dosis terapéuticas normalmente causarían inhibición del crecimiento o muerte de individuos de una población normal o susceptible. Esta modificación es genética y heredable a la progenie y le confiere a ciertos parásitos la capacidad de sobrevivir al efecto farmacológico de una droga antihelmíntica, dando lugar a una población resistente. La aparición de la resistencia es gradual, pues al comienzo del desarrollo de la resistencia sólo una pequeña parte de la población parasitaria posee tolerancia genética al tratamiento. sin embargo, ante reiteradas desparasitaciones con una misma droga, la

mayor parte de la población susceptible muere y sobreviven de esta forma los organismos que han desarrollado resistencia que, luego de sucesivos tratamientos, llegan a representar la mayoría de la población y transmiten esta capacidad o toda su descendencia (Martínez-Ortiz-de-Montellano, 2010). El primer caso de NGI resistentes a los antihelmínticos fue reportado en 1977, en los EE.UU (Drudge, et al., 1977). Hoy en día, el fenómeno de la resistencia antihelmíntica de los parásitos está muy extendido y se ha convertido en un problema muy grave en los principales países productores de ovinos. México no está exento del problema, se ha detectado resistencia antihelmíntica en los estados de la República ubicados en el golfo de México y algunos del centro del país. Campos et al. (1990) reportaron el primer caso de resistencia en México, en donde determinaron la presencia de una cepa de NGI resistentes al albendazol. Sin lugar a duda, hoy en día los parásitos resistentes a los antihelmínticos, son una realidad en muchos rebaños ovinos de México (Torres-Acosta et al., 2011). Actualmente, a nivel nacional, se encuentra ya establecido un fenómeno de multiresistencia antihelmíntica donde se ven comprometidas todas las familias de antiparasitarios disponibles en el mercado y varios géneros de NGI (Aguilar et al., 2009).

El cuadro 1, muestra los reportes de resistencia antihelmíntica en ovinos realizados en el sureste de México.

Cuadro 1. Reportes de resistencia antihelmíntica en el sureste de México, lugar, antihelmínticos, géneros de nematodos gastrointestinales involucrados, autor y año

Lugar	Familia de Antihelmíntico	Géneros Involucrados	Autor y Año
Ote. de Yucatán	Benzimidazoles	<i>Haemonchus</i>	Torres-Acosta et al, 2003
Edo. de Yucatán	Benzimidazoles y Lactonas Macroiclicas	<i>Haemonchus</i> y <i>Trichostrongylus</i>	Torres-Acosta et al, 2003
Huimanguillo y Teapa, Tabasco	Benzimidazoles	<i>Haemonchus</i> , <i>Teladorsagia</i> , <i>Cooperia</i> y <i>Oesophagostomum</i>	González-Garduño et al., 2003
Centla, Tabasco	Benzimidazoles y Lactonas Macroiclicas	<i>Haemonchus</i> , <i>Teladorsagia</i> y <i>Cooperia</i>	Nuncio et al. 2003
Edo. de Tabasco	Benzimidazoles, Imidazotiazoles y Lactonas Macroiclicas	<i>No Reportado</i>	Nuncio et al. 2005
Edo. de Campeche	Benzimidazoles y Lactonas Macroiclicas	<i>Trichostrongylus</i>	Torres-Acosta et al, 2007
Centro y Altos de Chiapas	Benzimidazoles, Imidazotiazoles y Lactonas Macroiclicas	<i>Haemonchus</i> y <i>Teladorsagia</i>	Sánchez et al.,2008
Centro, Tabasco	Benzimidazoles, Imidazotiazoles y Lactonas Macroiclicas	<i>Haemonchus</i> y <i>Trichostrongylus</i>	Medina et al., 2011

2.7. Alternativas de control de NGI en ovinos

Se han desarrollado diversas alternativas para el control de NGI, con distintos grados de avances y de eficacia; estas alternativas se han centrado en la disminución del uso de fármacos. Entre las estrategias diseñadas para el control de los NGI en ovinos podemos mencionar las siguientes:

2.7.1. Innovaciones en los sistemas de pastoreo

La rotación de potreros es una manera de disminuir el impacto de los parásitos, ya que reduce la ingestión de larvas infectantes en el forraje que ingieren los animales. Cuando se utiliza la rotación de potreros se permiten períodos de descanso de la pradera, lo que permite que la radiación solar y el ciclo biológico natural de los NGI reducen la población de larvas infectantes (Martínez-Ortiz-de-Montellano, 2010). Carrión (2006), en la zona oriental de la República de Cuba, encontró que el período de tiempo con riesgo significativo de infección en el pastizal se relaciona directamente con el nivel de infección de los animales que ocuparon dicho pastizal. De acuerdo con los resultados del estudio, cuando la infección se encuentra entre 500 y 1000 huevos por gramo de heces (HPG), el periodo de mayor riesgo de infección se encuentra entre los 15 y 36 días posteriores a la ocupación; cuando la infección del rebaño es superior a 1000 HPG el periodo de mayor riesgo de infección se extiende desde los 12 hasta 41 días. Sin embargo, cuando el rebaño tiene un nivel bajo de infección inferior a 500 HPG, no existen periodos de riesgo de re-infección inmediata. En México no existen trabajos publicados parecidos a este (Martínez-Ortiz-de-Montellano, 2010).

2.7.2. Control biológico

En la naturaleza se han encontrado organismos que son antagónicos a los parásitos. Estos organismos presentan gran diversidad y actúan en la naturaleza como un control natural, en algunos casos han llegado a tener un impacto benéfico como control biológico de los NGI de los ovinos. Estos organismos pueden ser bacterias, ácaros y hongos (Aguilar-Marcelino, 2012). Entre los organismos que se han probado como control biológico de NGI en rumiantes como alternativa a los fármacos, los hongos de naturaleza nematófaga son los que han tenido mejores resultados. González-Garduño (2006) realizó un estudio *in vitro* para evaluar la capacidad de depredación del hongo nematófago *Duddingtonia flagrans* sobre algunas especies de larvas de

NGI de ovinos (*Ostertagia circumcincta*, *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*) encontrando porcentajes de captura de larvas con rangos entre 40 a 93%. En otros estudios se ha evaluado la capacidad de adhesión de las esporas de la bacteria *Pausteria sp.*, para disminuir las poblaciones de *H. contortus* encontrando porcentajes de adhesión de 0-40% en diferentes estadios biológicos del NGI (Aguilar-Marcelino, 2012), Así mismo Ojeda et al. (2008), encontraron que el efecto de *D. flagrans* sobre larvas de nematodos gastrointestinales fue de 37-92% de reducción de larvas. Sin lugar a dudas los resultados de estos estudios arrojan una luz sobre el problema de los parásitos y dejan ver el potencial que tienen los microorganismos como alternativa de control de los NGI de los rumiantes.

2.7.3. Plantas con propiedades antihelmínticas

En la mayoría de los continentes, fundamentalmente en países en vías de desarrollo, la medicina tradicional se basa en el conocimiento empírico del uso de plantas (etnomedicina veterinaria) y es ampliamente difundida (Hounzangbe-Adote, 2004; Githiori et al., 2006). Por otro lado, en los países desarrollados apuestan por una agricultura sostenible y biológica, que logren reducir los residuos químicos en los alimentos de origen animal (Waller y Thamsborg, 2004).

Otro aspecto a considerar en el empleo de métodos alternativos de control parasitario es la reducción de la presión de selección al minimizar su uso pues presentan ventajas comparativas como 1) la disponibilidad de recursos de este tipo, 2) la ausencia actual de resistencia a los compuestos activos y, 3) escasa disponibilidad de antiparasitarios de calidad en los países en desarrollo.

Las plantas pueden funcionar ya sea como remedios con preparaciones a base de ellas, o de acuerdo con el concepto más innovador de las plantas como operadores nutracéuticos, a menudo como forraje.

Las preparaciones fitoterapéuticas a base de plantas son por lo general preparadas con mezclas complejas de compuestos activos, que se brindan para tratar los animales infectados por un periodo corto. Los nutracéuticos se definen como una planta que es consumida por los animales y brinda ventajas tanto sobre la salud de los animales como en su nutrición en su sentido estricto

(Andlauer y Furst, 2002). Su incorporación en la ración, por periodos más prolongados (de varios días a un mes) es generalmente concebido con fines preventivos.

Los estudios sobre el efecto de las plantas con propiedades antiparasitarias han permitido confirmar el interés potencial del ajo (*Allium sativa*), de saifoin (*Onobrychis viciifolia*), papaya (*Carica papaya*), hoja de yuca (*Manihot esculenta*), o algunas arbustivas tropicales como leucaena (*Leucaena leucocephala* y *Lysiloma latisiliquum*, entre otras), (Marley et al., 2003; Githiori et al., 2006; Chagas et al., 2008).

El empleo potencial de las plantas con principios bioactivos presenta también sus limitantes. La primera de ella resulta la escasez de información científica sobre los compuestos activos, su modo de acción y, los factores que influyen en su efectividad. Otro elemento es la toxicidad eventual en los animales de algunas especies y la adecuada posología para encontrar su efecto benéfico (Githiori et al., 2006).

Sin embargo, debido a su explotación como forrajes, los efectos nutracéuticos a menudo se consideran de bajo riesgo tóxico. La variabilidad inherente de las plantas de acuerdo a las condiciones ambientales o de crecimiento en función de las especies o variedades utilizadas deben también ser consideradas y estudiadas a fin de estandarizar los mejores tratamientos fitoterapéuticos, de acuerdo a la planta, las condiciones climáticas y las prácticas de crianza de los animales (Rochfort et al., 2008). Una última limitación es el riesgo ecológico posible. Los casos de sobre-explotación de las plantas por sus propiedades medicinales ya han sido reportadas con un impacto ambiental relacionada con el riesgo de extinción de las especies de plantas o de ecotipos de interés en ciertas regiones (Hounzangbe-Adote, 2004).

Chagas et al. (2008) demostraron en ovejas como los alcaloides son responsables del efecto antihelmíntico del árbol del Neem (*Azadirachta indica*). Algunos terpenos como los sesquiterpenos, se les atribuyen las propiedades antiparasitarias de achicoria (*Cychorium intybus*) (Marley et al., 2003). Por su parte, Githiori et al. (2006) informaron que los compuestos responsables de la actividad antiparasitaria de *Calotropis procera* y *Terminalia glaucescens* parecen ser alcaloides y antraquinonas, respectivamente.

En la temática del uso de plantas con propiedades antiparasitarias en los últimos 20 años se ha puesto de manifiesto que la explotación de las propiedades bioactivas de las plantas

antiparasitarias son una alternativa válida para el empleo de los AHs sintéticos (Niezen et al., 1996; Githiori et al., 2006; Hoste et al., 2008). En particular, los resultados más alentadores se presentan en el valor potencial de las plantas, incluidas las leguminosas, ricas en taninos condensados.

2.7.3.1. Papel de los taninos en las plantas

Los taninos como metabolitos secundarios de los vegetales (Bruneton, 1999) no están implicados en el crecimiento y la reproducción de las plantas, sin embargo, desempeñan un papel en la defensa frente a agresiones de diversos fitófagos. Por lo tanto, altas concentraciones de estos metabolitos en las plantas inhiben el desarrollo de bacterias, hongos y nematodos patógenos (Rochforth et al., 2008).

Se ha demostrado que la ingestión de taninos causa lesiones en el tracto gastrointestinal (TGI) de los herbívoros. La presencia excesiva de taninos también afecta el sabor de las plantas por lo que disminuye su palatabilidad y capacidad de consumo, como resultado de la astringencia que estos ocasiona (Austin et al., 1989).

