



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

CENTRO UNIVERSITARIO UAEM TEMASCALTEPEC

LICENCIATURA EN INGENIERO AGRÓNOMO ZOOTECNISTA

**ACTIVIDAD OVICIDA *in vitro* DE DOS EXTRACTOS HIDRO-ALCOHÓLICOS
(HOJAS Y FRUTOS) DE LA LEGUMINOSA *Caesalpinia coriaria* CONTRA
HUEVOS DE NEMATODOS GASTROINTESTINALES DE RUMIANTES**

TESIS

PRESENTA:

BRÍGIDA MORA EMETERIO

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

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ROLANDO ROJO RUBIO

ASESORES:

DR. AGUSTÍN OLMEDO JUÁREZ

DR. JOSÉ FERNANDO VÁZQUEZ ARMIJO

TEMASCALTEPEC DE GONZÁLEZ, MÉXICO; DICIEMBRE 2016

ÍNDICE

I.INTRODUCCIÓN	11
II.JUSTIFICACIÓN.....	13
III.OBJETIVOS	14
3.1.General	14
3.2.Específicos	14
IV.HIPÓTESIS.....	15
V.REVISIÓN LITERARIA.....	16
5.1.Principales nematodos gastrointestinales que atacan a pequeños rumiantes	16
5.1.1.Género <i>Ostertagia</i>	18
5.1.2.Género <i>Teladorsagia</i>	19
5.1.3.Género <i>Trichostrongylus</i>	19
5.1.4.Género <i>Marshallagia</i>	20
5.1.5.Género <i>Cooperia</i>	21
5.2. Anatomía y fisiología de los nematodos	21
5.3.Descripción del Nematodo <i>Haemonchus.spp</i>	26
5.3.Hospedadores de <i>H. contortus</i> y <i>H. placei</i>	26
5.4.Identificación de los nematodos	27
5.4.1.Técnicas macroscópicas.....	27
5.4.2.Técnicas microscópicas.....	28
5.5.Ciclo de vida	30
5.6.Patogenia	32
5.7.Hemoncosis	32
5.7.1.Hemoncosis aguda	32
5.7.2.Hemoncosis sobreaguda	33
5.7.3.Hemoncosis crónica.....	33
5.8.Signos clínicos	33
5.9.Diferentes áreas climatológicas donde se presenta	34

5.9.1.Hemoncosis en áreas tropicales y subtropicales	34
5.9.2.Hemoncosis en áreas templadas.....	35
5.10.Diagnóstico.....	35
5.11.Resistencia y resiliencia.....	36
5.12.Tratamiento.....	36
5.13.Control.....	37
5.13.1.Control químico.....	37
5.14.Alternativas de control contra los nematodos	40
5.14.1.Control selectivo por la prueba FAMACHA.....	40
5.14.2.Control mediante hongos hematófagos.....	42
5.14.3.Rotación de potreros	44
5.14.4.Selección de genética de animales resistentes.....	45
5.14.5.Control mediante extractos de plantas naturales.....	46
5.15.Características de <i>Caesalpinia coriaria</i>	48
5.15.1.Composición química	50
VI.MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
6.1.Zona de estudio.....	53
6.2.Material vegetativo	54
6.3.Obtención del extracto hidro-alcohólico (HA)	55
6.4.Material biológico.....	56
6.4.1.Obtención de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i>	56
6.5.Confrontación del extracto hidro-alcohólico de <i>Caesalpinia Coriaria</i> contra huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> y <i>haemonchus</i> <i>placei</i>	56
6.5.1.Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus</i> <i>contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	56
6.6.Variable del experimento	58
6.7.Análisis estadístico	58
VII.RESULTADOS	59
7.1. Inhibición de la eclosión de huevos.....	59
VIII.DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN.....	67
CONCLUSIÓN.....	69

IX.BIBLIOGRAFÍA	70
IX.ANEXOS	77

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Página
1	Principales NGI localizados dentro del tracto gastrointestinal del rumiante	17
2	Interpretación diagnóstica y posibles daños ocasionados en las diferentes especies de helmintos o protozoarios identificados en muestras fecales	29
3	Principales propiedades de los antihelmínticos más utilizados en ovinos	38
4	Principales propiedades de los antihelmínticos más utilizados en bovinos	39
5	Clasificación taxónoma de <i>Caesalpinia coriaria</i>	48
6	Composición química de los frutos de especies arbóreas, con base a materia seca (%)	51
7	Composición química del follaje de especies arbóreas, con base a materia seca (%)	52
8	Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de dos especies de nematodos gastrointestinales expuestos a un extracto hidro-alcohólico de hojas y uno de frutos de <i>Caesalpinia coriaria</i>	59
9	Concentraciones letales medias (CL ₅₀) y altas (CL ₉₀) del extracto hidro-alcohólico de hojas de <i>Caesalpinia coriaria</i> , sobre el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemochus contortus</i> y <i>Haemonchu placei</i>	62
10	Concentraciones letales medias (CL ₅₀) y altas (CL ₉₀) del extracto hidro-alcohólico de frutos de <i>Caesalpinia coriaria</i> , sobre el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemochus contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i>	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	<i>Ostertagia circumcincta</i> ; detalle de la bolsa copuladora	18
2	<i>Teladorsagia circumcincta</i> ; extremo posterior del macho	19
3	<i>Trichostrongylus vitrinus</i> : extremo posterior del macho	20
4	<i>Marshallagia marshalli</i> : extremo posterior del macho.	20
5	<i>Cooperia pecctinata</i> : extremo caudal del macho, 100 x	21
6	Anatomía de un nematodo macho del género <i>Ascaris</i>	23
7	Anatomía de un nematodo hembra del género <i>Ascaris</i>	24
8	<i>Haemonchus contortus</i> : extremo anterior.	26
9	Ciclo de vida del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i>	30
10	Localización de la zona de estudio (CENID-PAVET).	53
11	Localización de la zona de estudio del Centro Universitario UAEM Temascaltepec	54
12	Esquema de la obtencion del extracto hidro-alcoholico	55
13	Confrontación de los dos extractos hidro-alcohólicos contra huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i>	57
14	Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i>	57
15	Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> contra diferentes concentraciones de extractohidro-alcohólico de hojas de <i>Caesalpinia coriaria</i> a las 48h	60
16	Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus placei</i> contra	61

	diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de <i>Caesalpinia coriaria</i> a las 48h	
17	Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus contortus</i> contra diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de frutos de <i>Caesalpinia coriaria</i> a las 48h	62
18	Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito <i>Haemonchus placei</i> contra diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de frutos de <i>Caesalpinia coriaria</i> a las 48h	63
19	Concentraciones letales del extracto de fruto de la leguminosa <i>Caesalpinia coriaria</i> sobre la inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i>	66
20	Concentraciones letales del extracto de fruto de la leguminosa <i>Caesalpinia coriaria</i> sobre la inhibición de la eclosión de huevos de <i>Haemonchus contortus</i> y <i>Haemonchus placei</i>	66

RESUMEN

En la actualidad se han comprobado efectos antihelmínticos de algunas leguminosas en forma de extractos, por lo que en el presente trabajo de investigación se evaluó la leguminosa *Caesalpinia coriaria* como extracto hidroalcohólico (EHA), sobre la inhibición de la eclosión de huevos (IEH), contra los nematodos parásitos *Haemonchus contortus* y *H. placei* como modelo biológico.

Posteriormente para la prueba de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) se utilizaron diferentes concentraciones (1.56, 3.15, 6.25, 12.25, y 25 mg/ml) de dos extractos hidroalcohólicos (fruto y hoja) de la leguminosa bajo estudio. Ambos extractos fueron utilizados los modelos biológicos contra *H. contortus* y *H. placei*, en fase de huevo mediante la prueba de inhibición de la eclosión de huevos (IEH). El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de varianza utilizando como modelo estadístico un diseño factorial. Asimismo, se determinaron las concentraciones letales medias (CL₅₀) y altas (CL₉₀) mediante la herramienta PROBIT del sistema SAS (2006). Finalmente las medias de los tratamientos fueron comparadas con la prueba de Tukey a un nivel de confianza del 95 %. Los resultados mostraron que tanto el extracto de hojas como de fruto tuvieron actividad ovicida ($P < 0.05$), inhibiendo la eclosión cerca del 100% con la concentración de 25.00 mg/ml, aunado a un efecto inhibitorio dependiente a la concentración. Ambos extractos de esta leguminosa tuvieron mejores efectos de IEH ($P < 0.001$) sobre *H. contortus* (76%) que *H. placei* (55%). Por otro lado las concentraciones letales (CL₅₀), sobre ambas especies de nematodos, tanto para fruto como hoja fueron; 1.63 y 3.91 mg/ml (fruto vs *H. contortus*), 3.98 y 11.68 mg/mL (hoja vs *H. placei*) respectivamente.

Por consiguiente los resultados obtenidos de ambas pruebas marcan la pauta para evaluar esta planta en otras fases de nematodos parasitos (desarrollo larvario y mortalidad de larvas infectantes) y posteriormente en condiciones *in vivo* en rumiantes infectados artificialmente con nematodos gastrointestinales. Así mismo, es necesario identificar los compuestos que tienen la actividad antihelmíntica de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* para determinar su mecanismo de acción sobre los nematodos gastrointestinales (NGI) y en un futuro utilizar dicha planta como una alternativa de control para contrarrestar los daños y pérdidas productivas que estos ocasionan al desarrollo del sector pecuario.

I. INTRODUCCIÓN

El uso inapropiado de fármacos químicos ha ocasionado problemas de resistencia por parte de los parásitos gastrointestinales en pequeños rumiantes (Arece *et al.*, 2004; Wolstenholme *et al.*, 2004.). Ante esta situación se han llevado investigaciones sobre el uso de plantas naturales que contienen metabolitos secundarios y que ayudan a controlar, principalmente a los nematodos gastrointestinales (NGI) (Torres- Acosta *et al.*, 2012).

En la actualidad existen diferentes estrategias que se han estudiado con el objetivo de encontrar soluciones a la problemática del parasitismo en ovinos. Entre ellos se destacan los relacionados con el uso de plantas con potencialidades antiparasitarias (Athanasiadou *et al.*, 2004; Githiori *et al.*, 2006; Marie-Magdaleine, *et al.*, 2010; Olmedo-Juárez *et al.*, 2014).

Estudios realizados *in vivo* con plantas nativas de diferentes países han demostrado una mejora en la respuesta de los animales ante las infestaciones parasitarias debido a dos efectos fundamentales: 1) efecto directos relacionados con el efecto de algún metabolito secundario de las plantas sobre los parásitos (TC), 2) efecto secundarios que poseen un estrecho vínculo con un incremento de resiliencia en el estado de los animales en el cual se garantiza un efecto directo de mejora en la dieta de esos animales (Kyriazakis, 2010). Por otra parte también se han realizado estudios *in vitro* evaluando el efecto de extractos acuosos de plantas naturales sobre las diferentes fases de desarrollo del parásito hasta la mortalidad de los adultos (Magdeleine M., 2009).

Las plantas son capaces de elaborar una multitud de moléculas orgánicas (glúcidos, lípidos, peptidos, saponinas, alcaloides, poli fenoles, terpenos, esteroides, vitaminas y elementos minerales). Todos estos metabolitos

mencionados son necesarios para su funcionamiento y relación con el medio externo. Entre ellos, los metabolitos secundarios (saponinas, alcaloides, polifenoles, terpenos, esteroides, ácidos y aminas no proteicas, glúcidos cianógenos, y otros heterosidos) son como su denominación lo indica: compuestos que no son indispensables para las funciones principales de la planta.

Estos metabolitos secundarios son actualmente asociados a la defensa de la planta, denotándose entre las principales funciones: contra insectos herbívoros, microorganismos (bacterias, hongos y virus), y contra otras plantas en la competencia por los nutrientes y la luz, la protección contra los efectos nefastos de los rayos ultra violetas, entre otros (Fraenkel, 1969, Wink, 1988).

Dentro de los principales metabolitos secundarios a los cuales se le atribuyen efectos antiparasitarios aparecen los taninos condensados (Wolstenholme *et al.*, 2004).

II. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción de ovinos basados fundamentalmente en la utilización de los pastos, regularmente presentan problemas de parasitosis ocasionados por los nematodos gastrointestinales, situación que limita el aprovechamiento eficiente de los recursos nutricionales de los forrajes. Los nematodos *H. contortus* y *H. placei* son unas de las especies de mayor importancia económica, ya que en la mayoría de las situaciones las infestaciones pasan de forma inadvertida, son los responsables de los bajos comportamientos productivos y reproductivos constituyendo en muchas ocasiones una de las causas principales de muerte (Olmedo-Juárez *et al.*, 2014; Olmedo-Juárez *et al.*, 2015).

Actualmente, se ha reportado que los métodos tradicionales de control no son lo suficientemente efectivos y se ha demostrado la aparición de resistencia a los fármacos por su mal uso en la dosificación para la prevención y tratamiento de enfermedades parasitarias en ovinos.