2.7.3.2. Localización de los taninos en los tejidos vegetales

Todos los órganos de las plantas pueden contener taninos, pero la localización principal difiere según la especie de planta en cuestión. De manera general los taninos son mayoritariamente almacenados dentro de los tejidos epidérmicos y sub epidérmicos de las hojas, pero también se pueden encontrar dentro del pericarpo de los frutos y raíces. A nivel celular, los taninos hidrosolubles (THs) están predominantemente dentro de las paredes celulares y entre los espacios intracelulares. Los taninos condensados (TC) son sobre todo almacenados en las vacuolas intracelulares en forma libre y, en proporciones variables, vinculadas a las fibras (lignina) o proteínas de las paredes celulares (Frutos et al., 2002). Una misma especie de planta puede sintetizar TC y THs y pueden tener una diferencia en la distribución de cada uno de ellos de acuerdo al órgano de la planta en cuestión (Jean-Blain, 1998).

2.7.3.3. Efecto de los taninos condensados

El principio enunciado por Paracelso (“*la dosis solo hace el veneno*”) sigue siendo válida para el caso de los TC, ya que los efectos nefastos sobre la producción y la salud de los animales han sido observados únicamente después de la ingestión masiva de recursos forrajeros ricos en TCs. Inversamente a los THs, los TCs son raramente asociados con una toxicidad aguda en los rumiantes (Butter et al., 1999). Un nivel de consumo bajo o moderado de TC se asocia con efectos favorables, mientras que la ingestión de elevados niveles resulta en aspectos negativos en parámetros de salud y sobre la fisiología digestiva de los animales (Butter et al., 2000; Min y Hart, 2003). Por consiguiente, se pueden identificar tres tipos de consecuencias zootécnicas según los tenores de TCs en la ración (Paolini et al., 2003).

2.7.3.4. Plantas ricas en taninos condensados (TC)

De manera general, los TC se encuentran mayormente distribuidos en el reino vegetal que los THs (Jean-Blain, 1998), ya que estos se encuentran tanto en las Angiospermas como en las Gymnospermas (Bruneton, 1999). Determinadas especies de la familia Pinaceae, de Fagaceae (roble), de Rosidaeae (acacias) y, de Rosaceae (manzanas, fresas) contienen cantidades considerables de TC superiores al 5% de la MS. Entre las Fabaceae (leguminosas), determinadas especies forrajeras, como *Onobrychis viciifoliae*, *Hedysarum coronarium*, *Lotus pedunculatus* poseen niveles entre 2 y 5%. En tanto, en las zonas tropicales los arbustos como, *L. leucocephala*, *D. cinerea*, *Gliricidia sepium* poseen niveles entre 15 y 22% (Romero, et al., 2000)

2.7.3.5. Efectos sobre la ingestión voluntaria de alimentos (consumo voluntario)

La masticación de las plantas por los animales provoca la ruptura de las paredes de las células vegetales por lo que se liberan los TC contenidos en las vacuolas dentro de la boca del animal. Debido a la sensación de astringencia asociada a la presencia de los TC en la boca, se inducen efectos sobre la ingestión voluntaria de los alimentos (consumo voluntario) y además se pueden modificar las funciones ruminales y post ruminales sobre el bolo alimenticio. Sin embargo, para

las leguminosas de zonas templadas, cuyo contenido de TC es de bajo a moderado (<4 a 5% de la materia seca) los consumos de alimentos son escasamente modificados (Terrill et al., 1992) y, en consecuencia, provocan efectos favorables en el proceso fisiológico digestivo por el efecto protector fundamentalmente de la proteína, convirtiéndola en proteína pasante.

2.7.3.6. Efectos sobre la digestión de los alimentos

Los TC afectan las diferentes etapas de la digestión a nivel ruminal y post ruminal, lo que explica las consecuencias asociadas sobre los diversos aspectos de la producción de los rumiantes.

2.7.3.7. Efectos en la fermentación ruminal

El rumen se caracteriza por poseer un pH de 6 a 7. A esta gama de pH, los complejos que se forman entre los TC y las proteínas son estables (Butter et al., 2000) y contribuyen a proteger las proteínas de la degradación ruminal. La formación de estos complejos entre los TC y las proteínas alimentarias o su fijación a las enzimas bacterianas reducen globalmente la proteólisis ruminal (Jean-Blain, 1998; Min et al., 2003).

2.7.3.8. Efectos post ruminales

La protección de la degradación de las proteínas dentro del rumen conduce al aumento del flujo de proteínas asimilables hacia el intestino y, por consiguiente, un aumento de la absorción de aminoácidos (Min et al., 2003). Según Butter et al., (2000) el pH ácido induce una disociación de los complejos TCs-Proteínas, y la liberación de las proteínas y aminoácidos, permitiendo así su digestión y absorción a nivel intestinal (Zimmer y Cordesse, 1996; Butter et al., 1999). En ovejas se ha encontrado un aumento del 50% del flujo de nitrógeno post ruminal cuando consumen trébol (*Lotus corniculatus*), comparados con un grupo control (Waghorn, 2008).

2.7.3.9. Mejora de las producciones

Se ha demostrado que el consumo de plantas que contienen TC (*L. corniculatus*) en cantidades moderadas afecta el crecimiento de ovinos en desarrollo (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005), o en bovinos en desarrollo. Por otra parte, la ingestión de niveles bajos de TC influye también en los niveles de producción y la calidad de la leche (Min et al., 2003; Rochfort et al., 2008). El consumo de lotus o de sulla (*Hedysarum coronarium*) se ha asociado a un incremento de la producción de leche en ovinos y bovinos (Min et al., 2003). Por otra parte, se ha demostrado un aumento de la tasa de proteínas en la leche en vacas de un 10% y un 12% en ovejas que consumen TC, la tasa de lactosa se incrementó a un 14% en ovejas al ser comparado con animales que no recibieron esta la suplementación con plantas ricas en TC (Min et al., 2003; Rochfort et al., 2008). Finalmente, una ingestión moderada de TC (de 2 a 4% del total de la ración) se asocia a un aumento de la producción de lana. Por ejemplo, el consumo de *L. corniculatus* induce un aumento de un 11% de la producción de lana en ovinos (Luque et al., 2000), que está asociado con un incremento de la absorción en particular de cisteína, el cual es un aminoácido esencial para la producción de la lana.

2.7.3.10. Efectos sobre la salud de los animales

2.7.3.10.1. Prevención de la meteorización espumosa

En los rumiantes, la meteorización espumosa, también conocido como timpanismo espumoso, es el resultado de la acumulación de gas derivados de la fermentación exacerbada en el rumen que es “secuestrada” dentro de una espuma estable formada a partir de proteínas solubles de la ración (Rochfort et al., 2008). Este desorden sanitario aparece con frecuencia tras consumos excesivos de leguminosas como el trébol (*Trifolium repens*) o alfalfa (*Medicago sativa*).

Contrariamente, el consumo moderado de plantas ricas en TC (en el orden del 0,5% de la MS) como algunas leguminosas forrajeras se asocian a una prevención de los riesgos de timpanismo espumoso (Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Rochfort et al., 2008). Ello se explicaría por la formación de complejos de los TC con las proteínas procedentes de los alimentos, reduciendo de este modo las fermentaciones ruminales (Zimmer y Cordesse, 1996).

Los TC inhiben también el crecimiento y la multiplicación de los microorganismos del rumen para su fijación a las constituyentes de sus paredes celulares, bloqueando de ese modo, el transporte molecular, además que esa agregación celular entre ellos bloquea su capacidad de división (Mc Sweeney et al., 2008).

2.7.3.10.2. Prevención de episodios diarreicos

El consumo de forrajes ricos en TC está generalmente asociado a un aumento de la materia seca de las heces lo que contribuye a evitar los episodios diarreicos (Min et al., 2003;). Además, como consecuencia disminuyen los riesgos de miasis cutáneas debido a la disminución de las suciedades de las zonas del periné como las diarreas (Larsen, 2006).

2.8. Efectos de los taninos condensados sobre los parásitos gastrointestinales de los rumiantes

Desde los inicios de los años 90's, los efectos de los TC sobre el parasitismo gastrointestinal de los rumiantes han sido estudiados fuertemente y constituyen una alternativa complementaria al empleo reiterado de antihelmínticos sintéticos para combatir las parasitosis digestivas (Paolini et al., 2004; Waller y Thamsborg, 2004; Ramírez-Restrepo y Barry, 2005; Githiori et al., 2006; Hoste et al., 2008).

El interés principal se inicia a partir de leguminosas forrajeras de climas templados como *L. pedunculatus* o *L. corniculatus*, *H.coronarium*, *Lespedeza cuneata*, *Dorycnium rectum*, u *Onobrychis viciifoliae*, de las cuales sus efectos antiparasitarios han sido confirmados a través de diversos estudios (Marley et al., 2003; Heckendorn, 2007; Hoste et al., 2008). El hecho que estas leguminosas presentan la particularidad de tener tenores moderados de TC, mientras que están desprovistos o poseen bajos niveles de THs (Mueller-Harvey, 2006; Hoste et al., 2008) contribuyen fuertemente a considerar el efecto de los TCs en las respuestas obtenidas en las reducciones parasitarias. Existen estudios más recientes que integran estos conceptos de plantas de otras familias de zonas templadas o tropicales consumidas por los ovinos y caprinos que presentan niveles de TCs de moderados a altos (Alonso-Díaz et al., 2009).

En ciertos casos, el papel de los taninos en los efectos observados ha estado subrayado por el empleo de métodos inhibidores *in vivo* e *in vitro* (Brunet et al., 2008).

2.8.1. Estudios *in vitro*: evidencias de efectos antihelmínticos

Existen en la actualidad un gran número de estudios *in vitro* aplicados para valorar la eficacia antihelmíntica de extractos de plantas ricas en taninos, que constituyen herramientas para la realización de *screening* para la selección de plantas con propiedades antiparasitarias. De manera general, estas se desarrollan a partir los mismos principios que se evalúan los antiparasitarios sintéticos. En estudios recientes se evaluó el efecto larvicida de extractos acuosos de dos leguminosas tropicales *Lysiloma acapulcensis* y *Pithecellobium dulce*, donde los resultados del primero fueron mejores en eclosión de huevos, desarrollo larvario y migración

larvaria, siendo en este último ensayo similar al resultado obtenido con levamisol al 1% para el caso de *L. acapulcensis* (Olmedo-Juárez et al., 2014).

Estas pruebas *in vitro* poseen como principal ventaja que permite realizar una selección rápida y estandarizada de múltiples muestras. La mayoría de ellas son reproducibles, sensibles y a su vez bastante fiables (Jackson y Miller, 2006). La interpretación de la información obtenida descansa en la hipótesis de un efecto directo de tipo farmacológico de los TC sobre los parásitos. Las concentraciones de TC empleadas a cada test *in vitro* se corresponden con varias gamas de concentraciones de TC medidos *in vivo* (Molan et al., 2003). Aunque los resultados obtenidos *in vitro* están fuera del contexto de la respuesta fisiológica e inmunológica puede representar, en alguna manera, una predicción de los efectos *in vivo*, no obstante, los estudios en los animales son necesarios.

2.8.2. Estudios en condiciones de infección experimental. Efecto sobre larvas infectantes (L₃)

Para confirmar los estudios *in vitro* que indican un efecto significativo sobre la biología de las L₃ (migración y desvainamiento) de diversas especies de parásitos en presencia de TC, son necesarios estudios *in vivo* para verificar si la instalación de las L₃ está siendo modificada en un ambiente digestivo rico en TC, unido al consumo de recursos forrajeros ricos en TC (quebracho, leguminosas templadas o tropicales).

En presencia de quebracho, las reducciones significativas de la instalación larvaria ha estado en el orden del 65-70% en cabras infestadas por *T.colubriformis* y *T.circumcincta* (Paolini et al., 2003c); en el caso de *H. contortus* en el orden de un 33% (Paolini et al., 2004). Estos efectos son comparables sobre los procesos biológicos iniciales de las larvas infectantes de *H. contortus* encontrados después del consumo de *L. latisiliquum*, en cabras (Brunet et al., 2008).

Se ha reportado una gran variabilidad similar de resultados en función de las especies de parásitos implicadas con plantas ricas en TC. Por ejemplo, el empleo de leguminosas templadas (*Onobrychis viciifoliae*) obtuvo reducciones considerables en la cantidad de vermes adultos de *T. colubriformis* y *T. circumcincta* en ovinos (Thamsborg et al., 2003); todo lo contrario sucedió en ovinos y terneros parasitados con *H.contortus* y *T. colubriformis* (Paolini et al., 2005 y Ríos de Alvarez et al., 2012).

Para las plantas tropicales solamente se dispone de un estudio que indica la reducción significativa en la reducción de vermes adultos de *H. contortus* en caprinos que se les suministró hojas de *Acacia nilotica* y *Acacia karoo* (Kahiya et al., 2003).

2.8.3. Efectos sobre los vermes adultos

Los estudios sobre los efectos de los TC y de las plantas ricas en este metabolito en las poblaciones de parásitos adultos son mucho más abundantes. Ellos se han desarrollado en condiciones de infecciones experimentales o naturales y, posteriormente se les suministra el tanino o el follaje de la planta rica en este metabolito.

En términos muy generales, los resultados significativos, en primer lugar, se refieren a la disminución de la cantidad de huevos de parásitos expulsados por las heces. Según las plantas empleadas y la especie de parásito en cuestión se considera que esa reducción en el conteo fecal de huevos (CFH) se debe a una disminución de la carga parasitaria (Niezen et al., 1996), es decir, que estos resultados se deben a la disminución de la cantidad de parásitos adultos en las necropsias o posiblemente a un efecto sobre su fertilidad.

Los primeros estudios realizados en infecciones experimentales en ovejas y cabras recibieron extractos de quebracho (Athanasiadou et al., 2001) o de *Acacia* spp. (Max et al., 2003), que se corresponden con las formas concentradas de estos metabolitos.

También se ha confirmado, en gran medida, con las principales leguminosas forrajeras ricas en TC, que sirven como modelos para diferentes estudios de esta materia en el mundo. En un reducido número de estudios no se apreciaron diferencias significativas en la eliminación de huevos de nematodos. Este fue el caso de ovejas que consumieron sulla (*H. coronarium*) (Niezen et al., 2006; Athanasiadou et al., 2001), el trébol pedunculado (*L. pedunculatus*) (Niezen et al., 1996; Athanasiadou et al., 2005), sainfoin (*O. viciifolia*) (Athanasiadou et al., 2001). Muchos de estos resultados son a veces decepcionantes y están relacionados con el efecto de los TC en el consumo lo cual no garantiza que los animales consuman la totalidad de la dieta ofrecida sin que haya una tasa de concentración estable del TC en el sistema digestivo.

En sentido general, como en condiciones controladas, el consumo de forraje de leguminosas ricas en TC tanto templadas (Marley et al., 2003) como tropicales (Terrill et al., 1992), se ha

asociado con una reducción del nivel expulsión de huevos de parásitos por las heces en ovejas y cabras. Este fenómeno ha estado asociado a una disminución de la carga parasitaria (Niezen et al., 1996), o a la disminución de la fertilidad de los especímenes hembras (Paolini et al., 2004).

Los estudios indican que se han apreciado los mismos fenómenos (reducción de la cantidad de vermes adultos o reducción de la fertilidad de las hembras) al suministrar forrajes (principalmente de la familia Fabaceae) que son ricos en polifenoles y especialmente en taninos.

En las regiones tropicales, se han reportado resultados interesantes con el consumo de hojas de varias especies de *Acacia* en las infecciones experimentales (Kahiya et al., 2003) o naturales (Akkari et al., 2008), de *L. latisiliquum* (leguminosa arbustiva de México) (Martínez-Ortiz-de-Montellano, 2010), *L. leucocephala* (von Son-de-Fernex et al., 2015) o de hojas de yuca (*Manihot esculenta*) (Nguyen et al., 2005). En algunos de estos estudios se ha encontrado una correlación entre la reducción del conteo fecal de huevos y la cantidad de vermes adultos (Akkari et al., 2008).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso no controlado de antihelmínticos de origen químico ha ocasionado la aparición de fenómenos de resistencia por parte de los nematodos gastrointestinales (NGI), en cortos períodos de tiempo (Encalada-Mena et al., 2014; Muñiz-Lagunes et al., 2015). Por otro lado, el desarrollo de nuevos antihelmínticos químicos es lento en comparación con la velocidad de aparición de resistencia. Estos dos hechos obligan a la búsqueda sistemática de alternativas para el control de los NGI, entre las que se encuentra el uso de forrajes que contienen taninos condensados, que han probado su efecto nematicida en estudios realizados *in vitro* (von Son-de-Fernex et al., 2012; Vargas-Magaña et al., 2014). Las plantas que se encuentran dentro de la familia Leguminosae contienen gran cantidad de metabolitos secundarios con diversas propiedades medicinales como antibacterianas (Sharma et al., 2016), antifúngicas (Wang et al., 2012), anticancerígenas (Rosenthal, 1997), antihelmínticas (Olmedo-Juárez et al., 2014; von Son-de-Fernex et al., 2015), entre otras. El tepehuaje (*Lysiloma acapulcensis*), es una especie arbórea que contiene un alto valor nutricional y se caracteriza por tener un alto contenido de taninos condensados en sus hojas, principalmente dentro de la época de secas (Camacho et al., 2016). Asimismo, esta especie vegetal es consumida por los ovinos, bovinos y caprinos de la zona sur del estado de México. Recientemente se realizó un estudio de esta naturaleza utilizando dos especies arbóreas con potencial forrajero, *Pithecellobium dulce* y *Lysiloma acapulcensis* (Olmedo-Juárez et al., 2014) con resultados prometedores con éste último. Los autores anteriormente citados, encontraron una importante actividad biológica con extractos acuosos a partir de hojas de *L. acapulcensis*; dicha actividad fue en contra de las fases exógenas de los nematodos *H. contortus*, *Trichostrongylus colubriformis* y *Oesophagostomum columbianum*. A partir de estos resultados surge la necesidad de escalar estudios con estudios de esta planta sobre un modelo biológico con ovinos experimentalmente infectados con este tipo de parásitos.

IV. HIPÓTESIS

La inclusión de follaje deshidratado de *Lysiloma acapulcensis* en la dieta tiene efecto antihelmíntico sobre el establecimiento de la infección y sobre la proliferación de los nematodos gastrointestinales de los ovinos.

V. OBJETIVOS

5.1. General

Determinar la actividad antihelmíntica *in vivo* del follaje deshidratado de *Lysiloma acapulcensis* en infecciones mixtas de nematodos gastrointestinales de ovinos.

5.2. Específicos

- Evaluar el efecto del follaje deshidratado incluido en la dieta de los ovinos sobre el establecimiento de la infección de larvas L₃ y sobre la magnitud de la infección parasitaria de los nematodos gastrointestinales.
- Determinar las ganancias de peso vivo en los diferentes grupos de ovinos experimentales

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en la Estación Experimental de Pastos y Forrajes “Indio Hatuey” que se localiza en el municipio de Perico, provincia de Matanzas, Cuba. Las coordenadas geográficas del lugar son 20° 50’ de latitud Norte y 79° 32’ de longitud Oeste, con una altitud de 19.9 m.

En el área experimental el clima se caracteriza por presentar dos períodos anuales bien definidos; uno lluvioso (mayo-octubre) en el que se registran entre el 70-80% de las precipitaciones (960 mm aproximadamente) y otro poco lluvioso de noviembre a abril (240 mm), para una precipitación promedio anual de 1200 mm. La temperatura promedio anual es de 23.1°C, con una humedad relativa entre 60-70% durante el día y del 80-90% por la noche.

6.2. Colecta de material vegetal

Durante el mes de agosto de 2012, se realizaron colectas de hojas de *Lysiloma acapulcensis* en los municipios de Tejupilco, Temascaltepec y Amatepec en el Estado de México, México. Se delimitaron siete sitios en donde se encontraron árboles de *L. acapulcensis* como parte de la vegetación natural de los lugares; posteriormente se colectó follaje de siete árboles en cada uno de los sitios, compuesto por hojas jóvenes y maduras, se trasladó en un contenedor térmico con ambiente enfriado artificialmente a las instalaciones del Centro Universitario UAEM - Temascaltepec, a una altura media sobre el nivel del mar de 1740 m, con un clima del tipo cálido sub-húmedo con presencia de lluvias en verano (Aw) (García, 1987), dando un total de cuarenta y nueve muestras individuales, que proporcionaron siete muestras verdaderas.

6.3. Procesamiento de las muestras vegetales

Las hojas fueron secadas en el laboratorio de bromatología del Centro Universitario UAEM-Temascaltepec en una estufa de aire forzado a 48° C durante 72 horas y posteriormente fueron molidas en un molino de martillos a un tamaño de partícula de 0.5 mm, en seguida se les aplicó tratamiento fungicida/bactericida para poder movilizar el material al lugar donde se llevó a cabo el estudio (República de Cuba).

6.4. Obtención de las larvas (L3)

Las larvas para la infección se obtuvieron mediante cultivo en heces de un animal previamente infectado de manera intencional. Primero se realizó la infección vía oral con 1000 larvas L3 y se esperaron dos semanas para que se estableciera la infección, confirmando a través de un conteo fecal de huevos (CFH) por técnica de McMaster Modificado (Arece et al., 2004). Después de confirmada la infección, se subió al animal a una jaula metabólica durante 24 horas con agua fresca y alimentación a base de forraje verde a libre acceso, en este período se colectaron las heces para proceder a establecer los coprocultivos. Posteriormente se colocaron 40 a 60 g de heces en el fondo de un frasco de cristal color ámbar y se dejaron a temperatura ambiente, protegido de la luz solar, durante diez días. Una vez concluido el plazo, se procedió a la extracción de larvas llenando el frasco con agua limpia e invirtiéndolo poniendo una placa de Petri como tapa. Se esperaron dos horas para que las larvas migren hacia la placa de Petri por el medio líquido y se extrajeron con un gotero. Por último, se realizó un conteo para saber la concentración de larvas L₃ contenidas en un mililitro que se tuvo en el recipiente, se contaron cincuenta alícuotas de 10 µL, después se calculó el promedio y se realizó la conversión para saber la concentración. Se etiquetaron y se guardaron en refrigeración.

6.5. Diseño experimental

Para este experimento se utilizó un diseño completamente al azar, en donde se requirieron 50 corderos de raza Pelibuey, con un peso vivo de 22 ± 4 kg de PV. Los animales fueron alojados en el área de producción y cinco días antes de iniciar la fase experimental se desparasitaron con ivermectina inyectable (7.5 mg/kg de PV) y se aplicaron vitaminas A, D y E (Adebiotic, Biochem care systems; 2 mL/ animal). Una vez desparasitados se seleccionaron de forma aleatoria para dividirlos en 5 grupos: a) Ivermectina (Control +), b) Control negativo (sin tratamiento), c) Dosis 1 (12.5 mg/Kg PV), d) Dosis 2 (25 mg/Kg PV) y e) Dosis 3 (37.5 mg/Kg PV). A partir del día 0 al día 40 recibieron agua a libre acceso y una dieta basal libre de forrajes con taninos condensados. En el día cero de la fase experimental, todos los ovinos fueron infectados con una dosis única por vía oral de 3000 larvas infectantes (L_3). Para ello los animales de cada tratamiento fueron divididos en 2 grupos (5 ovinos), dado que el experimento se integró en dos fases:

6.6 Modelo estadístico

El modelo matemático empleado en este estudio se presenta a continuación

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} = Variable de respuesta

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = Error experimental ($0, \sigma^2$)

6.7. Fase 1: Efecto del follaje en el establecimiento de las larvas L_3

El principio de esta fase fue evaluar el efecto larvicida del follaje deshidratado cuando se les proporcionó a los animales infectados. El follaje deshidratado y molido se incorporó al alimento concentrado que se ofreció a razón de 300 g por animal por día, alimentándolos por la mañana y por la tarde. A partir del día 0, a cinco ovinos, se aplicaron las dosis correspondientes a los tratamientos. Y durante 15 días se tomaron muestras de heces fecales.