En las zonas subtropicales de México existen plantas leguminosas con propiedades nutraceuticas dentro de estas se tiene al Cascalote (*Caesalpinia Coriaria*), debido a que ha demostrado ser benéfica en términos y tener efectos en inhibición de la eclosión de huevos (IEH), de NGI y producción animal (Olmedo-Juárez *et al.*, 2014; Olmedo-Juárez *et al.*, 2015). Es por ello que es necesario utilizar alternativas para el control de las parasitosis; dentro de estas alternativas se tienen el uso de plantas con propiedades antihelmínticas.

III. OBJETIVOS

3.1. General

Evaluar la actividad ovicida de dos extractos hidro-alcohólicos (hojas y frutos) de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* contra huevos de nematodos gastrointestinales de rumiantes

3.2. Específicos

- Evaluar el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos (% IEH) a diferentes concentraciones de los extractos hidro-alcohólicos (hojas y fruto) de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*.
- Determinar las concentraciones letales medias y altas de los extractos hidro-alcohólicos (hojas y fruto) de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*.

IV. HIPÓTESIS

Los extractos hidro-alcohólicos de hojas y frutos de la leguminosa Cascalote (*Caesalpinia coriaria*) tiene actividad ovicida contra los nematodos parásitos *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei* dependiente a sus concentraciones.

V. REVISIÓN LITERARIA

5.1 Principales nematodos gastrointestinales que atacan a pequeños rumiantes

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

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

Los NGI de los rumiantes pertenecen a diversas familias y géneros, destacando los siguientes: Trichostrongylidae (*Haemonchus contortus*, *Ostertagia teladorsagia*), las especies de este género se incluían en el género *Ostertagia*, *Trichostrongylus*, *Marshallagia (cooperia)*; Molineidae (*Nematodirus*); Ancylostomatidae (*Bunostomum*) y Strongylidae (*Chabertia* y *Oesophagostomum*). Generalmente las infecciones son mixtas, participando dos o más géneros y varias especies, lo que explica la denominación general de *gastroenteritis* aunque son más frecuentes los *trichustrongilidos* (Cuadro 1).

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

Hospedador	Abomaso	Intestino
Bovino	<i>Ostertagia ostertagia</i>	<i>Cooperia oncophora</i>
		<i>Cooperia punctata</i>
		<i>Nematodirus helvetianus</i>
Ovino/Caprino	<i>Teladorsagia circumcincta</i>	<i>Trichostrongylus columbriformis</i>
	<i>Ostertagia trifurcata</i>	<i>Trichostrongylus vitrinus</i>
	<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Trichostrongylus capricola</i>
	<i>Trichostrongylus axei</i>	<i>Nematodirus fillicolis</i>
		<i>Nematodirus spathiger</i>
		<i>Nematodirus battus</i>
		<i>Marshallagia marshallagia</i>
	<i>Cooperia curticei</i>	

Fuente: (Meana Mañes, A. y Rojo V.;F.A. 1999).

El género más importante sin duda es *Haemonchus contortus* (Rudolphi, 1803), *placei* (Place, 1893) se localizan en el abomaso de ovinos y bovinos respectivamente, este género se caracteriza por el color rojo por la sangre en el intestino y el color blanco de los testículos enrollados en espiral en torno al intestino, los machos llegan a medir entre 10 a 20 mm y las hembras entre 18 a 30 mm. Son hematófagos, en la cavidad bucal tienen una lanceta dorsal con la que erosionan la mucosa gástrica, su cutícula es lisa y provista de papilas cervicales

prominentes. El macho posee una bolsa copuladora muy desarrollada, caracterizada por la asimetría del lóbulo dorsal. La hembra tiene una solapa bulbar muy prominente y de interés morfológico.

5.1.1 Género *Ostertagia*

Las especies de este género se localizan en el cuajar, tienen color pardo por la sangre a medio digerir que se encuentra en su intestino. El tamaño de los machos es de 7-9 mm y el de las hembras es de 10-12mm. La bolsa copuladora está formada por lóbulos laterales y dorsales y otro accesorio dorsal situado simétricamente a los laterales. Las hembras poseen normalmente, la vulva protegida de una lengüeta o solapa muy fina. La especie más importante es *Ostertagia ostertagia*, del ganado vacuno, aunque en ocasiones puede encontrarse en la oveja. Las espículas del macho terminan en tres procesos en forma de flajelo (Meana Mañes, A. y Rojo V.;F.A. 1999). (Figura 1)



Figura 1. *Ostertagia circumcincta*; detalle de la bolsa copuladora (Cordero, 1999)

5.1.2 Género *Teladorsagia*

Teladorsagia circumcincta es la especie más frecuente en todo el mundo, Se localiza en el cuajar del ganado ovino y caprino. Las espículas terminan en un abultamiento grande y en un proceso pequeño y agudo. *Teladorsagia trifurcataes* un polimorfismo de la especie anterior, concretamente la forma anterior menor (tamaño más pequeño, menor desarrollo de las espículas, etc.), (Meana Mañes, A. y Rojo V.;F.A. 1999). (Figura 2)



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

5.1.3 Género *Trichostrongylus*

En este género incluye parásitos en el cuajar e intestino delgado. Son vermes pequeños (5-8 mm), muy finos y de color pardo rojizo, los machos tienen las espículas cortas, robustas y retorcidas. Las especies más frecuentes son: *Trichostrongylus axei*, es la única especie presente en el abomaso y la de menor tamaño, se ha encontrado también en el estómago del cerdo, equinos y hombre.

Trichostrongylus colubriformis vive en el intestino delgado y, a veces en el abomaso de rumiantes, pero también en conejos, cerdo, perro y hombre. *Trichostrongylus vitrinus* se encuentran en el intestino delgado de pequeños rumiantes y en ocasiones en el conejo, cerdo y hombre. *Trichostrongylus*

capricola, este parásito se encuentra en el intestino delgado de cabras y menos frecuente en ovejas, (Meana Mañes, A. y Rojo V.;F.A. 1999). (Figura 3)



Figura 3. *Trichostrongylus vitrinus*: extremo posterior del macho (N. Díez Baños 2006)

5.1.4 Género *Marshallagia*

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

Las espículas son delgadas y sin expansiones terminales. (Meana Mañes, A. y Rojo V.;F.A. 1999). (Figura 4)

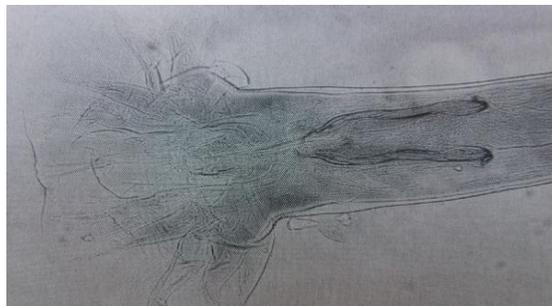


Figura 4. *Marshallagia marshalli*: extremo posterior del macho (N. Díez Baños, 2006)

5.1.5 Género *Cooperia*

Los parásitos adultos de este género, se encuentran en el intestino delgado, son relativamente pequeños, de color rojizo y en el extremo anterior tienen una vesícula cefálica, muy característica. La cutícula presenta estrías transversales muy manifiestas en la región esofágica. Las especies más frecuentes son: *Cooperia oncophora* se presenta principalmente en ganado bovino. *Cooperia punctata* se presenta en el ganado bovino y con menos frecuencia en el ganado ovino. *Cooperia curticei* es la especie de mayor interés en ganado ovino y caprino. (Meana Mañes, A. y Rojo V.; F.A. 1999). (Figura 5)



Figura 5. *Cooperia pectinata*: extremo caudal del macho, 100 x (Cordero, 1999)

5.2. Anatomía y fisiología de los nematodos

Los miembros de este grupo reciben el nombre de gusanos redondos o nematodos, son animales pequeños (muchas de estas especies miden entre 1 mm y 5 cm), son delgados, cilíndricos, no segmentados, y aunque se encuentran recubiertos por una cutícula proteica densa, suelen ser transparentes. Constituyen el grupo más importante de invertebrados pseudocelomados (hay unas 2000 especies descritas), se encuentra en muchos ecosistemas, y el filum incluye a especies de vida libre y especies parásitas.

Las formas parasitas son siempre endoparásitos, suelen poseer unas expansiones cuticulares laterales y aplanadas denominadas alas, un ciclo epidemiológico vital directo o con un hospedador intermediario, e infectan tanto a animales (zoo parásitos) como a vegetales (fito parásitos); casi todos los vertebrados pueden ser hospedadores de estos parásitos. En el extremo cefálico presentan un par de depresiones denominadas afidios que actúan como quimiorreceptores; así mismo, muchas especies tienen en su extremo posterior unos órganos semejantes a los afidios que reciben el nombre de fasmidios. (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003).

Los nematodos carecen de una segmentación y de cilios (excepto en los órganos sensitivos); debido a su falta de músculos circulares y a la existencia de abundantes músculos longitudinales; se mueven generalmente curvándose y retorciéndose, pero nunca avanza con un movimiento de extensión y contracción, como la hacen los gusanos segmentados. Poseen un tubo digestivo completo; presentan alrededor de la boca papilas, labios o cerdas sensoriales, que son estructuras adaptadas a su forma de vida, estas especies de vida libre son generalmente depredadores activos que tienen dientes, y los parásitos intestinales presentan estructuras bucales especializadas (ej. Ganchos), que les permiten la fijación y posteriormente la penetración en la pared intestinal de su hospedador. (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003). Los nematodos se dividen en dos clases. La clase Adenofóridos o Afasmídios, así denominados por carecer de fasmidios, que son unas bolsas sensoriales pequeñas (quimiorreceptores), situadas cerca del extremo posterior de los animales. La otra clase recibe el nombre de Secernétidos o Fasmidios, todas las especies de esta clase poseen fasmidios. Los extremos de estos animales se encuentran normalmente aguzados y en ellos se sitúan, respectivamente, la boca y el ano (el ano suele tener una posición ventral y el cuerpo se continua generalmente en una cola). Muchas especies de vida libre presentan en su extremo posterior un poro de las glándulas caudales; estas glándulas son parecidas a las glándulas adhesivas que poseen los gástricos y rotíferos (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003).

La pared corporal presenta externamente una compleja cutícula que consta de tres capas: la exterior es de un material semejante a la queratina (córtez), la central es una red de fibras esponjosas, que puede presentar en su interior sistemas de soporte (ej. Varillas esqueléticas), y la interior se encuentra constituida por fibras colágenas (figura 6).

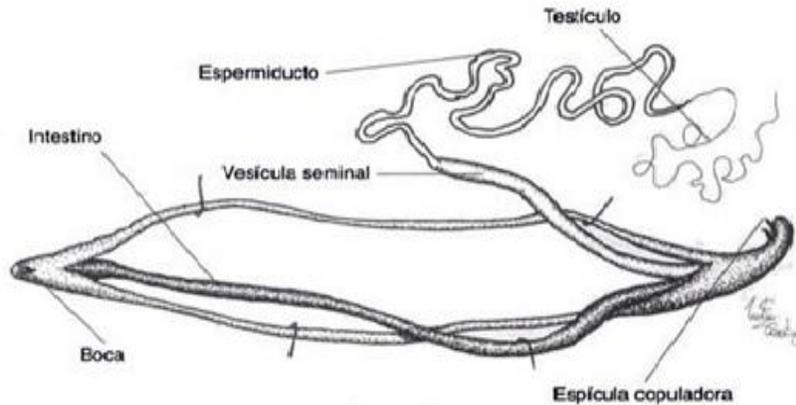


Figura 6. Anatomía de un nematodo macho del género *Ascaris* (Borchert, 1981).

Exteriormente la cutícula puede ser lisa o llevar cerdas, escamas o papilas. Una membrana basal separa la cutícula de la epidermis (hipodermis), de la que produce; la hipodermis presenta una estructura celular o sincitial, esta engrosada en su parte interna formando cuatro cordones, en donde se sitúan los núcleos celulares en los animales de menor tamaño y que reciben en el nombre de cordones hipodérmicos. Los cordones dorsal y ventral (situado uno en el dorso y el otro en la zona ventral) presentan en su interior cordones nerviosos, y los cordones laterales portan los conductos excretores (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003). (Figura 7)

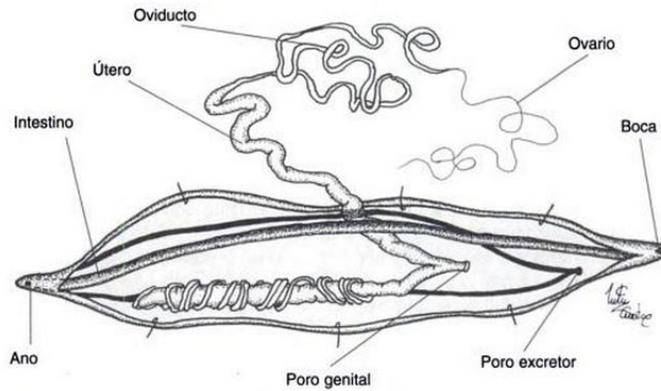


Figura 7. Anatomía de un nematodo hembra del género *Ascaris* (Borchert, 1981).

Los cordones dorsal y ventral (situado uno en el dorso y el otro en la zona ventral) presentan en su interior cordones nerviosos, y los cordones laterales portan los conductos excretores. La cavidad corporal (recibe el nombre de pseudocoel al no estar recubierta por una membrana) no presenta células libres, se encuentra rellena de un líquido relativamente de alta presión hidrostática (la presión del pseudocoel de los nematodos es la más alta encontrada en un animal) que baña los órganos internos y que funciona como un esqueleto (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003).

El aparato digestivo comienza en la boca, alrededor de esta pueden existir órganos accesorios, tales como mandíbulas o dientes (formados por la cutícula). La boca de paso a una cavidad oral o estoma que se continua con una faringe muscular bien desarrollada; posteriormente hay un intestino que en algunas especies puede presentar ciegos intestinales anteriores, un corto recto y finalizar en una cloaca en los machos (suele modificarse para formar órganos copuladores) y en un ano en las hembras (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003).

La comida pasa por el tubo digestivo, gracias principalmente a los movimientos corporales; las glándulas faríngeas y el epitelio del intestino son los encargados de secretar los enzimas digestivos. El aparato excretor es bastante peculiar: carecen de protonefridios y está constituido, en muchos casos, por una o más células

glandulares grandes que se abren en un poro excretor, situado ventralmente en la porción anterior del cuerpo animal, o bien poseen células y canales. La pared corporal es la encargada de regular el contenido hídrico y el transporte de iones.

El principal deshecho (metabólico) nitrogenado producido es amoníaco, que se excreta por la pared corporal y por el tubo digestivo; también puede excretar urea. En el aparato reproductor, las gónadas con forma tubular en las especies parasitas suelen ser largas y enrolladas, pueden ser dobles o únicas y se localizan en el pseudocele. El testículo (la mayoría de los machos suelen tener uno) desemboca por el espermiducto o vaso deferente en la cloaca (algunas especies poseen vesículas seminales y todas tienen glándulas prostáticas en la zona de conexión con el intestino (los espermatozoides son ameboides y no flagelados (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003).

Los óvulos salen del ovario (suelen ser dos, uno anterior y otro posterior) gracias a los oviductos y desembocan en los úteros (hay dos, pueden tener receptáculos seminales y en ellos ocurre la fecundación); éstos se continúan con una vagina hasta desembocar en un gonoporo medio ventral (vulva), situado en la región posterior del cuerpo.

La fecundación es interna, y en muchas especies los machos poseen junto al ano espículas copuladoras. El sistema nervioso está formado por un anillo constituido principalmente por fibras, que se encuentra asociado a varios ganglios y se localiza en torno a la faringe (o esófago); también existe un cordón nervioso dorsal y otro ventral así como cordones epidérmicos laterales (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003).

Tanto en el anillo como en los cordones hay ganglios, desde ellos parten nervios que inervan los diferentes receptores y sistemas corporales. Presentan papilas sensoriales situadas alrededor de la cabeza y de la cola; setas sensoriales (silos) que son mecano receptores. Los miembros de la clase Afidios tienen órganos

sensoriales, de los que la clase recibe el nombre. Carecen del aparato circulatorio y respiratorio, aunque algunas de las especies parásitas poseen hemoglobina en el líquido peri visceral. Muchas especies tienen una gran plasticidad metabólica y pueden vivir tanto en condiciones de aerobiosis como de anaerobiosis (Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. 2003).

5.3. Descripción del Nematodo *Haemonchus.spp*

El nematodo parásito *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei* se localizan en el abomaso y se alimentan principalmente de sangre, por lo que causan grandes pérdidas en la ganadería ovina y vacuna, principalmente en áreas tropicales y sub tropicales. (Figura 8)



Figura 8. *Haemonchus contortus*

5.3. Hospedadores de *H. contortus* y *H. placei*

Los principales huéspedes de *H. contortus* son los pequeños rumiantes entre ellos: ovinos y caprinos. Mientras, que los huéspedes de *H. placei* son los rumiantes de mayor tamaño como los bovinos. Ambas especies de nematodos, se localiza en el abomaso. Las características morfológicas son semejantes al anterior (Place, 1893). Estas especies están distribuidos a nivel mundial, con una gran importancia en áreas tropicales y subtropicales.

5.4. Identificación de los nematodos

Para un correcto diagnóstico de las parasitosis gastrointestinales que afectan a los animales es necesario realizar estudios clínicos de los pacientes o poblaciones animales, así el estudio de las condiciones epidemiológicas es imperante en una región. Esto debe ir acompañado de un diagnóstico de laboratorio apropiado que permita identificar los parásitos gastrointestinales que afectan a los animales. En este capítulo se presentan las principales técnicas de diagnóstico de parásitos en heces para apoyar al profesionalista en la toma de decisiones para los programas de prevención y control de enfermedades parasitaria en los animales (Rodríguez-Vivas y Cob-Galera, 2005).

Los huevos de los nematodos continúan desarrollándose durante el transporte de las muestras, por lo que se recomienda examinarlas lo más frescas posible o refrigerarlas. (Rodríguez-Vivas y Cob-Galera, 2005).

5.4.1. Técnicas macroscópicas

Fundamento

El examen macroscópico de las heces puede revelar en algunos casos la presencia de parásitos adultos (nematodos, trematodos, proglótidos de cestodos, etc.) que son expulsados en las heces de los animales. Además es necesario reportar las características de las heces tales como la consistencia (suave, diarreica, dura), color, presencia de sangre (semidigerida, estrías), moco y el tiempo de haber tomada las heces (Hendrix y Robinson, 2006).

Los nematodos de *Haemonchus contortus* y *haemonchus placei* adultos resultan muy fácilmente identificables por su localización en el abomaso y su gran tamaño (2,0-3,0 cm). En especímenes frescos, en las hembras los ovarios son blancos enrollados en forma de espiral alrededor del intestino repleto de sangre le dan un aspecto rayado (Hendrix y Robinson, 2006).

5.4.2 Técnicas microscópicas

El examen microscópico es fundamental en coprología, para cubrir mayor diversidad de formas parasitarias es recomendable hacerlo en dos etapas complementarias: examen microscópico directo y examen microscópico con alguna técnica de concentración (Besné et al., 2006; Hendrix y Robinson, 2006). El uso de la solución salina fisiológica en vez del agua evita la lisis de trofozoitos de protozoos muy lábiles a los cambios osmóticos (Bowman, 2011).

La técnica directa tiene desventajas tales como: Sólo se puede examinarse una pequeña porción de heces, Es efectiva sólo donde la concentración de huevos es alta, Frecuentemente es difícil identificar los huevos ya que están parcialmente cubiertos por detritus, y no pueden obtenerse resultados cuantitativos. (Rodríguez-Vivas y Cob-Galera, 2005).

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

En el cuadro 2 se pueden observar algunas diferencias entre los diferentes tipos de helmintos a partir de muestras fecales.

Cuadro 2. Interpretación diagnóstica y posibles daños ocasionados por las diferentes especies de helmintos o protozoarios identificados en muestras fecales

Parásito identificado	Detección de oquistes o huevos (por gramo de heces)				No. de parásitos que provocan daño	Pérdidas de carne (Kg)	Pérdidas en litros de leche
	Leve	Ligera	Moderada	Grave			
<i>Eimerias pp.</i>	<300	301-1000	1001-5000	>5000	Desde 300	—	—
<i>Fasciola hepatica</i>	1-5	5-10	11-20	>20	Desde 1	3-10	1-7
<i>Haemonchus spp.</i>	<100	101-300	301-2000	>2000	100	10-20	2-5
<i>Ostertagia spp.</i>	<100	101-300	301-2000	>2000	500	10-25	2-7
<i>Trichostrongylus spp.</i>	<100	101-300	301-2000	>2000	2,000	5-70	---
<i>Cooperia spp.</i>	<100	101-300	300-2000	>2000	200	—	—
<i>Strongyloide spp.</i>	< 100	101-300	301-2000	> 2000	200	—	—
<i>Nematodirus spp.</i>	< 100	101-300	301-2000	> 2000	50	—	—
<i>Trichuris spp.</i>	< 100	101-300	301-2000	> 2000	50	10-20	—

Fuente: (Rodriguez-Vivas, R.I., Cob-Galera, L.A., 2005)

5.5. Ciclo de vida

La mayoría de los NGI tienen ciclo biológico directo, y su fase infectante es la larva o tercer estadio (L₃). (Figura 9)

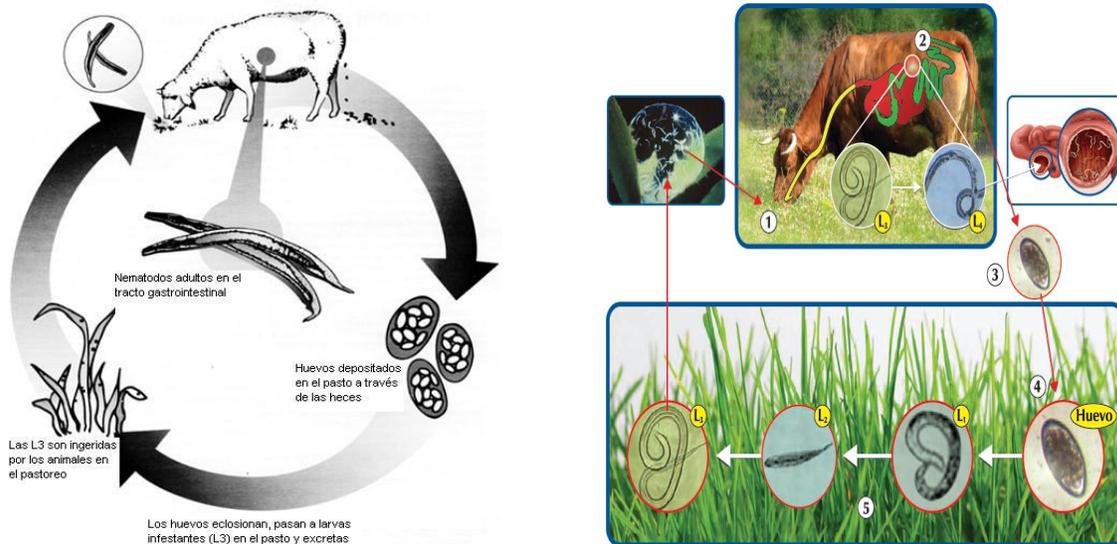


Figura 9. Ciclo de vida del nematodo parásito *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*

Los *trichostrongylinae* son nematodos parásitos localizados en regiones templadas y subtropicales, específicamente *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*.

Los machos adultos miden de 10 a 20 mm y la hembra es de 18 a 30 mm. En estado adulto viven en el abomaso, alimentándose de la sangre de los animales hospederos, a los cuales les ocasiona anemia y diarrea. La duración del ciclo biológico oscila entre los 21 y 28 días.

Las hembras son ligeramente mayores que los machos. Poseen estriaciones longitudinales. El útero se enrolla alrededor del intestino de color rojizo por la sangre ingerida. *Haemonchus placei* específicamente tienen una cavidad bucal

con una lanceta dorsal que sirve para cortar los tejidos del hospedador. Los machos tiene 2 espículas, los huevos miden 45 x 80 micras (Soulsby, 1987).

El ciclo biológico comprende dos fases:

1) Fase exógena:

Los huevos son expulsados junto con las heces de los rumiantes y eclosionan al siguiente estadio (L1) entre 1 y 2 días, después de un breve periodo de inmovilidad o letargo (algunas horas) las larvas sufren una primera muda y cambian su envoltura de queratina, transformándose a larvas de segundo estadio (L2), estas larvas se alimentan de detritus y bacterias, posteriormente de 4 a 6 días evoluciona al tercer estadio (L3), conocida como larva infectante, ya que esta va a infectar a un nuevo hospedero.

Morfológicamente la etapa L3 posee una cubierta de queratina que le ayuda a protegerse de la deshidratación y de otros microorganismos depredadores logrando sobrevivir en la superficie del suelo, la L3 no requiere alimentarse de detritus, debido a que contiene gránulos lipoides que le aportan la energía necesaria por un periodo aproximado de nueve meses, para infectar al hospedero (Hempworth *et al.*, 2006; Martinez, 2007).