6.8. Fase 2: Magnitud de la infección parasitaria

A partir del día 15 los animales que corresponden a los tratamientos con *L. acapulcensis*, recibieron una dosis mezclada en el alimento de consumo. Se tomaron muestras de heces y sangre durante todo el resto del periodo experimental. En el día 46 dos ovinos de cada tratamiento fueron sacrificados e inmediatamente se les retiró el rumen, abomaso e intestino delgado, para colectar los gusanos y el número de parásitos del lumen se contaron tomando 10% de alícuotas, basándose en la metodología reportada por Martínez-Ortiz-de-Montellano, (2010). Las tasas de los parásitos fueron calculadas como el número total de gusanos recuperados en la necropsia divididos entre el número total de larvas L₃, multiplicado por 100.

6.9. Mediciones

Las variables a medir fueron: Ganancia diaria de peso (GDP), consumo voluntario (CV), conversión alimenticia (CA), conteo fecal de huevos (CFH) por técnica de McMaster Modificado (Arece et al., 2004), volumen celular aglomerado (VCA), conteo de eosinófilos periféricos, conteo de nematodos adultos en rumen, abomaso e intestino delgado.

6.10. Análisis de los resultados

El análisis de los resultados se realizó mediante un diseño completamente al azar, con medidas repetidas en el tiempo (PROC MIXED) utilizando el paquete estadístico SAS (2014) y para establecer las diferencias entre tratamientos se hizo una comparación de medias mediante la prueba de Tukey a un nivel de significancia $\alpha= 0.05$.

VII. RESULTADOS

A continuación, se muestran los resultados de esta investigación en un artículo científico, los cuales fueron publicados en la revista Tropical Animal Health and Production. El título de este artículo es: **“Nutraceutic effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep”**

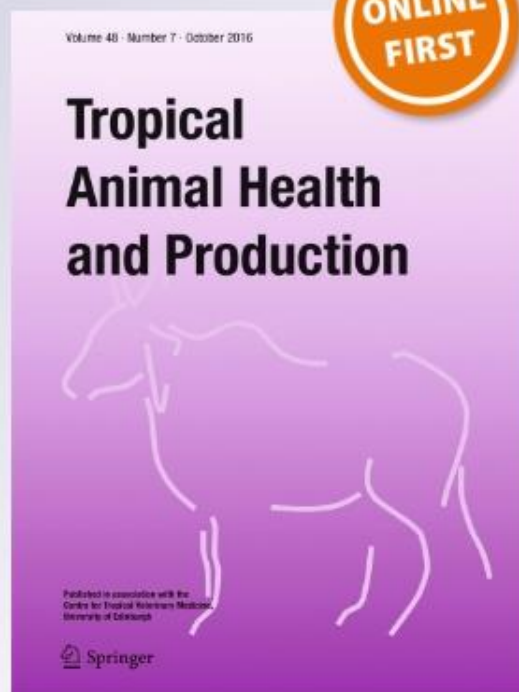
*Nutraceutical effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep*

Cesar García-Hernández, Javier Arece-García, Rolando Rojo-Rubio, German David Mendoza-Martínez, Benito Albarrán-Portillo, et al.

Tropical Animal Health and Production

ISSN 0049-4747

Trop Anim Health Prod
DOI 10.1007/s11250-016-1157-8



 Springer

7.1. Artículo científico

Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer Science +Business Media Dordrecht. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at link.springer.com".



Nutraceutical effect of free condensed tannins of *Lysiloma acapulcensis* (Kunth) benth on parasite infection and performance of Pelibuey sheep

Cesar García-Hernández¹ · Javier Arece-García² · Rolando Rojo-Rubio¹ · German David Mendoza-Martínez³ · Benito Albarrán-Portillo¹ · José Fernando Vázquez-Armijo¹ · Leonel Avendaño-Reyes⁴ · Agustín Olmedo-Juárez⁵ · Carine Marie-Magdeleine⁶ · Yoel López-Leyva²

Received: 12 May 2016 / Accepted: 15 September 2016
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Forty-five Pelibuey sheep were experimentally infested with nematodes to evaluate the effect of three free condensed tannin (FCT) levels of *Lysiloma acapulcensis* on fecal egg counts (FECs), packed cell volumes (PCV), ocular mucosa colors (OMC), average daily gain (ADG), and adult nematode count. Five treatments were used: 12.5, 25.0, and 37.5 mg of FCT kg⁻¹ of body weight (BW); sterile water (control); and ivermectine (0.22 mg kg⁻¹ of BW) as chemical group. The data were processed through repeated measurement analysis. Even though the three FCT doses decreased ($P < 0.05$) the FEC, the highest reduction was obtained with 37.5 mg kg⁻¹ of BW. No differences were observed in PCV and OMC. Higher ADG ($P < 0.05$) was observed with 37.5 mg kg⁻¹ of BW of FCT. The count of adult nematodes (females and males) in the higher dose of FCT was similar to

chemical treatment. Dose of 37.5 mg kg⁻¹ of BW decreased the parasite infection and improved the lamb performance. Therefore, this dose could be used as a nutraceutical product in sheep production.

Keywords Pelibuey · Sheep · Tannins · Nematodes · *Lysiloma acapulcensis* · Ivermectine

Introduction

Actually, the problem of resistance to pharmaceuticals by gastrointestinal nematodes (GIN) has become aggravated, representing one of the principal challenges for parasite control in small ruminants (Torres-Acosta et al. 2012; Arece et al. 2014; Cedillo et al. 2015). As an alternative to this problem, new parasite control methods have been evaluated, highlighting the use of secondary plant components (Olmedo et al. 2014; Kommuru et al. 2015; Saric et al. 2015). Thus, in vivo studies have demonstrated the effectiveness of plants rich in tannins for the reduction of the parasite load (Martínez-Ortiz de Montellano et al. 2009; Debela et al. 2012; Ahmed et al. 2014) and egg excretion by direct affectation of fertility in females (Mupeyo et al. 2011). *Lysiloma acapulcensis* is a perennial tree, which is abundant in the south of Mexico state. Studies have been made to evaluate its nutritive potential (Camacho et al. 2010; Olmedo et al. 2015) and in vitro studies have been made to validate its possible anti-parasitic effects in ruminants (Olmedo et al. 2014). This represents a promising alternative to chemotherapy, especially when it is used as nutraceutical alternative, which combines the effects of a reduction of the parasite infection and a better nutritional status of the animals. Therefore, the objective of the present study was

Rolando Rojo-Rubio
dr_rojo70@yahoo.com.mx

¹ Centro Universitario UAEM Temascaltepec, Universidad Autónoma del Estado de México, Temascaltepec, México, México

² Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", Universidad de Matanzas, Matanzas, Cuba

³ Departamento de Producción Agrícola y Animal, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, México, México

⁴ Instituto de Ciencias Agrícolas, Universidad Autónoma de Baja California, México, México

⁵ Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, México, México

⁶ Unité de Recherches Zootechniques, Centre INRA Antilles-Guyane, Petit Bourg, Guadeloupe, France

to evaluate the effect of different levels of free condensed tannins (FCTs) of *L. acapulcensis* in the diet on parasite infection of experimentally infested sheep and on some bioproductive indicators.

Materials and methods

Location

The study was developed in the Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Cuba. Plant material of *L. acapulcensis* was collected in the southwestern of the State of Mexico, Mexico, with 1740 m asl, and subhumid climate with rains in summer (Aw) (INEGI 2014).

Collection of plant material

For the collection of the plant material, seven sites were delimited in which trees of *L. acapulcensis* were found as part of the natural vegetation. Later, during the morning, the foliage (mature and young leaves) from seven trees was collected on each site; it was taken in a thermal container with artificially cooled temperature and was carried out to the University Center UAEM Temascaltepec (CUT) for chemical analyses. A total of 49 individual samples were collected, which corresponded to seven true replicates.

Processing of the plant samples

At the laboratory, samples were dried in a forced air oven at 48 °C during 72 h until constant weight was reached. Afterward, a pool was made with all the samples to attain homogeneity; then, they were ground in a Willey mill to reach a particle size of 2-mm diameter and were high vacuum packed to be transported to Cuba.

Proximal chemical analysis and fractioning of the tannins in the foliage of *L. acapulcensis*

Dry matter (DM) was determined in the samples (DM, method 934.01) along with ash (CEN, method 942.05), crude protein (CP, method 954.01) (AOAC 1997), neutral detergent fiber (NDF), and acid detergent fiber (ACF) (Van Soest et al. 1991). Condensed total tannins (CTT) were determined using the method of butanol-HCl (Terrill et al. 1992), with the modifications of López et al. (2004). The analysis of free condensed tannins (FCTs) was determined using the method reported by Porter et al. (1986) (Table 1).

Animals and feed

Forty-five Pelibuey male lambs (21.9 ± 1.5 -kg body weight (BW), 6 months of age) were individually housed in pens equipped with shade, feed through an automatic waterer. The lambs were dewormed (Levamisol 10 %® at 7.5 mg/kg of BW, LABIOFAM, Cuba) 12 days before the start of the experiment and were maintained in total enclosure. During the experimental period, all animals received a mixture of fresh fodder ad libitum composed of 50 % of the sugar cane plant (*Saccharum officinarum*, 6 months of age) and 50 % king grass (*Pennisetum purpureum*, clone OM-22, 60 days of regrowth); the fodder was supplied chopped to a particle size of 3 cm. Additionally, all animals were supplemented with 400 g/animal/day of concentrate with 22.3 % of CP (NRC 2007), fractioned in two doses (09:00 and 14:00 h). Every 15 days, adjustments were made to the dietary balance as a function of the live weight of the animals. The Animal Protection Commission and the Scientific Council of the Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey approved all the procedures to be carried out with the animals.

Infective larvae (L₃)

An infested animal (donor) was used with a high parasite load of a mixture of gastrointestinal strongilids (95 % *Haemonchus contortus*, 2 % *Trichostrongylus colubriformis*, and 3 % of *Oesophagostomum columbianum*) and was maintained in a metabolism cage for the collection of feces, which were used to obtain the fecal cultures (Roberts and O'Sullivan 1952) for the collection of infesting larvae. The larvae were identified, quantified, and conserved in refrigeration (8 °C) until the experimental infection.

Treatments, experimental procedure, and measurements

The animals were randomly distributed (Table 2) in five experimental groups: two control groups (positive and negative) and three doses (12.5, 25.0, and 37.5 mg/kg of live weight) of FCT added to the diet every 3 days after the confirmation of an established infection. The doses were calculated based on the concentration of FCTs, for which the animals were offered daily the following amount of fodder of *L. acapulcensis*: 2.14, 3.22, and 6.5 g of DM. After verifying the efficacy of Levamisol 10 %® administered prior to the start of the experiment (12 days), the animals were infested (day zero) with 3000 larvae L₃ of a mixture of GIN previously mentioned.