2) Fase endógena:

Las L3 infectan a los hospederos durante el pastoreo, ya que estas se encuentran en las gotas de rocío de los pastos, posteriormente la L3 pasa por el tracto gastrointestinal en donde se desprende de su vaina, por estímulos del hospedador como: pH (2 a 4), CO₂, enzimas y temperaturas entre 37-39°C, para poder modificar su morfología y convertirse en el primer estadio endoparasítico denominado cuarto estadio (L4) o larva histiotrófica. Posteriormente, la L4 evoluciona a L5 (aumentando su tamaño de 8 10 veces) a los 10 días de post-infección y presenta características morfológicas específicas de dimorfismo sexual. Una vez terminado el desarrollo, los nematodos adultos poseerán

características sexuales que permitan diferenciar machos (espículas), y hembras (vulva) (Hempworth *et al.*, 2006; Martínez, 2007).

5.6. Patogenia

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

5.7. Hemoncosis

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

5.7.1. Hemoncosis aguda

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

5.7.2. Hemoncosis sobreaguda

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

5.7.3. Hemoncosis crónica

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

La presencia permanente de varios centenares de parásitos ocasiona una pérdida de sangre suficiente para provocar pérdida de peso, debilidad, depresión del apetito y una ligera anemia (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

.

5.8. Signos clínicos

En los casos hiper-agudos, la mayoría de los ovinos y caprinos llegan a morir súbitamente por la gastritis hemorrágica, la hemoncosis aguda se caracteriza por anemia, grados variables de edema, la forma mandibular y la ascitis son las más fácilmente reconocibles, letargia, heces oscuras y caída de lana. No se suele presentar diarrea. La hemoncosis crónica está asociada con pérdida progresiva de peso y debilidad, no suele haber anemia ni edemas manifiestos (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

.

5.9. Diferentes áreas climatológicas donde se presenta

5.9.1. Hemoncosis en áreas tropicales y subtropicales

El desarrollo larvario óptimo de *H. contortus* se produce a temperaturas relativamente elevadas, por lo que es una enfermedad fundamental en el ganado ovino en climas cálidos. La humedad que se mantiene en el interior de las heces y la vegetación es también esencial para la supervivencia de las larvas y su desarrollo, por lo que la frecuencia y gravedad de los brotes de la enfermedad están muy ligados a las lluvias en una zona concreta. Dadas estas condiciones climáticas, la aparición repentina de los nematodos depende de dos factores; primero: la elevada presencia de huevos en las heces, incluso en infestaciones moderadas, puede hacer que se desarrollen rápidamente grandes poblaciones de L3 en el pasto (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

En algunas áreas tropicales y subtropicales como Australia, Brasil, Medio Oriente y Nigeria, la supervivencia de los parásitos esta también asociada con la capacidad hipobiosis de las larvas de *H. contortus*. La supervivencia de *H. contortus* en los pastos tropicales es variable, depende del clima y la cantidad de áreas sombreadas pero las larvas infectantes son bastante resistentes a la desecación y algunas pueden sobrevivir durante 1-3 meses en pasto o en las heces (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

5.9.2 Hemoncrosis en áreas templadas

La información disponible señala que las infecciones se desarrollan en dos sentidos. Posiblemente, el más común es el ciclo sencillo anual. Las larvas infectantes que se han desarrollado de los huevos depositados por los ovinos en la primavera son ingeridas por las ovejas y los corderos al principio del verano. La mayoría de ellas se inhiben en el abomaso como L4 y no completan su desarrollo hasta la primavera siguiente, los signos clínicos de este nematodo se producen durante el periodo de maduración de las larvas hipobióticas y en las ovejas suelen coincidir con los partos (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

5.10. Diagnóstico

Los síntomas son muchas veces suficientes para el diagnóstico del síndrome agudo, especialmente si se complementa con el recuento de huevos en heces. La necropsia es otra alternativa prestando atención a las alteraciones en el abomaso y en la medula de los huesos largos, es también útil. Las alteraciones son evidentes aunque en ovejas que acaban de auto curarse (verde bajo) o están en fase terminal de la enfermedad, la mayor parte de los parásitos pueden haber desaparecido del abomaso (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

En la hemoncrosis sobreaguda puede estar alterado solo el abomaso, ya que la muerte sucede tan súbitamente que los cambios medulares son mínimos. El diagnóstico de la hemoncrosis crónica es más difícil porque se puede confundir con una nutrición deficiente; la confirmación se realiza por la desaparición gradual del síndrome tras el tratamiento antihelmíntico (Barriga, 2002; Cuellar, 2006; Bowman *et al.*, 2011).

5.11. Resistencia y resiliencia

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

La resiliencia es la habilidad que tiene un animal de compensar los efectos negativos del parasitismo, lo cual se refleja en el mantenimiento de los parámetros productivos y reproductivos (Paolini *et al.*, 2005), los ovinos presentan generalmente en forma simultánea alta resiliencia a la hemoncosis. Algunas razas presentan una moderada o baja resistencia con relativamente alta resiliencia, lo cual les permite comportarse productivamente a la par de las que son relativamente resistentes (Alba-Hurtado *et al.*, 2010).

5.12. Tratamiento

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

5.13. Control

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

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

En áreas templadas, las medidas indicadas para el control de las gastroenteritis parasitarias en ovejas suelen ser suficientes para prevenir brotes de hemoncosis. En la actualidad se están realizando pruebas para determinar la eficacia de una vacuna recombinante basada en una glucoproteína de las microvellosidades intestinales de los estadios de *H. contortus* para su control.

5.13.1 Control químico

El control y la profilaxis de los tricostrongilidos se deben contemplar un conjunto de acciones que combinen los tratamientos antihelmínticos estratégicos con prácticas de pastoreo que limiten los riesgos de infección (Caudro 3).

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

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

Fuente:(A. Meana Mañes y Rojo Vásquez 1999)

La utilización masiva y reiterada de antihelmínticos ha favorecido el desarrollo de cepas resistentes a ellos, que complican el control de los tricostrongilidosis, sobre todo en los ovinos. Está muy relacionada con la utilización de los benzimidazoles y otros grupos farmacológicos más antiguos, como la fenotiacina o los imidazotiazoles, (A. Meana Mañes y Rojo Vásquez 1999).

También es importantes, la administración frecuente, el uso repetido del mismo fármaco o grupos de antihelmínticos, y la administración de dosis sub terapéuticas (Cuadro 4).

Cuadro 4. Principales propiedades de los antihelmínticos más utilizados en bovinos.

Grupo y nombre	Dosis mg/kg	Vía de administración	Actividad		supresión	
			L	Lh	leche	carne
Benzimidazoles						
Tiabendazol	25.0	Oral	+	+	0	0
Albendazol	7.5	Oral	+	+	3	14
Febendazol	7.5	Oral	+	+	3	14
Oxfendazol	5.0	Oral	+	+	5	5
Probenzimidazoles						
Febantel	7.5	Oral	+	+	2	8
Tiofanato	50.0	Oral	+	+	3	7
Netobimín	7.5	Oral	+	+	4	10
Imidazotiazoles						
Levamisol	45.0	Oral	+	+	1/2	
			-		3/7	
Pouronintramsubcut						
Morantel	10.0	Bolo	+	+	0	0
Lactonasmacrociclicas						
Ivermectina	0.2	Subcutánea	+	+	NA	21
Moxidectina			+			
Doramectina						

Fuente: (A. Meana y Rojo Vásquez 1999)

5.14. Alternativas de control contra los nematodos

5.14.1 Control selectivo por la prueba FAMACHA

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

Dentro un rebaño existe una proporción de individuos completamente susceptibles mientras que otros muestran distintos grados de resistencia o tolerancia a los nematodos. La utilización de modelos matemáticos permitió desarrollar la hipótesis de que la resistencia antihelmíntica puede ser dilatada en el tiempo, tratando solo aquellos animales afectados severamente por los nematodos (Barger, 1985). En este caso el refugio de la población sin tratar (larvas en la pradera aportada por los animales no tratados) será el encargado de "diluir" las poblaciones de los nematodos resistentes. Sobre este principio fue desarrollada la técnica de **FAMACHA**, que visualiza los distintos niveles de anemia producida por *H. contortus* a través de la coloración ocular de los ovinos. (Van Wky *et al.*, 1997). Como **FAMACHA** solo detecta anemia, como una manifestación del efecto de *Haemonchus contortus* es una medida de resiliencia que de resistencia (Bisset, 2000a).

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

Hansen, 1999). Esta escala se ha desarrollado de acuerdo a estudios de correlación entre el hematocrito y la coloración de la mucosa (Malan *et al.*, 2000).

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

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

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

Las consecuencias epidemiológicas de la FAMACHA es que disminuye la presión antihelmíntica sobre el total de los parásitos, permitiendo aumentar gradualmente

la proporción de animales resistentes/resilientes, si se incluye un plan de selección/refugio de los animales evaluados, combinando con otras estrategias de control que se puede combinar de forma diferida con cualquier otra estrategia demanejo, por ejemplo el pastoreo rotativo luego de un pastoreo diferido para el control de *H. contortus*.

5.14.2 Control mediante hongos hematófagos

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

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

Destinado a combatir los estados libres de nematodos que se encuentran en la materia fecal de los ovinos, caprinos, equinos y cerdos (Larsen, 1999; Mendoza de Gives et al., 2010). La utilización estratégicas de clamidosporas de *D.flagransen* el alimento, luego el pasaje por el tracto gastrointestinal, esto produce una red de aspecto tridimensional, que atrapan a las larvas y las destruyen. Se estima que la aplicación correcta de este tipo de tecnología no producirá una eliminación total de

la población larvaria, pero permite un gradual aumento de la inmunidad con una menor dependencia de los antihelmínticos (Barnes *et al.*, 1995).

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

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

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

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

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

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

5.14.3 Rotación de potreros

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

5.14.4 Selección de genética de animales resistentes

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

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

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

Los animales resistentes tienen la habilidad de resistir al establecimiento y posterior desarrollo de la infección parasitaria, mediante procesos inmunitarios; los individuos resistentes a las infecciones parasitarias tienen la capacidad de albergar o soportar un cierto número de larvas, disminuyendo el nivel de producción de huevos dentro del abomaso.

5.14.5 Control mediante extractos de plantas naturales

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

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

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

Dentro de otras alternativas de medicina natural para el control de parásitos que están empezando a ser consideradas en las iniciativas de investigación se destacan, el árbol del Mamey, *Mammea americana*, nativo del caribe, el cual

tradicionalmente se ha usado en la región para el tratamiento de enfermedades parasitarias de la piel y recibió recientemente la evaluación en el laboratorio demostrando un efecto acaricida (Oliveros *et al.*, 1996).

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

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

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

El cambio conceptual se refiere a dejar de creer que los productos químicos son una fuente inagotable y que son las únicas alternativas para el control de los parásitos del ganado. En este sentido, se requiere una constante de acción de extensión vinculación y conocimiento por parte de instituciones y centros de investigación hacia los ganaderos.

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

5.15 Características de *Caesalpinia coriaria*

Las leguminosas habitan en zonas templadas, tropicales y áridas, en sabanas y algunas pocas especies incluso son acuáticas. Sin embargo, son más numerosas en las zonas tropicales y subtropicales. Esta familia incluye tipos diversos como hierbas, arbustos, bejucos y árboles. La familia Leguminosae comprende alrededor de 650 géneros y 18, 000 especies (Polhill, 1981); esta es una de las seis familias de angiospermas más diversas que existen (Rzedowski, 1998; Sosa y Dávila, 1994). En México, después de las compuestas, las leguminosas constituyen la segunda familia más grande de plantas fanerógamas (Sousa y Delgado, 1998).

Cuadro 5. Clasificación taxónomica de *Caesalpinia coriaria*.

Dividivi-Cascalote	
Taxonomía	
Reino:	<i>Plantae</i>
Subreino:	<i>Tracheobionta</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Subfamilia:	<i>Caesalpinioideae</i>
Tribu:	<i>Caesalpinieae</i>
Género:	<i>Caesalpinia</i>
Especie:	<i>Caesalpinia coriaria</i>



Fuente: Árboles de Centroamérica IRENA (1992)

Los árboles alcanzan típicamente 5-7 m, ocasionalmente hasta 12 m. Es un árbol perennifolio, sin espinas y que no fija nitrógeno. Su forma es variable y a menudo produce troncos múltiples, bifurcándose desde la base y produciendo una copa irregular, grande y extendida con numerosas ramillas. Los tallos principales a menudo están torcidos pero también pueden tener buena forma. La corteza externa es marrón chocolate, ligeramente café o gris, áspera y muy fisurada, con placas escamosas gruesas e internamente rosadas y amargas.

Las hojas son compuestas, bipinnadas, de 10-15 cm de longitud, con 3-10 pares de pinas y una pina terminal, con 10-28 pares de pequeñas hojuelas de 4-8 mm de longitud. Las hojuelas son lineales y oblongas, con ápice obtuso, base subacorazonada, y generalmente con puntos negros en el envés.

Las pequeñas flores (5-10 mm de diámetro) tienen pétalos de un amarillo cremoso o verde pálido, y se disponen en racimos cortos, simples o compuestos. Las vainas no se abren naturalmente y tienen de 3-6 cm de longitud, son oblongas, gruesas, carnosas y coriáceas. De color verde cuando aún no están maduras, se vuelven marrón oscuro cuando lo están, convirtiéndose en formas variables y caprichosas, enroscadas en forma de S.

El polvo amarillento que rodea las semillas dentro de las vainas contiene un 50% de tanino. Este polvo se comercializa internacionalmente con el nombre de "dividivi", aunque su comercio es hoy mucho menos importante de lo que solía ser. Los taninos pueden usarse para curtir cuero, y compuestos relacionados de las vainas y la corteza pueden usarse para preparar tintes azules y negros para cuero y lana.

5.15.1 Composición química

De acuerdo a experimentos ya realizados se llega a la conclusión que la leguminosa *Caesalpinia coriaria* tiene un contenido de taninos en los frutos de 56.6% del tipo hidrolizable y 7.5% de taninos catequínicos, coincidiendo el valor de taninos hidrolizables dentro del rango de taninos (Carretero, 2000), otros autores, señalaron un contenido total de taninos en los frutos de *C. coriaria* de 20 a 40%, sin embargo, no se mencionan el tipo de taninos encontrados (López de Lara, 1984).

Dentro del aspecto forrajero en algunos sitios de estudio predomina el tipo de vegetación de selva baja caducifolia, compuesto principalmente por especies arbóreas y arbustivas leguminosas, las cuales representan una fuente de alimento para el ganado en pastoreo, el cual consume los frutos, principalmente en la época seca, dentro de los géneros se encuentran *Acacia*, con especies como *A. acatensis*, y *A. macracantha*, con contenidos de proteína en base seca de 13.22 y 13.75%, respectivamente, este último valor superior a lo señalado por (Casado et al., 2001) quienes indicaron valores de 12.93%. Otras especies presentes en el área de estudio son *Caesalpinia coriaria*, *C. esclerocarpa* y *C. platyloba*, con bajos contenidos de proteína (4.84, 5.57 y 8.01%), respectivamente, valores inferiores a los reportados por (Roncallo et al., 1996) y (Godier et al., 1994), quienes obtuvieron valores de proteína cruda de 6.0 y 6.90% para *Caesalpinia coriaria*. En general los contenidos de proteína de la mayoría de las especies están por arriba del nivel aceptable de 6% para vacunos en mantenimiento (NCR, 1981). Los valores de fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA), fueron los más bajos para *C. coriaria* (8.18 y 10.30%), respectivamente, lo cual nos indica su alta digestibilidad al ser consumida por el ganado, valores inferiores a los señalados por (Cecconello et al., 2003), quienes indicaron valores para esta especie de 18.12 y 13.63% para FDN y FDA, respectivamente, sin embargo para

la especie de *Acacia macracantha* los valores encontrados en este estudio fueron más altos a los señalados por estos mismos autores (45.70 y 36.96%) contra 35.59 y 34.80% para FDN y FDA, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6 Composición química de los frutos de especies arbóreas, con base a materia seca (%)

ESPECIE	MS	PC	GRASA	CENIZAS	E.L.N.	FDN	FDA
<i>Acacia acatlensis</i>	100	13.22	1.89	6.98	32.49	64.90	52.84
<i>Acacia macracantha</i>	100	13.75	0.73	4.46	45.15	45.70	36.96
<i>Aacacia sp</i>	100	14.74	1.31	4.45	46.82	49.12	42.61
<i>Aesalpinia coriaria</i>	100	4.84	0.20	2.58	88.82	10.30	8.18
<i>C. platyloba</i>	100	8.01	3.40	5.38	28.45	76.62	50.52
<i>C. sclerocarpa</i>	100	5.57	0.32	2.93	80.65	68.97	43.12
<i>lysiloma divaricata</i>	98.65	13.39	1.33	5.45	84.21	43.93	31.39

MS = materia seca, PC = proteína cruda, ELN = extracto libre de nitrógeno; fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA).

Por otra parte el follaje también es utilizado en ramoneo por los animales en pastoreo, representando un recurso de alimento fresco durante la época seca, podemos observar en el cuadro 3, que los valores más altos en contenido de proteína cruda están representados por dos especies de la familia *Leguminosae*, con porcentajes altos de (22.04 y 20.16%) para *Erythrina lanata* y *Lysiloma microphyllum*, coincidiendo con (Clavero 1996), el cual indicó la importancia que tienen las leguminosas por su alto contenido de proteína, generalmente mayor del 18%, sin embargo existen otras especies con valores menores caso de la *Caesalpinia coriaria* cuyo contenido de proteína cruda presenta valores similares a los reportados por (Matteucci y Colma, 1997) en un estudio realizado en Venezuela donde encontraron valores de proteína cruda del follaje de 12.50%, fibra cruda de 10.30% inferior al nuestro que fue de 15.91%, probablemente se deba a la

madurez del follaje analizado, en cuanto al extracto libre de nitrógeno tuvimos valores más altos (68.85 vs 65.00%)

Cuadro 7. Composición química del follaje comestible de especies arbóreas, con base a materia seca (%)

ESPECIE	MS	PC	GRASA	CENIZAS	E.L.N.	FDN	FDA
<i>Caesalpinia coriaria</i>	95.01	12.81	0.76	3.79	38.19	46.36	31.01
<i>Erythrina lanata</i>	56.82	22.04	4.10	8.27	37.37		
<i>Hura polyandra</i>	92.54	9.10	3.76	9.14	52.18	39.34	35.41
<i>lysiloma microphyllum</i>	96.56	20.16	2.91	4.69	44.84		
<i>Pseudobombax ellipticum</i> (flor)	97.83	13.18	1.63	8.06	53.26	53.04	48.42
<i>Spondias purpurea</i>	97.26	14.59	1.51	9.73	58.35	48.34	46.38

MS = materia seca, PC = proteína cruda, ELN = extracto libre de nitrógeno; fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Zona de estudio

El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Helminología, en las instalaciones del Centro Nacional de Investigación, Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET), del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Ubicado en la Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla No. 8534 Col. Progreso, C.P Jiutepec, Morelos / A.P. 206 CIVAC y en el laboratorio de Nutrición Animal del Centro Universitario UAEM Temascaltepec ubicado en la carretera Toluca-Tejupilco Km. 67.5, Barrio de Santiago, 51300 Temascaltepec de González, Méx. (figura 10).



Figura 10. Localización de la zona de estudio (CENID-PAVET).

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

Las instalaciones del laboratorio de Nutrición Animal del Centro Universitario UAEM Temascaltepec se ubican en las coordenadas geográficas 100°02' longitud oeste y 19°03' de latitud norte. A una altura de 1,740 metros sobre el nivel del mar, La temperatura media anual oscila entre los 18°C y 22°C. La precipitación pluvial anual va de los 800 a los 1,600 milímetros (Figura 11).

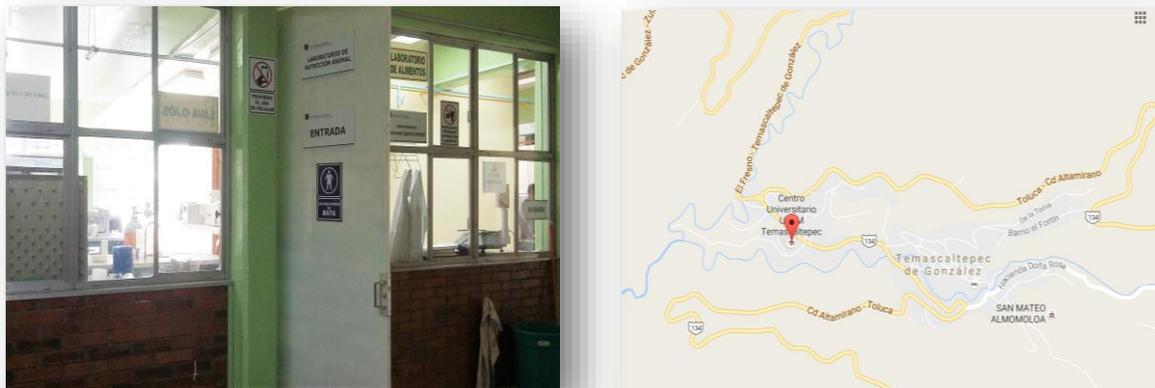


Figura 11. Localización de la zona de estudio del Centro Universitario UAEM Temascaltepec.

6.2 Material vegetativo

Se colectaron hojas frescas (jóvenes y maduras) y frutos de cascalote *Caesalpinia coriaria* de la comunidad de el Salitre Palmarillos municipio de Amatepec, Estado de México localizada a una altitud de 800 metros sobre el nivel del mar, se almacenaron y trasladaron en refrigeración a 4°C para evitar cambios en su composición (Salem *et al.*, (2006). Posteriormente se sometieron a un proceso de secado bajo la sombra durante una semana y finalmente tanto las hojas y frutos se molieron en un molino semi-industrial a un tamaño de partícula de 1 mm.

6.3 Obtención del extracto hidro-alcohólico (HA)

Se utilizaron 100 g de hojas secas en sombra, y 100 g de frutas secas, se sometieron a un proceso de maceración con una mezcla de agua y metanol (70:30 v/v) durante 24 horas, posteriormente se filtró la solución mediante diferentes filtros, utilizando (gasa, algodón y papel filtro) con la finalidad de obtener un extracto libre de material vegetal.

Una vez obtenido el extracto, se congeló a $-42\text{ }^{\circ}\text{C}$ y finalmente se procedió a un proceso de liofilización. El extracto liofilizado fue congelado para su posterior uso (Salem *et al.*, 2006). (figura 12)

Figura 12. Esquema de la obtención del extracto hidro-alcohólico.



Recolección de
hojas



Secado de hojas y frutas
en la sombra



Muestra
macerándose



Filtración del
extracto



Proceso de
liofilizado



Extracto
liofilizado

6.4 Material biológico

6.4.1 Obtención de huevos de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*

Se utilizaron huevos de *H. contortus* y *H. placei* obtenidos a partir de un ovino y un bovino donador respectivamente; ambos infectados de manera experimental. Los huevos de *H. contortus* y *H. placei* fueron concentrados mediante el paso a través de diferentes tamices (400, 350 y 200 mm de diámetro) y lavados con sacarosa al 40 %, para su posterior uso (ver anexo 1).

6.5 Confrontación del extracto hidro-alcohólico de *Caesalpinia Coriaria* contra huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*

6.5.1 Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei* bajo condiciones *in vitro*.

Se utilizaron placas de microtitulación de 96 pozos, con cuatro repeticiones (n=4). Los tratamientos fueron las concentraciones de los extractos hidro-alcohólicos de hoja y fruto de *C. coriaria* (25.00, 12.50, 6.15, 3.12 y 1.56 mg/ ml), adicionalmente se utilizó metanol al 4% como control negativo (C-). A cada pozo se le depositaron 100 ± 10 huevos/ 50 μ l y 50 μ l de los tratamientos, según correspondía utilizando un volumen total de 100 μ L (Figura 13).



Figura 13. Confrontación de los dos extractos hidro-alcohólicos contra huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*.

Posteriormente, las placas fueron incubadas a 28 °C, durante 48 horas y en seguida procedió a contar cada pozo tomando 10 alícuotas de 5 µl. El porcentaje de inhibición de huevos fue calculado mediante la siguiente formula: $((\text{número de larvas} / (\text{número de larvas} + \text{número de huevos})) * 100$ (Figura 14), (ver anexo 2).



Figura 14. Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*.

6.6 Variables del experimento

Las variables de este experimento fueron: el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos expuestos a los diferentes tratamientos del extracto de hoja y vaina de *Caesalpinia Coriaria*.

6.7 Análisis estadístico

$$Y_{ijkl} = u + i + j + k + (i * j * k)_{ijk} + l$$

Y_{ijkl} = variable dependiente

u = media

i = nematodo

j = extracto

k = concentraciones

l = error

Los datos se sometieron a un diseño trifactorial, en donde la variable dependiente del porcentaje de inhibición de la eclosión es (Y_{ijkl}), cuyo modelo estadístico es $Y_{ijkl} = u$ media general + i nematodo + j extracto + k concentración (nematodo*extracto*concentracion) $_{ijk}$ + l error.

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial, donde los factores fueron: Extracto (hoja y fruto), Nematodo (*H. contortus* y *H. placei*) y Concentración (0, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50 y 25.00 mg/mL). Finalmente se determinó la comparación de medias con el procedimiento Tukey a un nivel de confianza del 95 %. Se usó el paquete estadístico SAS 9.0 (SAS, 2006)

VII. RESULTADOS

7.1. Inhibición de la eclosión de huevos

En el cuadro 8, se observan los resultados de la inhibición de la eclosión de huevos de ambos nematodos bajo estudio. Existe un efecto dependiente a la concentración para ambas especies de nematodos, donde la concentración de 25.00 mg/ml inhibió cerca del 100% la eclosión de huevos. Por otra parte, se observa una diferencia estadística ($P < 0.0001$) entre los extractos de hoja y fruto con 79 y 52% de IEH respectivamente. Asimismo, se observaron diferencias estadísticas entre especies de nematodos ($P < 0.0001$), resultando que tanto el extracto de hoja y fruto de *C. coriaria*, inhibieron el 76% de eclosión de huevos en *H. contortus* y 55% en *H. placei*.