Fecal egg count

Every 3 days, the feces of each animal were extracted directly from the rectum for fecal egg count (FEC) determination, which

Table 1 Chemical composition and condensed tannin profile (g/kg DM) in leaves of *Lysiloma acapulcensis*

Specie	OM	CP	NDF	ADF	FCT	CT-CP	CT-F	TCT
<i>L. acapulcensis</i>	945.9	177.0	607.3	500.8	116.3	67.8	3.7	187.8

OM organic matter, CP crude protein, NDF neutral detergent fiber, ADF acid detergent fiber, FCTs free condensed tannins, CT-CP condensed tannin-bound crude protein, CT-F condensed tannin-bound fiber, TCT total condensed tannins

was expressed in eggs per gram (EPG) of feces according to the McMaster technique (Arcece et al. 2002).

Packed cell volumes and ocular mucosa colors

Blood was drawn by puncture of the jugular vein and deposited in tubes with EDTA as anti-coagulant for packed cell volumes (PCV) determination by microcentrifugation. Briefly, a capillary was filled and sealed at one end and, after that, was centrifuged at 12,000 rpm during 5 min, and the relative value occupied by the PCV was determined. OMC was determined with the color chart for the detection of anemia FAMACHA®, which has five categories, where one corresponds to an animal with bright red coloration and five to one with pale membranes (Van Wyk and Bath 2002).

Measurement of live weight gain

The animals were weighed every third day using an OHAUS-3370 (100 ± 0.050 kg) scale to determine daily live weight gain, and health status was monitored daily.

Count of adult nematodes

With the approval of the Animal Protection Commission and the Scientific Council of the Estación Experimental de Pastos y Forrajes Indio Hatuey, five animals per group were necropsied to count all adult parasites (male and female) in abomasum.

Statistical analysis

The analysis of the information was performed using SAS® software version 9.1.3 (SAS, 2014) through the Proc Mixed,

Table 2 Description of experimental treatments

Treatment	Description	<i>L. acapulcensis</i> forage
Control	Without treatment	
Chemical	Ivermectine 0.22 mg kg ⁻¹ of BW	
12.5 FCT	12.5 mg kg ⁻¹ of BW of FCT	0.107 g kg ⁻¹ of BW
25.0 FCT	25.0 mg kg ⁻¹ of BW of FCT	0.214 g kg ⁻¹ of BW
37.5 FCT	37.5 mg kg ⁻¹ of BW of FCT	0.322 g kg ⁻¹ of BW

FCTs free condensed tannins, BW body weight

in which three covariance structures were evaluated, and the unstructured (UN) covariance resulted in the best fit. Prior to this analysis, normal distribution of the data and homogeneity of the variance were verified, so it was necessary to transform the percent variable (PCV) through the Arcsin√X and the variable FEC using Log 10 (x + 1). The differences among means were determined with the Tukey test using an error of 0.05 (Steel et al. 1997).

Results

Fecal egg count

The egg count reduction dynamic of GIN when supplemented with dehydrated foliage of *L. acapulcensis* is presented in Fig. 1. The experimental infection was carried out on day “0,” and a prepatent period started on day 18 post-infection for all groups. From this time, different trends of egg count reduction were observed according to the treatment group. The control group showed the highest FEC ($p < 0.05$) with respect to the other treatment groups, which demonstrates the effectiveness in reduction of the parasite infection by this plant.

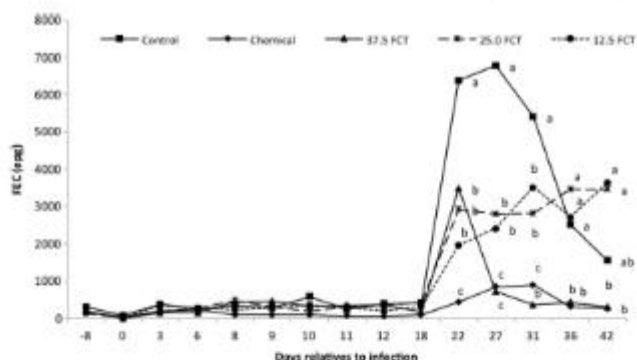
Packed cell volumes and ocular mucosa colors

The principal health indicators monitored during the experiment are presented in Fig. 2. No differences ($p > 0.05$) were observed in any of these indicators during the entire experimental period. The OMC showed little variation during the experimental period and is the result of having PCV values higher than 20 %.

Live weight gain

Live weight gain of the animals throughout the experimental period is shown in Fig. 3. Lambs of the control group presented the worst productive behavior ($p \leq 0.05$), while the best weight gain was found in lambs that received the highest dose of FCT ($p \leq 0.05$) with averages higher than 120 g/animal/day. The low and medium groups of FCT showed similar behavior to that of the chemical group (treated with ivermectine).

Fig. 1 Fecal egg count dynamic in the five experimental groups



Adult nematodes

The adult nematode count in the animals is observed in Fig. 4, where the groups with the lowest doses of FCT had similar amount of parasites as the control, both in male and female parasites. The treatment of 37.5 mg/kg of BW eliminated the adult parasites at the same level as the chemical product.

Discussion

Fecal egg count

This study showed that the highest dose of FCT (37.5 mg/kg⁻¹ of BW) had higher efficacy in the reduction of FEC, with respect to the control group. In addition, a similar trend was observed in the chemical group starting on day 27 post-infection. The intermediate and low doses also reduced the amount of eggs eliminated in feces with lower values. It is probable that higher doses of FCT had better effects on the parasites already established in the abomasum; however, it is also possible that it would have interfered with the absorption of

nitrogen (Min et al. 2003). On the other hand, Olmedo et al. (2015) found a quadratic effect when 2.0, 5.0, and 7.5 g of FCT day⁻¹ were used in sheep during 60 days. In addition, there are studies (Min et al. 2005) that mention that ruminal microorganisms exposed to low doses of condensed tannins have the capacity to adapt to these secondary compounds.

Based on these results, we inferred that for the doses used in the present study, mainly in the group with the highest concentration (37.5 mg of FCT kg⁻¹ of BW), the metabolism of the nutrients does not represent a problem, given that it did not exceed 1 % of the FCT consumption in lambs.

Several studies have demonstrated the effects of the inclusion of tanniferous plants in diets of animals on the establishment and maintenance of parasite infection (Brunet et al. 2008, Manolaraki et al. 2010, Martínez et al. 2013). At present time, this is an important alternative given that anthelmintic resistance represents a threat for an adequate development of sheep production (Torres-Acosta et al. 2012).

In *in vitro* studies, the efficacy of *L. acapulcensis* was demonstrated in the reduction of the hatching capacity of eggs, inhibiting the development of larvae from stages L₁/L₂ to L₃, and also interfered in the migration of L₃ (Olmedo et al. 2014);

Fig. 2 Means of ocular mucosa colors (OMC) and packed cell volumes (PCV) in the five experimental groups

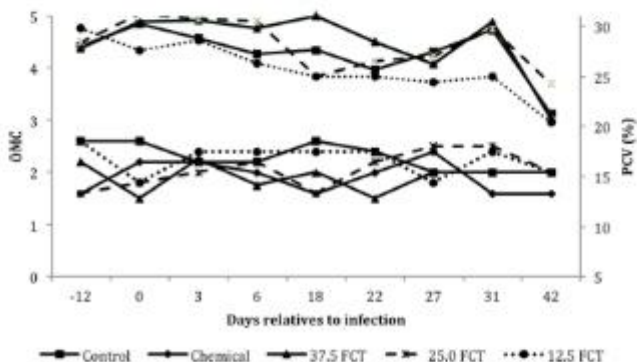
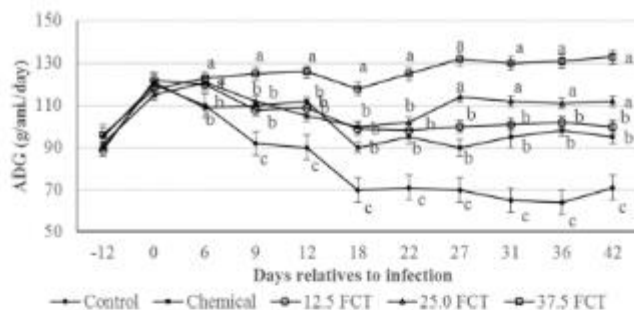


Fig. 3 Average live weight gain in the five experimental groups



these results make possible to deduce the importance of this plant as a potential species for the control of GIN in extensive productive systems of small ruminants.

Brunet et al. (2008) found that supplementation of fresh foliage of *Lysiloma latisiliquum* at doses of 1.4 mg/kg of BW of TCT reduced the establishment of *H. contortus* and *T. colubriformis*, while Martinez et al. (2013) when administered foliage of the same plant found that in doses of 16.12 g/day, there was a dramatic reduction in FEC and also in fertility of females of *H. contortus*. These results, along with those obtained in the present study, demonstrate the effectiveness of supplying plants rich in CT for short periods.

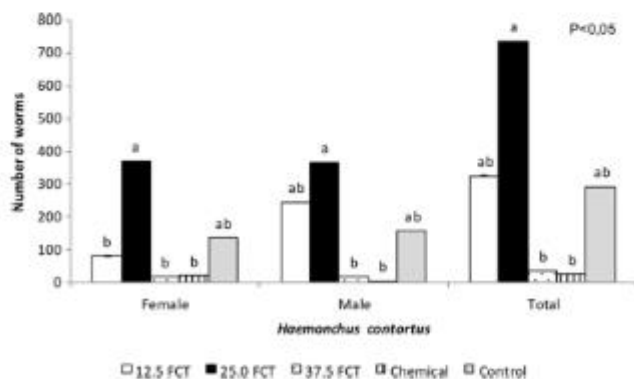
The direct effects are related with structural damage in the adult nematodes that prevented their appropriate feeding, movement, and mating, as was demonstrated by Martinez et al. (2013) in studies using an electronic microscope.

Relative to the efficacy of each group calculated as a function of relative reduction to the control group, it was observed that ivermectine showed an efficacy lower than 95 %, which indicates the presence of low resistance or tolerance to this medication (Coles et al. 1992). On the other hand, the group of animals that received the highest dose of FCT showed an

efficacy on reduction of FEC higher than 80 % after day 22 post-infection, while in the groups of minimum dose (12.5 mg of FCT kg⁻¹ of BW) and median dose (25.0 mg of FCT kg⁻¹ of BW), the efficacy was erratic given that, first, the count was reduced in more than 35 % and reaching values higher than 68 %. However, after 36 days, average fecal counts in these groups were higher than those found in the control group. This behavior is probably the result of a response of the parasites to non-lethal doses that interfered in their feeding and egg-laying capacity but did not eliminate them completely. It is likely that during the period of study, the parasites created adaptation mechanisms which started at day 31, allowing the elimination of eggs through the feces.

In concordance with the present results, a study developed in Brazil reported no effect of the administration of pure marketable extract of *Acacia mearnsii* on the number of adult parasites. However, the viability of the eggs *T. colubriformis* (Minho et al. 2010) was compromised, a variable that was not evaluated in the present study. It is probable that, in addition to the dose used, there are other factors such as the nature of the tannins and its chemical structure (Min et al. 2003) that could interfere with their general biological activity (Hoste et al. 2006, Quijada et al. 2015).

Fig. 4 Adult nematode (*Haemonchus contortus*) count in the five experimental groups



Packed cell volumes and ocular mucosa colors

The values of PCV and OMC observed did not indicate anemia in the animals; thus, the inoculated dose of larvae did not have significant effect on health and the animals maintained hemostasia; furthermore, the physiopathological changes induced in them are directly related to the nutritional plan to which they were subjected. In this sense, Arece et al. (2013) found that under similar conditions, no important variations in health were detected in the animals.

Live weight gain

The weight differences observed are probably related to a better use of the protein in the diet as a result of a greater supply of tannins. In rumen, at pH between 6 and 7, the complexes that form between the FCT and the proteins are stable (Butter et al. 2000) and contribute to protect the proteins from ruminal degradation. The formation of these complexes between the tannins and the dietary proteins or microbial enzymes globally reduces the ruminal proteolysis (Min et al. 2003), favoring the flow toward the abomasum where they are degraded by the gastric juices (HCl) and digestive proteases. This in turn increases the flow of amino acids to the duodenum, which, together with the microbial protein, increases the pool of metabolizable nitrogen compounds, promoting the anabolism of muscular protein.

Probably, if higher doses of FCT were used in the present study, there would be more interference in the use of protein, NDF, and organic matter as a result of the union of the FCTs to the enzymes produced by the ruminal microorganisms, which would also reduce the nitrogen content and consequently would lead to a reduction in the digestion of the potentially degradable fractions (Romero et al. 2000).

The *L. acapulcensis* had 61.9 % of the CT in free form (FCT), similar to those reported by other trees such as *Guazuma ulmifolia* (72.2 %), *Leucaena leucocephala* (73.8 %), and *Gliricidia sepium* (71 %) (López et al. 2004). This caused the possible effects in the formation of complexes with the diet and endogenous protein to be greater (Scull and Savón 2003), which reflected an improved productive behavior of the animals.

Adult nematode count

The present study demonstrates the direct effect of tannins on adult parasites by decreasing the egg-laying capacity on one hand and eliminating adult parasites on the other, as a function of the dose used. In the dose of 37.5 mg of FCT kg⁻¹ of BW, more than 90 % of adult nematodes were eliminated. As previously mentioned, it is probable that this dose caused physical damage to the parasites, preventing their permanence in the digestive system of the animals and caused them to be

eliminated in feces. In the lowest dose, reduction registered in egg count was related to variations in the fertility of the parasites as an adaptation mechanism, as other studies have been shown (Mupeyo et al. 2011).

Conclusion

The dose of 37.5 mg/kg of FCT of the leaves of *L. acapulcensis* eliminated the already established parasites and consequently decreased the elimination rate of eggs. In addition, it improved the live weight gain of the male lambs, which demonstrates a nutraceutical effect.

Acknowledgments This work was undertaken with funds from the Universidad Autónoma del Estado de México (Project UAEM 1026/2014RIFC). Our gratitude also goes to the Mexican National Council for Science and Technology (CONACYT) for the grant received by Cesar García Hernández.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflicting interests.

References

- Ahmed, M., Laing, M.D., Nsahlai, I.V., 2014. In vivo effect of selected medicinal plants against gastrointestinal nematodes of sheep. *Tropical Animal Health and Production*, 46, 411–417
- AOAC, 1997. Official methods of analysis. 16th ed. Assoc. Official Analytical Chemistry, Arlington, VA
- Arece, J., Rojas, F., González, E., Cáceres, O., 2002. Eficacia de labiomec en el parasitismo en ovinos, terneros y equinos en condiciones de producción. *Pastos y forrajes*, 25, 223–229
- Arece, J., López, Y., Molina, M., Alpizar, A., 2013. Cambios fisiopatológicos en ovinos Pelibuey en estabulación, después de infestación experimental con estrongilidos gastrointestinales. *Pastos y Forrajes*, 36, 354–359
- Arece, J., López, Y., Torres-Hernández, G., González-Garduño, R., Rodríguez-Diego, J.G., 2014. Epizootiology of gastrointestinal trichostrongylosis in sheep subject to selective antiparasitic treatments in Cuba. *Pastos y Forrajes*, 37, 442–448
- Brumet, S., Martínez-Ortiz de Montellano, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H., 2008. Effect of the consumption of *Lysiloma latissiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 157, 81–88
- Butter, N.L., Dawson, J.M., Wakelin, D., Buttery, P.J., 2000. Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. *Journal Agriculture Science*, 134, 89–99
- Camacho, L.M., Rojo, R., Salem, A.Z.M., Mendoza, G.D., López, D., Tinoco, J.L., Albarán, B., Montañez-Valdez, O.D., 2010. In vitro ruminal fermentation kinetics and energy utilization of three Mexican tree fodder species during the rainy and dry period. *Animal Feed Science and Technology*, 160, 110–120

- Cedillo, J., Kholif, A.E., Salem, A.Z.M., Elghandour, M.M.Y., Vázquez, J.F., Alonso, M.U., Barbabosa, A., Chagoyán, J.C.V., Reyna, A.G., 2015. Oral administration of Sauce llorin extract to growing lambs to control gastrointestinal nematodes and *Moniezia* spp. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 8, 520-525
- Coles, G.C., Bauer, C., Borgsteede, F.H.M., Geerts, S., Klei, T.R., Taylor, M.A., Waller, P.J., 1992. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*, 44, 35-44
- Debela, E., Tolera, A., Eik, L.O., Salte, R., 2012. Condensed tannins from *Sesbania sesban* and *Desmodium intortum* as a means of *Haemonchus contortus* control in goats. *Tropical Animal Health and Production*, 44, 1939-1944
- Hoste, H., Jackson, F., Athanasiadou, S., Thamsborg, S.M., Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*, 22, 253-261
- INEGI, 2014. Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa, 2014. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, Aguascalientes, Aguascalientes, Mexico, 774 p
- Kommuru, D.S., Whitley N.C., Miller, J.E., Mosjidis, J.A., Burke, J.M., Gujja, S., Mechineni, A., Terrill, T.H., 2015. Effect of sericea lespedeza leaf meal pellets on adult female *Haemonchus contortus* in goats. *Veterinary Parasitology*, 207, 170-175
- López, J., Tejada, I., Vázquez, C., Garza, J.D., Shimada, A., 2004. Condensed tannins in humid tropical fodder crops and their *in vitro* biological activity: part I. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 84, 291-294
- Manolaraki, F., Sotiraki, S., Stefanakis, A., Skampardonis, V., Volanis, M., Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology*, 137, 685-696
- Martínez-Ortiz de Montellano, C., Fourquaux, I., Brunet, S., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2009. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* adults after contact with extracts of two tannin rich plants: *Lysiloma latifolium* and *Onobrychis viciifolia*. In: World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology 2009, Abstract Volume, 8-13 August, Calgary, Canada, pp. 165-166
- Martínez, O.C., Arroyo-López, C., Fourquaux, I., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology*, 133, 281-286
- Min, B.R., Barry, T.N., Atwood, G.T., McNabb, W.C., 2003. The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages: a review. *Animal Feed Science and Technology*, 106, 3-19
- Min, B.R., Hart, S.P., Miller, D., Tomita, G.M., Loetz, E., Sahl, T., 2005. The effect of grazing forage containing condensed tannins on gastrointestinal parasite infection and milk composition in Anjora does. *Veterinary Parasitology*, 130, 105-113
- Minho, A.P., Filippsen, L.F., Amaramite, A.F.T., Abdalla, A.L., 2010. Efficacy of condensed tannin presents in acacia extract on the control of *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Ciencia Rural* 40, 1360-1365
- Muñoz, B., Barry, T.N., Pomroy, W.E., Ramírez-Restrepo, C.A., López-Villalobos, N., Penzhaner, A., 2011. Effects of feeding willow (*Salix* spp.) upon death of established parasites and parasite fecundity. *Animal Feed Science and Technology*, 164, 8-20
- NRC, 2007. Nutrient requirements of small ruminants, sheep, goats, cervids, and new world camelids. (The National Academy Press, Washington, DC)
- Olmedo, J.A., Rojo, R.R., Arece, G.J., Salem, A.Z.M., Kholif, A.E., Morales, A.E., 2014. *In vitro* activity of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on exogenous development stages of sheep gastrointestinal strongyles. *Italian Journal of Animal Science*, 13, 303-307
- Olmedo, A., Rojo, R., Arece, J., Salem, A.Z.M., Morales, E., Albarián, B., Lee, H.A., Vázquez, J.F., 2015. *Lysiloma acapulcensis* extract on digestibility and ruminal fermentation of a diet for sheep. *Ecosistemas Recursos Agropecuarios* 2, 173-182
- Porter, L.J., Hrstich, L.N., Chan, B.G., 1986. The conversion of procyanidins and prodelphinidins to cyanidin and delphinidin. *Phytochemistry* 25, 223-230
- Quijada, J., Fryganas, C., Ropiak, H.M., Ramsay, A., Mueller-Harvey, L., Hoste, H., 2015. Anthelmintic activities against *Haemonchus contortus* or *Trichostrongylus colubriformis* from small ruminants are influenced by structural features of condensed tannins. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 63, 6346-6354
- Roberts, F.H.S. and O'Sullivan, J.P., 1952. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. *Australian Agriculture Research*, 1, 99-108
- Romero, L.C.E., Palma, G.J.M., López, J., 2000. Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles totales y taninos condensados en *Gliciridia septium* en el tropico seco. *Livestock Research and Rural Development*. 12, <http://www.fao.org/ag/aga/agaap/fig/lrrd/lrrd12/4/rome124.htm>. Accessed 29 Aug 2016
- Sarić, T., Rogosic, J., Zupan, I., Beck, R., Bostic, S., Sikic, Z., Skobic, D., Tkalcic, S., 2015. Anthelmintic effect of three tannin-rich Mediterranean shrubs in naturally infected sheep. *Small Ruminant Research*, 123, 179-182
- SAS, 2014. SAS Online Doc Version 9.1.3. Cary: SAS
- Scull, I., Savón, L., 2003. Determinación de polifenoles totales y taninos condensados en harina de forraje de cuatro variedades de *Vigna unguiculata*. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, 37, 403-407
- Steel, R.G.D., Torrie, J.H., Dieck, D.A., 1997. Principles and procedures of statistics. (3rd ed. McGraw Hill Book Co. Inc., New York)
- Terrill, T.H., Rowan, A.M., Douglas, G.B., Barry, T.N., 1992. Determination of extractable and bound condensed tannins concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 58, 321-329
- Torres-Acosta, J.F., Mendoza-de-Gives, P., Aguilar-Caballero, A.J., Cuéllar-Ordaz, J.A., 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*, 189, 89-96
- Van Soest, P.J., Robertson, J.B., Lewis, B.A., 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74, 3583-3597
- Van Wyk, J.A., Bath, G.F., 2002. The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment. *Veterinary Research*, 33, 509-529

VIII. DISCUSIÓN GENERAL

Las hojas de la leguminosa *L. acapulcensis* contienen algunos metabolitos secundarios, principalmente taninos condensados (Camacho et al., 2010). Estos metabolitos han sido ampliamente estudiados sobre la actividad nematicida en rumiantes (Marley et al., 2003; Chagas et al., 2008; von Son-de-Fernex et al., 2012). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran una importante actividad biológica de *L. acapulcensis*; reduciendo significativamente ($P < 0.05$), la eliminación de huevos por gramo de heces. Asimismo, se observó una reducción significativa de vermes adultos en los grupos de ovinos que fueron tratados con las hojas de esta especie vegetal. Este trabajo se refuerza con lo encontrado por Olmedo-Juárez et al. (2014), en ensayos realizados bajo condiciones *in vitro* con algunos nematodos gastrointestinales. Los autores anteriormente citados mencionan que los taninos probablemente están involucrados con la actividad nematicida.

La teoría principal que se le atribuyen a estos metabolitos, es su capacidad de ligarse con las proteínas que se encuentran en la cutícula de huevos (histidina) o larvas (glicoproteína). Sin embargo, en investigaciones recientes se ha reportado una actividad variable de estos metabolitos (Vargas-Magaña et al., 2014), siendo que existen otro grupo de fenoles con la actividad biológica como los flavonoides y derivados del ácido cafeico (von Son-de-Fernex et al., 2015). Por otra parte, se ha reportado que los taninos potencializan su efecto contra los NGI, cuando a estos se les adicionan flavonoides como luteolina y quercertina (Klongsiriwet et al., 2015).