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de dos especies de nematodos gastrointestinales expuestos a un extracto hidro-alcoholico de hojas y uno de frutos de *Caesalpinia coriaria*.

EXTRACTO	CONCENTRACIÓN (mg/ml)	Inhibición de la eclosión de huevos (%)	
		NEMATODO	
		<i>Haemonchus contortus</i>	<i>Haemonchus placei</i>
FRUTO	25.00	100 ^a	100 ^a
	12.50	100 ^a	100 ^a
	6.25	99.5 ^a	92.75 ^a
	3.15	89.25 ^a	33.75 ^{cd}
	1.56	58.75 ^b	17.75 ^e
HOJA	25.00	95.25 ^a	92.50 ^a
	12.50	90.00 ^a	60.75 ^b
	6.25	60.00 ^b	22.75 ^{de}
	3.15	40.75 ^c	19.75 ^{de}
	1.56	27.50 ^{cde}	16.25 ^e
Extracto			<0.0001
Nematodo			<0.0001
Concentración			<0.0001
Extracto*Nematodo			0.8977
Extracto*Concentración			<0.0001
Extracto*Nematodo*Concentración			<0.0001
EEM			0.10

EEM= Error estándar de la media. Medias dentro de la misma columna y fila con distinta literal estadísticamente difieren ($P < 0.05$)

7.2. Inhibición de eclosión de huevos *H. contortus* *H. placei* del extracto hojas

En la figura 15 se observan los resultados de IEH correspondientes al extracto de hoja contra los huevos de *H. contortus*. Las concentraciones de 12.5 y 25 mg resultaron ser similares al antihelmíntico, donde se obtuvo un 100% de inhibición.

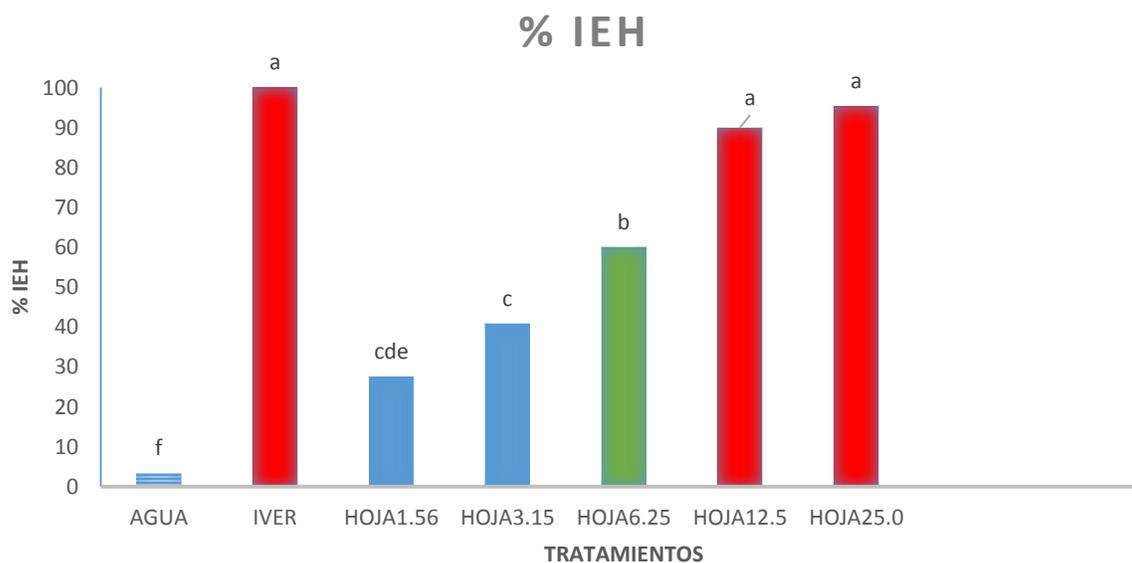


Figura 15. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus* contra diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de hojas de *Caesalpinia coriaria* a las 48h.

Con respecto a los resultados obtenidos del mismo extracto (Hoja), se puede observar (figura 16), que la concentración de 25 mg, de la misma forma que la ivermectina tuvo 100% de inhibición.

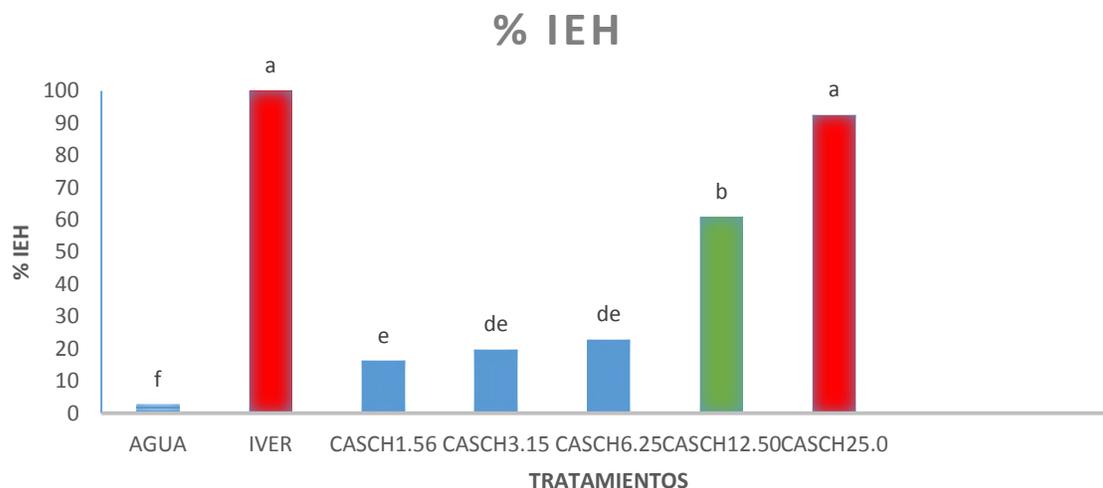


Figura 16. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito *Haemonchus placei* contra diferentes concentraciones de extracto hidroalcohólico de hojas de *Caesalpinia coriaria* a las 48h.

7.4. Inhibición de eclosión de huevos *H. contortus* *H. placei* del extracto frutos

En la figura 17, se muestran los resultados del extracto de fruto, donde todas las concentraciones utilizadas tuvieron un efecto altamente significativo ($P < 0.0001$) contra el nematodo *H. contortus*.

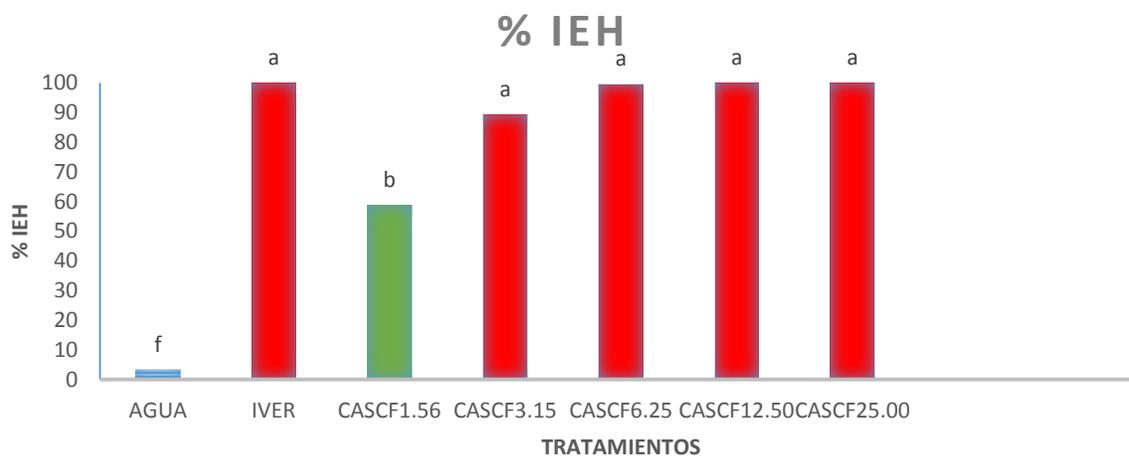


Figura 17. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus* contra diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de frutos de *Caesalpinia coriaria* a las 48h

Finalmente en la figura 18 se puede apreciar que las ultimas concentraciones de este extracto (fruto), tuvieron 100% de inhibición sobre los huevos de *H. placei*, demostrando un efecto altamente significativo ($P < 0.0001$).

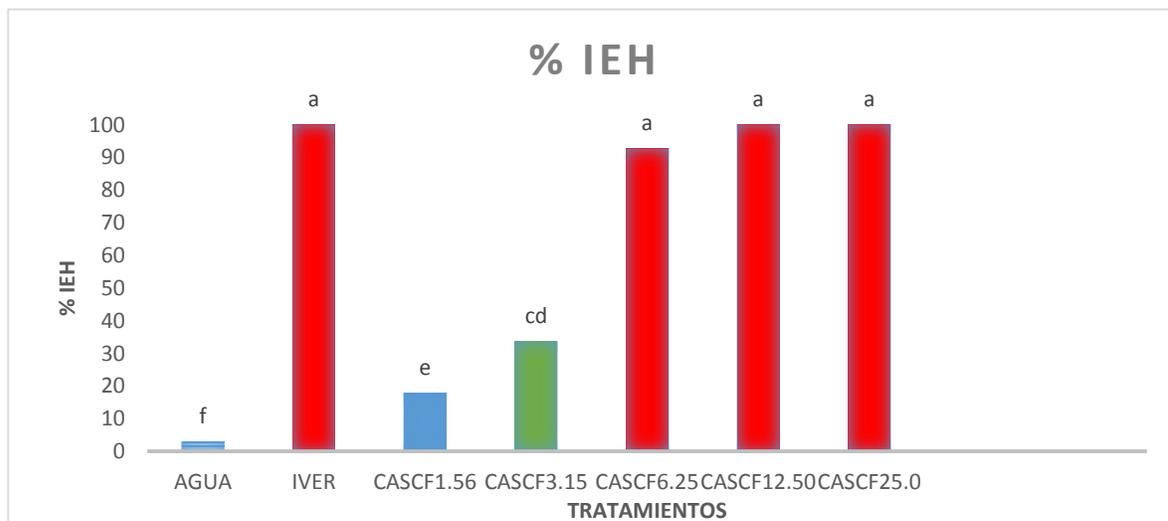


Figura 18. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito *Haemonchus placei* contra diferentes concentraciones de extracto hidro-alcohólico de frutos de *Caesalpinia coriaria* a las 48h

Por otra parte mediante la herramienta PROBIT del sistema SAS (2006), se determinaron las concentraciones letales medias y altas con sus límites de confianza de los diferentes tratamientos de los extracto hidro-alcohólicos de *Caesalpinia coriaria* para el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del nematodo parásito *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*

7.4 Concentraciones letales

En el cuadro 9, se muestran las concentraciones letales que corresponden al extracto de hoja tanto para *H. contortus* como *H. placei*. Este extracto fue tres veces más potente contra la cepa de ovinos (*H. contortus*, CL₅₀=3.98 mg/ml) que con la cepa de bovinos (*H. placei*, CL₅₀=11.68 mg/ml)

Cuadro 9. Concentraciones letales medias (CL₅₀) y altas (CL₉₀) del extracto hidroalcohólico de hojas de *Caesalpinia coriaria*, sobre el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de *Haemochus contortus* y *Haemonchu placei*

Prueba del extracto de hojas	Concentraciones letales (mg/ ml)						
	CL ₅₀	Límites de confianza		de	CL ₉₀	Límites de confianza	
Inhibición de la eclosión (IEH) de <i>H. contortus</i>	3.98	3.67	4.30		16.61	14.99	18.66
Inhibición de la eclosión (IEH) de <i>H. placei</i>	11.68	10.83	12.48		24.07	21.75	27.47

Por otra parte los resultados de las concentraciones letales referentes al extracto de fruto se observa un alto efecto ovicida (cuadro 10), en ambas cepas de nematodos. Donde las concentraciones letales medias fueron menores con respecto al extracto de hoja.

Cuadro 10. Concentraciones letales medias (CL₅₀) y altas (CL₉₀) del extracto hidro-alcohólico de frutos de *Caesalpinia coriaria*, sobre el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos de *Haemochus contortus* y *Haemonchu placei*.