Con respecto a las ganancias de peso vivo, se observó una mejora significativa ($P < 0.05$), en el grupo de ovinos que recibieron 37.5 mg/gk de PV de taninos, lo cual indica que este tipo de compuestos poli-fenólicos, podrían intervenir en los procesos de fermentación dentro del rumen y un posible efecto ligador de la proteína ruminal. Estos resultados se relacionan con lo encontrado por Olmedo-Juárez et al. (2015), quienes encontraron una mejora en la digestibilidad de la proteína cruda en ovinos alimentados con una dieta base adicionada con 5 g de taninos condensados libres. Además, se ha comprobado que este grupo de compuestos mejora la

digestibilidad de los nutrientes (Cardozo et al., 2004) cuando son adicionados a las dietas de los rumiantes a ciertos niveles de inclusión; sin superar el 5% en la ingesta de alimento. Es importante mencionar que los niveles utilizados en nuestro experimento no supero el 1% de inclusión, lo cual se sugiere que podrían usarse niveles superiores con la finalidad de tener un mayor efecto nutracéutico de la leguminosa bajo estudio.

IX. CONCLUSIÓN GENERAL

El uso de este tipo de plantas podría ser una herramienta atractiva para mitigar las nematodiasis de los rumiantes. Los efectos nutracéuticos encontrados en las hojas de *L. acapulcensis* podrían ser importantes para seguir evaluando esta planta. Por lo tanto, se sugieren estudios sobre la elucidación de metabolitos secundarios responsables de la actividad bilógica; mediante estudios bio-dirigidos (*in vitro*), con la finalidad de separar los metabolitos a partir de procesos cromatográficos. Asimismo, se requiere hacer estudios de validación con ovinos infectados con NGI de manera natural, con la finalidad de corroborar el efecto nutracéutico de esta leguminosa.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aguilar, C.A.G., Torres-Acosta, J.F.J., Cámara, S.R. (2009). Importancia del Parasitismo Gastrointestinal en Ovinos y situación actual de la Resistencia Antihelmíntica en México. En: Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico. Compilado por: González Garduño R. y Berumen Alatorre A.C. Universidad Autónoma de Chapingo, C.R.U.S.E. Tabasco, México. pp. 1-11.
2. Aguilar-Marcelino, L. (2012). Microorganismos con uso potencial contra el nemátodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis presentada para obtener el grado de doctor en ciencias. Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo. Montecillo, Texcoco, edo., de México, pp.40-88.
3. Akkari H., Ben Salem H., Gharbi M., Abidi S., Darghouth M.A., (2008). Feeding *Acacia cyanophylla* Lindl. foliage to Barbarine lambs with or without PEG: Effect on the excretion of gastro-intestinal nematode eggs. *Animal Feed Science and Technology*. 147: 182-192.
4. Alonso-Díaz, .M.A., Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval, C.C.A., Hoste H., Aguilar, C.A.J., Capetillo, L.C.M. (2009). Preference of tanniniferous tree fodder offered to sheep and its relationship with *in vitro* gas production and digestibility. *Animal Feed Science and Technology*. 151: 85-85.
5. Andlauer, W., Furst, P. (2002). Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. *Food Research International*. 35: 171-176.
6. Arece, J., Mahieu, M., Archiméde, H., Aumont, G., Fernández, M., González, E., Cáceres, O., Menéndez-Buxadera, A. (2004). Comparative efficacy of six anthelmintics

- for the control of nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. *Small Ruminant Research*. 5(1-2): 61-67.
7. Austin, P.J., Suchar, L.A., Robbins, C.T., Hagerman, A.E. (1989). Tannin-binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. *Journal Chemistry and Ecology*. 15: 1335-1347.
 8. Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., Coop, R.L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology*. 99: 205–219.
 9. Brunet, S., Martínez-Ortíz de Montellano, C., Torres-Acosta, J.F.J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A.J., Capetillo-Leal, C., Hoste, H. (2008). Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*. 157: 81-88.
 10. Bruneton, J. 1999. Tanins. En: *Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Médicinales*. 3th. Edition, pp. 307-404.
 11. Butter, N.L., Dawson, J.M., Wakelin, D., Butter, P.J. (2000). Effect of dietary tannin and protein concentration on nematode infection (*Trichostrongylus colubriformis*) in lambs. *Journal of Agricultural Science*. 134: 89-99.
 12. Camacho, L.M, Rojo R., Salem, A.Z.M, Provenza, F.D., Mendoza, G.D., Avilés, F., et al. (2010). Effect of season on chemical composition and in situ degradability in cows

and in adapted and unadapted goats of three Mexican browse species. *Animal Feed Science and Technology* 155: 206-212.

13. Campos, R.R., Herrera, R. D., Quiroz, R.H., Olazarán, J.S., (1990). Resistencia de *Haemonchus contortus* a los Bencimidazoles en ovinos de México. *Técnica Pecuaria. México* 28: 30-34.
14. Cardozo, P.W., Calsamiglia, S., Ferret, A., Kamel, C. (2004). Effects of natural plant extracts on ruminal protein degradation and fermentation profiles in continuous culture. *Journal of Animal Science* 82: 3230-3236.
15. Carrión, M. (2006). Fase exógena de Strongylidos en pastoreo en el Valle del Cauto. Tesis en opción al Grado de Maestra en Medicina Veterinaria preventiva. Universidad de Granma. Granma Cuba.
16. Chagas, A.C.S., Vieira, L.S., Freitas, A.R., Araújo, M.R., Araújo-Filho, J.A., Aragão, W.R., Navarro, A.M.C. (2008). Anthelmintic efficacy of neem (*Azadirachta indica* a. juss) and the homeopathic product Fator Vermes in Morada Nova sheep. *Veterinary Parasitology*. 151: 68–73.
17. Chandrawathani, P., Yusoff, N., Wan, L.C., Ham, A., Waller P.J. (2004). Total anthelmintic failure to control nematode parasites of small ruminants on government breeding farms in Sabah, East Malaysia. *Veterinary Research Communication* 28: 203-214.
18. Coles, G.C., Jackson, F., Pomroy, W.E., Prichard, R.K., Samson-Himmelstjerna G., Von, S.A., Taylor, M.A., Vercruyse J. (2006). The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Veterinary Parasitology* 136: 167–185.
19. Dakkak, A., Fioramonti, J., Bueno, L. (1981). *Haemonchus contortus* third-stage larvae in sheep: kinetics of arrival into the abomasum and transformation during ruminomasal transit. *Research in Veterinary Science*. 31: 384-385.

20. Drudge J.H., Lyons E.T., Tolliver S.C. (1977). Resistance of equine strongyles to thiabendazole: critical test two strains. *Veterinary Medical Small animal*. 433. 1977.
21. Dynes R., Poppi D., Barrell G., Sykes A. (1998). Elevation of food intake in parasite-infected lambs by central administration of a cholecystokinin receptor antagonist. *British Journal of Nutrition*. 79(1):47–54.
22. Encalada-Mena, L, Tuyub-Solis, H., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de-Gives, P Aguilar-Marcelino, L., López-Arellano, M.E. (2014). Phenotypic and genotypic characterisation of *Haemonchus* pp. and other gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazole in infected calves from the tropical regions of Campeche State, Mexico. *Veterinary Parasitology*. 205: 246-254.
23. Euzéby, J., (1963). *Les Maladies Vermineuses des Animaux Domestiques et Leurs Incidences sur la Pathologie Humaine*, Vigot Freres Editures 23, Rue de l'Ecole-de-Medecine, Paris, France.
24. Fitz-Aranda, J.A., Mendoza-de-Gives, P., Torres-Acosta, J.F.J., Liebano-Hernández, E., López-Arellano, M.E., Sandoval-Castro, C.A., Quiroz-Romero, H. (2015). *Duddingtonia flagrans* chlamydospores in nutritional pellets: effect of storage time and conditions on the trapping ability against *Haemonchus contortus* larvae. *Journal of Helminthology*. 89: 13-18.
25. Frutos P., Hervás G., Ramos G., Giráldez F.J., Mantecón A.R. (2002). Condensed tannin content of several shrub species from a mountain area in northern Spain, and its relationship to various indicators of nutritive value. *Animal Feed Science and Technology*. 95: 215-226.
26. Galina H.M.A., Cuéllar O.A. (2009). Alternativas de control de nemátodos gastrointestinales en ovinos. En: *Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico*. Compilado por: González Garduño R. y Berumen Alatorre A.C. Universidad Autónoma de Chapingo, C.R.U.S.E. Tabasco, México. pp. 21-34.

27. García, M.E. (1986). Apuntes de climatología, 5a Edición. Enriqueta García de Miranda, México, D.F. 155 p.
28. García-Ortiz, N., Aguilar-Marcelino, L., Mendoza-de-Gives, P., López-Arellano, M.E., Bautista-Garfias, C.R., González-Garduño, R. (2015). *In vitro* predatory activity of *Lasioseius penicilliger* (Arachnida: Mesostigmata) against three nematode species: *Teladorsagia circumcincta*, *Meloidogyne* sp. and *Caenorhabditis elegans*. *Veterinaria México*. 2: 1-8.
29. Garretson, D.P. (2007). Role of p-glycoproteins in *Haemonchus contortus* anthelmintic resistance. Master of Science Submitted to the office of graduate studies of Texas A&M University. 115 p.
30. Githiori, J. B., Athanasiadou, S., Thamsborg, S. M. (2006). Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Veterinary Parasitology*. 139: 308–320.
31. González- Garduño, R., Torres, G., Nuncio, M., Cuellar, J., Zermeño O.M. (2003). Detección de eficiencia antihelmíntica en nemátodos de ovinos de pelo con la prueba de reducción de huevos en heces. *Livestock Research for Rural Development*. 15 12-18.
32. González-Garduño, R. (2006). Estudios sobre el control biológico de nemátodos gastrointestinales de ovinos de pelo con el hongo *Duddingtonia flagrans* en Teapa, Tabasco, México. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias. Montecillo, Texoco, Edo. de México. 85 p.
33. Heckendorn, F. 2007. The control of gastrointestinal sheep nematodes with tanniferous forage plants. PhD Thesis of Swiss Federal Institute of Technology, Zurich, Suisse. 73 p.

34. Hertzberg, H., Huwyler, U., Kholer, L., Rehbein, S., Wanner, M. (2002). Kinetics of exsheathment of infective ovine and bovine strongylid larvae *in vivo* and *in vitro*. *Parasitology*. 125: 65-70.
35. Hoste, H., Huby, F., Mallet, S. (1997). Strongyloses gastrointestinales des ruminants: conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques. *Le Point Vétérinaire*. 28: 53–59.
36. Hoste, H., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar-Caballero, A.J., (2008). Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parasite Immunology*. 30:79-88.
37. Hounzangbe-Adote, S. (2004). Propriétés anthelminthiques de 4 plantes tropicales testées *in vitro* et *in vivo* sur les nématodes gastro-intestinaux chez les petits ruminants Djallonké. Université d' Abomey-Calavi, Abomey-Calavi, Bénin.
38. Huby, F., Nano, J.L., Mallet, S., Hoste, H. (1999). Effects of the excretory/secretory products of *Trichostrongylus colubriformis* on the growth of different cell lines. *International Journal for Parasitology*. 29: 697-702.
39. International Federation for Animal Health (IFAH). (2006). Annual Report. 2006. www.Ifohsec.org. Visita: 13/06/ 2011.
40. Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G. Khan, N.M., Afaq, M. (2006). Anthelmintic Resistance The stay of play revised. *Life Science*. 79: 2413-2431.
41. Jackson, F., Miller, J. (2006). Alternative approaches to control-Quo vadit?. *Veterinary Parasitology*. 139: 371-384.
42. Jean-Blain, C. (1998). Aspects nutritionnels et toxicologiques des tannins. *Rev. Méd. Vét.* 149: 911-920.