Prueba del extracto de frutos	Concentraciones letales (mg/ ml)						
	CL ₅₀	Límites de confianza		de	CL ₉₀	Límites de confianza	
Inhibición de la eclosión (IEH) de <i>H. contortus</i>	1.63	1.52	1.74		3.51	3.28	3.80
Inhibición de la eclosión (IEH) de <i>H. placei</i>	3.92	3.72	4.09		6.05	5.74	6.44

De manera más específica en la figura 19 y 20 se muestran de forma gráfica los Probit de ambos extractos sobre las dos cepas de parásitos, para tal efecto, se utilizó la herramienta del PROBIT del sistema SAS (2006).

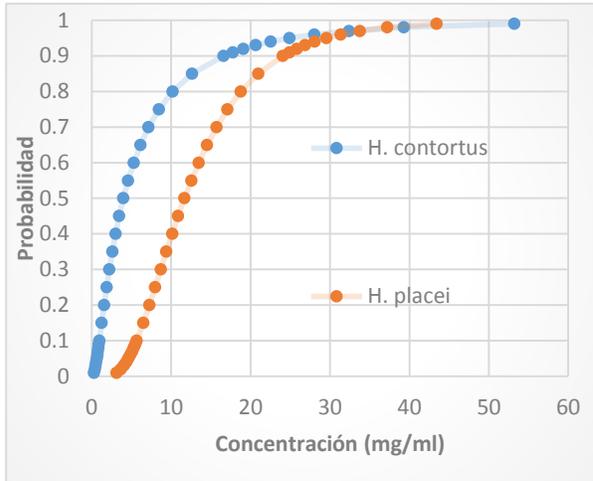


Figura 19. Concentraciones letales del extracto de fruto de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*

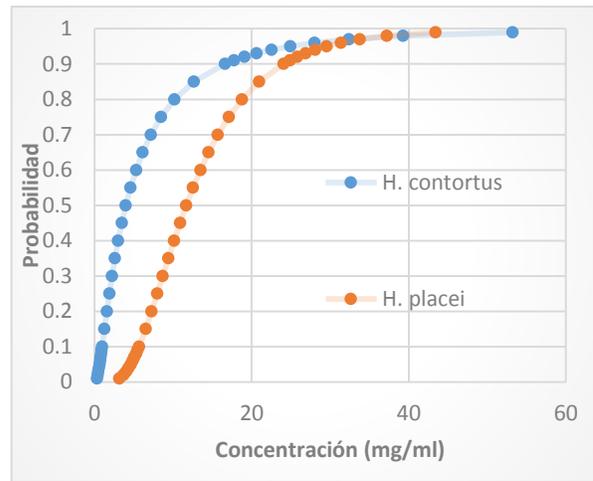


Figura 20. Concentraciones letales del extracto de hoja de la leguminosa *Caesalpinia coriaria* sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *Haemonchus contortus* y *Haemonchus placei*

VIII. DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Las plantas que se encuentran dentro de la familia de las Cesalpínáceas, han sido estudiadas con fines medicinales y a diversas especies se les atribuyen diferentes propiedades medicinales (Naik et al., 2015; Dong et al., 2015; Diniz et al., 2015). En la literatura existen reportes del género *Caesalpinia* con propiedades antihelmínticas. Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto ovicida de *C. Coriara*. Los resultados demuestran que tanto los frutos como las hojas de esta especie contienen una fuerte actividad biológica. Actualmente, se ha reportado una actividad antibacterial de extractos de hojas derivados de esta especie vegetal en contra de bacterias patógenas de importancia en salud pública como *Escherichia coli* y *Staphilococcus aureus* (Jeeva et al., 2014). Por otra parte, Jabbar et al. (2007), indican una actividad nematicida de un extracto metanólico de una leguminosa del mismo género (*C. crista*) sobre su administración oral (3 g/kg de peso vivo), en ovinos infectados con nematodos tricostrongiloides, reportando una reducción del 93 % en el número de huevos por gramo de heces. Asimismo, dentro de ese estudio ellos determinaron a nivel *in vitro* la CL₅₀ de esta leguminosa sobre la IEH, la cual fue de 0.134 mg/ml. En nuestro estudio la CL₅₀ más baja fue del extracto de fruto sobre *H. contortus* con 1.63 mg/ml. La actividad ovicida de *C. coriaria* podría estar dada por la cantidad de metabolitos secundarios presentes en sus hojas y frutos. Falcão y Araujo (2011), encontraron algunos compuestos como elagocatequinas y galocatequinas, de hojas de la leguminosa anteriormente mencionada. En nuestro estudio, desafortunadamente no se hicieron análisis sobre el contenido fitoquímico en la planta bajo estudio. Sin embargo, en otros trabajos de investigación mediante análisis por cromatografía en placas de sílica capa fina (TLC) se observó la presencia de galato de etilo, ácido gálico y flavonoides (Olmedo-Juárez et al., datos no publicados), mismos que son la base de los taninos. Es importante resaltar, que estos dos últimos compuestos se han encontrado en diferentes plantas y se les han atribuido actividad nematicida (Klongsiriwet et al., 2015). El contenido de metabolitos secundarios en *C. coriaria* está dado principalmente por

la cantidad de taninos condensados en sus frutos y hojas (Olmedo-Juárez et al., datos no publicados), por lo que el efecto ovicida de esta leguminosa podría deberse principalmente a su alto contenido de TC (>30%) tanto en hojas como en frutos. Actualmente, se ha comprobado que los TC son uno de los principales compuestos con actividad nematicida. Por ejemplo Williams et al. (2014), evaluaron extractos acetonicos de diversas plantas taniniferas (*Ribes nigrum*, *Tillia cordata*, *T. vulgaris*, *Salix* spp y *Triflorium repens*) sobre la IEH y desarrollo larvario (L₃) de *Oesaphagostomum dentatum* (parasito nematodo de cerdos) y encontraron que todos los extractos tuvieron un 90% de inhibición del desarrollo larvario con 125 µg/mL de concentración.

Los efectos ovicidas de *C. coriaria* podrían estar relacionados con la afinidad que tienen los TC de adherirse hacia las proteínas (Glicoproteinas) de los huevos tanto de *H. contortus* como *H. placei*, impidiendo los procesos del desarrollo embrionario y larval. Además de los TC presentes en los extractos bajo estudio. Sin embargo el efecto también podría ser debido a los fenoles galato de etilo, ácido gálico y flavonoides; los cuales también podrían también interferir con los procesos del desarrollo embrionario de la larva dentro del huevo. Esta teoría se sustenta con lo encontrado por Von Son-de Fernex et al. (2015), que mediante microscopia de barrido, observaron daños ultraestructurales sobre la cutícula de huevos de *Cooperia* spp, que estuvieron expuestos a fenoles como quercertina y ácido cafeolico que fueron aislados de hojas frescas de *L. leucocephala*. Por otra parte, (Brunet et al.2011), en un estudio realizado con larvas infectantes de *H. contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*, después de haber estado en contacto durante tres horas con TC de *Onobrychis vicifolia*; observaron diferentes daños sobre las estructuras internas y externas de los parásitos, además identificaron cambios sobre la alteración de la hipodermis, presencia de numerosas vesículas en el citoplasma y degeneración o muerte de las células musculares e intestinales.

CONCLUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se reporta una fuerte actividad ovicida en los frutos y hojas de la leguminosa *C. coriaria*, lo cual se sugiere realizar un estudio sobre la identificación de los compuestos responsables de dicha actividad, mediante evaluaciones bio-dirigidas, con la finalidad de elucidar las moléculas activas contra los diferentes estadios de los nematodos *H. contortus* y *H. placei*.

Por lo tanto podría ser un mecanismo de acción antihelmíntica a causa de algunos compuestos como los taninos y flavonoides que probablemente sean los responsables de bloquear las glicoproteínas que se encuentran adheridas en la cutícula de los huevos, en donde estas desempeñan un papel muy importante dentro del organismo de los nematodos, ya que son las encargadas de remover sustancias extrañas o agentes tóxicos como son los fármacos para su sobrevivencia.

De acuerdo con los resultados obtenidos de ambos ensayos se concluye que a nivel *in vitro* el extracto hidro-alcohólico de la leguminosa *C. coriaria* tiene actividad antihelmíntica por lo que sería conveniente determinar el perfil fotoquímico con el objetivo de identificar los compuestos que presentan la actividad nematicida.

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

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alba H, F.; Romero E, E.; Muñoz G.M.A.; Torres H.G. & Becerril P.C.M. (2010). Comparison of parasitological and productive traits of Criollo lambs native to the central Mexican Plateau and Suffolk lambs experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*: 277-282.
- Arece, J. y Lopez Y. (2012). In vitro effect of the aqueous extract of *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight & Arn. on the development of exogenous stages of gastrointestinal strongyles in sheep. *En rev. Pastos y Forrajes*, 35(3): 301-309.
- Aathanasiadou, Githiori., (2004-2006). In vitro effects of *Tabernaemontana citrifolia* extracts on *Haemonchus contortus*. *EL SEVIER* , 2-5.
- Barger, I.A.; Siale, et al. (1994). Rotacional grazing for control of gastrointestinal nematodes of goats in a wet tropical environment. *veterinary parasitology*, 53: 109-116.
- Barger, I. (1985). the statistical distribution of trichostrongylid nematodes in grazin lambs. *international Journal for Parasitoly* , 15: 645-649.
- Barnes, E., & Dobson, R. y. (1995). Worm control and anthelmintic resistance: adventures with a model. *parasitology today* , 55-63.
- Barron, G. (1997). the Nematode-Destroying Fungi. *Topics in microbiology No. 1; Canadian Biological publications; Guelph, Ontario/Canada*, 140p.
- Bath. (2000). trial design and requeriments-comemercial farms. *FAO TCP Worshop*, 40-43.
- Bath. (2000b). trial design and requirements-Commercial farms. *FAO TCP Workshop, 2000: 40-43*.
- Benavides O., E., Hernández M., G., & Romero N., A. C. (2001). Evaluacion preliminar de extractos del Neem (*Azadirachta indica*) como alternativa para el control de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Acari: Ixodida). *revista colombiana de Entomología*, 1-8.
- Bissest, S. (2000). practical ways of implementing identication of hostresistance in sheep and its use in breeding programmes. *FAO TCP Workshop. sustainable Worm Control Programmmes for sheep and Goats*, 16-21.

- Borchert, A. (1981). *Parasitología Veterinaria*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Bowman, D.D., (2011). *Georgis: Parasitología Veterinaria*. Novena edición. Elsevier Saunders. Barcelona, España. pp. 60-79. (s.f.).
- Brunet, S., Fourquaux, I., Hoste H., (2011). Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol. Int.* 60, 419-424.
- Ceconello, G., Benezra, M Obispo N. (2003). Composición química y degradabilidad ruminal de los frutos de algunas especies forrajeras leñosas de un bosque seco tropical. *Zootecnia Trop.*, 21(2): 149-165
- Carretero M.E. (2000). Compuestos fenólicos: Taninos. *Panorama Actual Médico*; 24 (235): 633-636.
- Casado, C., Benecia, M., Colmenares, O. y Martínez, N. (2001). Evaluación del bosque decíduo como recurso alimenticio para bovinos en los Llanos Centrales de Venezuela. *Zootecnia Trop.* 19 (2) 139-150
- Clavero, T. (1996). Las leguminosas forrajeras arbóreas: Sus perspectivas para el trópico americano. En *leguminosas forrajeras arbóreas en agricultura tropical*. Ed. Tyrone, Clavero. Universidad de Zulia, Maracaibo, Venezuela. pp 49-63
- Cordero del Campillo, M., Rojo Vázquez, F.A., Hidalgo Argüello, M.R. (1999).- Toxocarosis de los rumiantes. En: *Parasitología Veterinaria* (Cordero del Campillo y col.). Parte III: Parasitosis de los rumiantes. McGraw-Hill · Interamericana de España, S.A.U., Madrid, ISBN 84-486-0236-6. pp. 254-256. (CL).
- Díez baños, N., Hidalgo Argüello, M.R., & Rojo Vázquez, F.A. (2006).-Efficacy of moxidectin 0,2 % oral drench against natural infection with *Dictyocaulus filaria* in sheep. *Research and Review in Parasitology*
- Falcão, L., Araújo, M.E.M. (2011).Tannins characterisation in new and historic vegetable tanned leathers fibres by spot tests. *Journal of Cultural Heritage*. 12, 149-156.
- Fraenkel G (1959) The raison d'etre of secondary substances. *Science* 129:1466–1470.