43. Kahiya, C., Mukaratirwa, S., Thamsborg, S. (2003). Effects of *Acacia nilotica* and *Acacia karoo* diets on *Haemonchus contortus* infection in goats. *Veterinary Parasitology*. 115: 265-274.
44. Klongsiriwet, C., Quijada, J., Williams, A. R., Mueller-Harvey, I., Williamson, E. M., Hoste, 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.
45. Kyriazakis Kyriazakis, I., Anderson, D.H., Oldham, J.D., Coop, R.L., Jackson, F. (1996). Long-term subclinical infection with *Trichostrongylus colubriformis*: effects on food intake, diet selection and performance of growing lambs. *Veterinary Parasitology*. 61: 297-313.
46. Knox, M.R., Torres-Acosta, J.F.J., Aguilar Caballero, A.J. (2006). Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*., 139: 385-393.
47. Larsen, M., (2006). Biological control of nematode parasites in sheep. *Journal Animal Science*. 84: 133-139.
48. López-Arellano, M.E., Mendoza-de-Gives, P. (2011). Importancia de las Parasitosis Internas en Rumiantes Domésticos y Resistencia a los Antihelmínticos. Memorias, XVI Congreso de Producción Ovina y VIII Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico. Villahermosa, Tabasco, México.
49. Luna P., Santamaría, M.E., Berúmen, A.A.C., Gómez V.A., Maldonado, G.N.M., (2010). Suplementación energética y proteica en el control de nematodos gastrointestinales en corderas de pelo. División Académica de Ciencias Agropecuarias, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco, México. Vol. 11 Núm. 07, pp. 2-3.

50. Marley, C.L., Cook, R., Keatinge, R., Barrett, J., Lampkin, N.H. (2003). The effect of birdsfoot trefoil (*Lotus corniculatus*) and chicory (*Cychorium intybus*) on parasite intensities and performance of lambs naturally infected with helminth parasites. *Veterinary Parasitology*. 112: 147-155.
51. Márquez, L. D. (2007). Resistencia a Antihelmínticos en Nematodos de Rumiantes y Estrategias para su Control. Editorial Produmedios, Bogotá, Colombia. 86 pp.
52. Martínez-Ortiz-de-Montellano, C. (2010). Mecanismo de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. Tesis en cotutela presentada para obtener el grado de doctor en ciencias agropecuarias. Université de Toulouse, Universidad Autónoma de Yucatán. Mérida, Yucatán, México. Noviembre del 2010, pp. 3-25.
53. Max, R.A., Wakelin, D., Buttery, P.J., Kimambo, A.E., Kassuku, A.A., Mtenga, L.A. (2003). Potential of controlling intestinal parasitic infections in small ruminants (sheep and goats) with extracts of plants high in tannins, pp 43-56. In: Proceedings of the 2nd DFID. LPP link project (R7798) workshop for small ruminant keepers, Izaa Walto Inn, Embu, Kenya, 4-7 Feb 2003. Smith, T., Godfrey, S.H., Buttery, J.H., and Owen E. (Eds). NRI, Ltd., Kent, UK.
54. Medina, P.P., Berumen, A.A.C., Rodríguez, V.R.I., Torres, A.J.F., Ojeda, R.N.F. (2011). Reporte de resistencia a tres clases de antihelmínticos en un rebaño ovino de Villahermosa, Tabasco. Memorias XVI Congreso Nacional de Producción ovina y VIII Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico., Villahermosa, Tabasco, México, septiembre del 2011.
55. Min, B.R., Hart, S. P. (2003). Tannins for suppression of internal parasites. *Journal of Animal Science*. 81: 102-109.

56. Molan, A.L., Duncan, A.J., Barry, N.T., McNabb, W.C. (2003). Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International*. 52:209-218.
57. Mueller-Harvey, I. 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal Science Food Agricultural*. 86: 2010-2037.
58. Muñoz-Lagunes, A., González-Garduño, R., López-Arellano, M.E., Ramírez-Valverde, R., Ruíz-Flores, A., García-Muñoz, G., Ramírez-Vargas, G., Mendoza-de Gives, P., Torres-Hernández, G. (2015). Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. *Trop Animal Health and Production*. 47: 1049-1054.
59. Niezen, J.H., Charleston, W.A.G., Hodgson, J., Mackay, A.D., Leathwick, D.M. (1996). Controlling internal parasites in grazing ruminants without recourse to anthelmintics: Approaches, experiences and prospects. *International Journal for Parasitology*. 26: 983-992.
60. Nguyen, T.M., Binh, D.V., Ørskov, E.R. (2005). Effects of foliages containing condensed tannins and on gastrointestinal parasites. *Animal Feed Science and Technology*. 121: 77-87.
61. Nuncio O.G.J., Escobedo A.F., González G.R., Morteo, G.R. (2003). Resistencia Antihelmíntica en ovinos de pelo en un rebaño de Centla, Tabasco. *Memorias del segundo seminario sobre producción intensiva de ovinos*. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. Diciembre 2003, pp. 31-32.
62. Nuncio O.G.J., Escobedo A.F., Morteo G.R., Magaña D.M., González G.R. (2005). Resultados Preliminares de la resistencia Antihelmíntica de parásitos gastrointestinales

en ovinos de Tabasco. Memorias del IV Seminario de Producción de Ovinos en el Trópico. Villahermosa, Tabasco, Mexico, pp. 100-109.

63. O'Connor, L.J., Walkden-Brown, S.W., Khan, L.P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*. 142: 1-15.
64. Ojeda R., N.F., Torres A., J.F.J., Aguilar C., A. J., Ayala B., A., Cob., L.A., Sandoval C., C.A., Barrientos., R.C., Mendoza D., G.P. (2008). Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*. 158: 329-335.
65. Olmedo-Juárez, A, Rojo-Rubio, R., Arece, G.J., Mohamed, A. Z. S., Kholif, E. A., Morales, A.E. 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.
66. Olmedo Juárez, A., Rojo-Rubio, R., Arece-García, J., Salem, A.Z.M., Morales-Almaraz, E., Albarrán-Portillo, B., Lee Rangel, H.A., Vázquez-Armijo, J.F. (2015). Extracto de *Lysiloma acapulcensis* en la digestibilidad y fermentación ruminal de una dieta para ovinos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*. 2 (5): 173-182.
67. Paolini, V., Bergaud, J.P., Grisez, C., Prevot, F., Dorchies, P., Hoste, H. (2003). Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 113: 253-261.
68. Paolini, V., Fouraste I., Hoste, H. (2004). *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on third stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology*. 129: 67-77.
69. Ramírez-Restrepo, C.A., Barry, T.N. (2005). Alternative temperate forages containing secondary compounds for improving sustainable productivity in grazing ruminants. *Animal Feed Science and Technology*. 120: 179-201.

70. Ríos de Álvarez, L., Jackson, F., Greer, A., Bartley, Y., Bartley, D.J., Grant, G.J., Huntley, F. (2012). *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Veterinary Parasitology*. 186: 390-398.
71. Rochfort, S., Parker, A.J., Dunshea, F.R. (2008). Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry*. 69: 299-322.
72. Rogers, W.P., Sommerville, R.I. (1963). The infective stage of nematode parasites and its significance in parasitism. *Advances in Parasitology*. 1: 109-171.
73. Romero, L.C.E., Palma, G.J.M., López, J. (2000). Influencia del pastoreo en la concentración de fenoles y taninos condensados en *Gliricidia sepium* en el trópico seco. *Livestock Research for Rural Development* 4(12):1-9.
74. Rosenthal, G.A. (1997). L-Canaline: A potent antimetabolite and anti-cancer agent from leguminous plants. *Life Science*. 60 (19): 1635-1641.
75. Sánchez P.H., Hernández S.F.G, Peralta L.M., Oliva V.A., Reyes G.M.E., Cuellar O.J. A. (2008). Resistencia a antihelmínticos en un biotipo ovino y cuatro razas ovinas del estado de Chiapas. Sanidad. Memorias del congreso nacional de la Asociación Mexicana de Técnicos Especialistas en Ovinocultura A.C. Tuxtla Gutierrez, Chiapas 11 y 12 de septiembre del 2008.
76. SAS, (2014). SAS Online Doc Version 9.1.3. Cary: SAS
77. Sharma, A.m Flores-Vallejo, R.C., Cardoso-Taketa, A., Villareal, M.L. (2016). Antibacterial activities of medicinal plants used in Mexican traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.04.045>
78. Terril, T.H., Rowan, A.M., Douglas. G.B., Barry, T.N. (1992). Determination of extractable and bound condensed tannin concentration in forage plants, protein concentrate meals and cereal grains. *Journal Science for Food Agricultural*. 58: 321-329.

79. Torres-Acosta, J.F.J., Cámara S.R., Pérez C.M., Soto B.N., Chan P.J.I., Aguilar A.J. (2011). Parásitos Resistentes a los Desparasitantes en los Rebaños Ovinos: ¿Cómo Podemos Controlarlos Ahora? Memorias XVI Congreso Nacional de Producción ovina y VIII Seminario Internacional de Producción de Ovinos en el Trópico., Villahermosa, Tabasco, México.
80. Torres-Acosta, J.F.J., Villarroel Á .M.S., Rodríguez A. F., Gutiérrez S. I., Alonso D. M.A., (2003). Diagnóstico de nematodos gastrointestinales resistentes a Bencimidazoles e Imidazotiazoles en un rebaño caprino de Yucatán, México”. Revista Biomédica. 14: 75-81.
81. Urquhart, G.M. (1996) Veterinary parasitology. (2nd. ed.). Oxford, U.K.: Blackwell Science.
82. Vargas-Magaña, J.J., Torres-Acosta, J.F.J, Aguilar-Caballero, A.J., Sandoval-Castro, C.A., Hoste, H., Chan-Perez, J.I. (2014). Anthelmintic activity of acetone-water extracts against *Haemonchus contortus* eggs: interactions between tannins and other plant secondary compounds. Veterinary Parasitology. 206: 322–327.
83. von Son-de Fernex, E., Alonso, D.M.A., Valles, M.B., Capetillo, L.C.M. (2012). *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. Experimental Parasitology. 131: 413-418.
84. von Son-de Fernex, E., Alonso-Díaz, M.A., Mendoza-de-Gives, P., Valles-de la Mora, B., González-Cortazar, M., Zamilpa, A., Castillo-Gallegos, E. (2015). Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. Veterinary Parasitology. 214: 89-95.
85. Waghorn, G. (2008). Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges. Animal Feed Science and Technology.174: 116-139.

86. Wang, S., Ye, X., Rao, P. (2012). Isolation of a novel leguminous lysozyme and study on the antifungal activity. *Food Research International*. 47 (2): 341-347.
87. Waller, P.J., Thamsborg, S.M. (2004). Nematode control in green ruminant production systems. *Trends in Parasitology*. 20: 493-497.
88. Waller P.J., Echeverria, F., Eddi, C., Nari. A., Hansen, J.W. (2006). The Prevalence of antihelmintic resistance in nematodes parasites of sheep in Southern Latin America: General Overview. *Vet. Parasitol.* 62: 181-18.
89. Wolstenholme AJ, Fairweather I, Prichard R, von Samson-Himmelstjerna G, and Sangster NC (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 20:469-476.
90. Zimmer, N., Cordesse, R. (1996). Influence des tannins sur la valeur nutritive des aliments des ruminants. *INRA Production Animale*. 9, 167-179.