- Gari, J.A. (2001). Biodiversity and indigenous agroecology in Amazonia. The Indigenous peoples of Pastaza. Economic Geography Research Group. School of Geography and the Environment. University of Oxford. *Etnoecologica* 7: 21-37.
- Gillespie, A. (2002). *Duddingtonia Flagrans* for control of parasites in farm animals: A commercial perspective. In: Final Proceedings of FAO TCP in Malaysia [(TCP 0065 (7)]. FAO Animal Production and Health paper. pp. 41-43.
- Godier, S.; Medina, J.M.; Waelput, J.J. y Brunshwig, G. (1994). *Arboles y Arbustos Forrajeros en América Central*. Vol. 1 CATIE. Costa Rica pp 217-235.
- Grønvold, J.; Wolstrup, J.; Larsen, M.; Nansen, P. & Bjon, H. (2000). Absence of obvious short term impact of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* on survival and growth of the earthworm *Aporrectodea longa*. *Acta Veterinaria Scandinavia* 41: 147-151.
- Hempworth k., Neary M. y Hutchens T. (2006). Managing internal parasitism in sheep and goats. Purdue University West Lafayette. pp,59-76
- Hickman, C.P.L.S Roberts y F.M Hckman . (1991). *zoologia aplicada*. madrid : ed. interamericana McGraw-Hill.
- Hooda, V.; Yadav, C.L.; Chaudhri, S.S. & Rajpurohit, B.S. (1999). Variation in resistance to Haemonchosis: Selection of female sheep resistant to *Haemonchus contortus*. *Journal of Helminthology*. 72, 137-142.
- Hogsette, J.A. (1999). Management of ectoparasites with biological control organisms. *International Journal for Parasitology* 29: 147-151.
- Jabbar, A., Zaman, M.A., Iqbal, Z., Yaseen, M., Shamima, A. (2007). Anthelmintic activity of *Chenopodium album* (L.) and *Caesalpinia crista* (L.) against trichostrongylid nematodes of sheep. *Journal of Ethnopharmacology*. 114, 86–91.
- Jeeva, K., Thiyagarajan, M., Elangovan, V., Geetha, N., Venkatachalama, P. (2014). *Caesalpinia coriaria* leaf extracts mediated biosynthesis of metallic silver nanoparticles and their antibacterial activity against clinically isolated pathogens. *Industrial Crops and Products*. 52, 714-720.
- Jordano Barea, D. johnstoner. (1951-1998). *biologia aplicada* . cordoba : ed. S.E.U de cordoba .

- klongsiriwet, C. J.-H. (2015). synergistic inhibition of *haemonchus contortus* exsheathment by flavonoid monomers and condensed tannins. *international journal for parasitology: drugs and drug resistance*, 5, 17-134.
- Kyriazakis, I. et al. (2010). Nutritional strategies to control gastrointestinal parasitism in small ruminants. *Advances in Animal Biosciences*. 1:390.
- Larsen, M.; Wolstrup, J.; Heriksen, S.; Grønvold, J. & Nansen, P. (1992). In vivo passage through calves of nematophagous fungi selected for biocontrol of parasitic nematodes. *Journal of Helminthology* 66: 137-141.
- López de Lara, O.M. (1984). Potencialidad agronómica del cascalote (*Caesalpinia coriaria*) como fuente de tanino industrial para la curtiduría Nacional. Tesis. ITESM
- Marie-Magdeleine. (2009). Marie-Magdeleine, Carine *et al.* *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 161:99.
- Marrero, E.; Alfonso, H.A.; García, T.; Figueredo, M.A. & Perez, R. (1994). Actividad antihelmíntica de *Bromelia pinguin* en terneros. *Salud Animal* 16(1-3): 63-68.
- Martínez, M. L. (2007). Caracterización de proteínas de membrana de intestino de *haemonchus contortus*. Tesis de Maestría Universidad de Buenos Aires, Argentina. pp.1-4
- Martínez, M. (1992). Plantas medicinales de México. 6ª. edición. pp 157-159
- Meana Mañes, A. y Rojo V.;F.A. (1999): *Parasitología Veterinaria (Cordero del Campillo y Col.)*. Parte V: Parasitosis. McGraw-Hill · Interamericana de España, S.A.U., Madrid, ISBN 84-486-0236-6, pp. 604-605. (CL).
- Meana M. A. y Rojo V. (1999). Parasitos cutáneos y afines en *Parasitología veterinaria*. Editorial McGraw Hill-Interamericana Madrid España. 237-252 p.
- Naik, B.A., Nazeen, H.F., Shankar, P.C. (2015). Comparative study of *in vitro* antibacterial activity of leaves, bark, heart wood and seed extracts of *Caesalpinia sappan* L. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5 (11), 903-907.

- N, D. B. (1988). *estudio epidemiológico sobre los nematodos gástricos ovinos de la provincia de león, con especial referencia a Ostertagia ss. doctoral.* universidad de león: facultad de veterinaria.
- National Research Council (NCR). (1981). Nutrient Requirements of Beef Cattle. Nutrient Requirements of Domestic Animals. National Academy Press. Washington, D.C. pp 30-46.
- Oliveros J.R.; Rois, E.; Benavides, E. & Wilches, M. (1996). Evaluación in vitro de posibles Propiedades de la semilla del Mamey (*Mammea americana*) en el control de la Garrapata *Boophilus microplus*. En: Memorias XXXI Congreso Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas, ACCB. pp. 125.
- Olmedo, J. A. (2014). in vitro of *Pithecellobium dulce* and *Lysiloma acapulcensis* on the exogenous development of gastrointestinal strongyles in sheep. *Italian Journal of Animal Science*, 13, 303-307.
- Olmedo, J. A. (2015). Extracto de *Lysiloma acapulcensis* en la digestibilidad y fermentación ruminal de una dieta para ovinos. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 2 (5), 173-182.
- Padilla Álvarez F. y Antonio E. Cuesta López. (2003). *Zoología Aplicada*. España: Ediciones Díaz de Santos, S.A.
- Paolini, V., Frayssines, A., De La Farge, F., Dorchies, Ph., Hoste, H. Efficacy of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. *Vet. Res.*, in press.
- Pietrosemoli, S., Olavez, R., Montillo, T. y Campos, Z. (1999). Empleo de hojas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de nematodos gastrointestinales de bovinos a pastoreo. *Revista de la Facultad de Agronomía*, Ediciones Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de La Universidad del Zulia, Maracaibo. 16 (Supl.1): 220-225.
- Quiroz, R.H. (Ed). (1984). *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. México, D.F.: LIMUSA.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Cob-Galera, L.A., (2005). *Técnicas diagnósticas en Parasitología Veterinaria*, 2nd ed. Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, pp. 179–198.
- Ross, J.G., Lee, R.P., and Armour, J. (1959). Haemonchosis in Nigerian Zebu cattle: the influence of genetical factors in resistance. *Vet. Rec.* 71: 27-31.

- Roncallo, B.; Navas, A. y Garibella, A. (1996). Potencial de los frutos de plantas nativas en la alimentación de rumiantes. En: II Seminario Internacional. Silvopastoreo: Alternativa para una ganadería moderna y competitiva. Valledupar, Neiva y Villavicencio. pp 231-244.
- Rudolphi, y Cobb, (1803-1898). Cytological Polymorphism in the Nematode *Haemonchus contortus*. pp 174:704-5.
- Rzedowski, J.; Dávila, P. y V. Sosa. (1998-1994). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México, pp. 129-145. Diversidad biológica de México: orígenes y distribución. Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Salem, A. Z.-A. (2006). Nutritive evaluations of some browse tree foliages during the dry season: secondary compounds, feed intake and in vivo digestibility in sheep and goat. . *Animal Feed Science and Techonology*, 127, 251-267.
- SAS Institute, *User's Guide: Statistics. Ver 9.0 SAS Intitut, cary.* (2006). N. C. USA: 956 p.
- Sibaja-Hernández, R. R.-G.-J.-M. (2015). Physicochemical, shear flow behaviour and emulsifying properties of *Acacia cochliacantha* and *Acacia farnesiana* gums. . *Industrial crops and Products*, 67, 161-168.
- Soulsby, E. J. L. (1987). Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domesticos. 7ª. Ed. México: Interamericana. pp 232-237
- Sousa S., M. y A. Delgado S. (1998). Leguminosas mexicanas: fitogeografía, endemismo y orígenes. *In* Diversidad biológica de Mexico: orígenes y distribución, T. P. Ramamoorthy, R. Bye, A. Lot y J. Fa (comps.). Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, D.F. p. 449–500.
- Sréter T. Kovacs G, Silva AJ, Pienazzek NJ, Szell Z, Dobos-Kovacs M, Marialigeti K, Varga I. (2000). Morphologic, host specificity, and molecular characterization of a hungarian *Cryptosporidium* isolate. *Applied and Environmental Microbiology*; 66:735-738.
- Stewart, M.A., Miller, R.F., Douglas, J.R. (1937). Resistance of sheep of different breeds to infestation by *Ostertagia circumcincta*. *J. Agric. Res.* 55: 923-930.
- Torres-Acosta, et al. (2012), *Pithecellobium dulce* y *Lysiloma acapulscensis* (Olmedo et al., 2014),

- Vázquez, A. M. (1999). *parasitología Veterinaria*. España: McGRAW-HILL . INTERAMERICANA.
- Von Son-de-Fenex, E. A. (2012). In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Experimental Parasitology*, 131, 413-418.
- Waller, P.J. (1997b). Possible means of using nematophagous fungi to control nematode parasites of livestock. En: "Biological control of gastrointestinal nematodes of ruminants using predacious fungi. Proceedings of a Workshop organized by FAO and the Danish Centre for Experimental Parasitology". Ipoh, Malaysia. 5-12 October, 1997. FAO Animal Production and Health Paper N° 141: 11- 14.
- Williams, A.R., Ropiak, H.M., Frygnas, C., Desrués, O., Mueller-Harvey, I., Thamsborg, S.M., (2014). Assessment of the anthelmintic activity of medicinal plant extracts and purified condensed tannins against free-living and parasitic stages of *Oesophagostomum dentatum*. *Parasitology Vectors*. 7, 518-527.
- Wolstenholme, A.J. et al, (2004). Drug resistance in veterinary helminths. *Trends in Parasitology*. 20:469.

IX. ANEXOS

Anexo 1.

PROTOCOLO DE RECUPERACIÓN DE HUEVOS DE NEMATOS GASTROINTESTINALES DEPARTAMENTO DE HELMINTOLOGÍA CENID-PAVET, INIFAP.

Metodología (Ana Carolina Souza Chagas, 20012)

1. Colectar heces directamente del recto de un ovino infectado con *haemonchus contortus* (que tenga 1000 huevos por gramo de heces).
2. Macerar las heces (30-50 g) con agua tibia ($\pm 40^{\circ}\text{C}$);
3. Filtrar el material fecal en cuatro tamices con las siguientes medidas: 200 mm, 150 μm , 75 μm , 37 μm . los huevos pasan por os tres primeros tamices y son retenidos en el último tamiz.
4. Colectar el líquido retenido en el último tamiz.
5. Lavar el tamiz de 37 μm con agua destilada, y con una pipeta retirar los huevos que fueron retenidos.
6. Colectar el contenido de huevos con material fecal en tubo de Falcon de 50 ml (volumen máximo de 40 ml).
7. En 8 tubos Falcon de 15 ml, colocar a cada tubo 6 ml de solución salina saturada al (40%), en seguida agregar 5 ml de solución de huevos con material fecal.
8. Centrifugar a 300 rpm durante 3 minutos y retirar el anillo formado en la parte madia de los tubos (colectarlos en un solo tubo de 15 ml).
9. Depositar los huevos en el tamiz de 37 μm y lavarlos con abundante agua limpia durante dos minutos.
10. Colectar en un solo tubo de 15 ml la solución de los huevos libres de solución salina.
11. Centrifugar a 3000 rpm durante 5 min y retira los residuos de detritus co a finalidad de obtener huevos limpios.
12. Agregar agua destilada al tubo con huevos (4 ml) y hacer un conteo en el microscopio óptico (4x), tomando 10 alicotas de 5 μl .
13. Finalmente hacer el cálculo de la cantidad de huevos concentrados en los 4ml.

Anexo 2

PROTOCOLO LABORATORIO SANIDAD ANIMAL –N° 5/2008-R 2012

PRUEBA DE ECLOSIÓN DE HUEVOS –TEO (egg hatch test- ETH)

Metodología (Ana Carolina de Souza Chagas)

- Realizar la recuperación de huevos conforme al protocolo 03/2009;
- Colocar aproximadamente 100 huevos/ pozo en placas de 24 pozos y completar un volumen de 250 µl con agua destilada;
- Utilizar solamente placas estériles, que deben tener un fondo plano y marcado externamente con líneas guiadas al momento de la siembra
- Adicionar la sustancia de la prueba calculándose el volumen final por pozo de 500 µl y 6 pozos por concentración;
- La cantidad máxima de tween 80:45 µl/pozo (a 9%), dependiendo de la sustancia, tal vez no hay necesidad de tanto.

Si el producto a ser probado está en estado líquido, pesar en eppendorf 3 repeticiones de 1 ml para calcular la densidad de la sustancia y realizar la prueba en mg/ml. Sugerencia y ejemplo para la producción de concentraciones p/6 pozos con aceite esencial de *Eucalyptus staigeriana*:

Entendimiento: 1 ml=0.872 mg/ml). Para un volumen final de 3.000 µl (500 x 6 repeticiones) una sustancia que tiene relación de 1ml =1 g precisa de 300 µl para estar al 10% de concentración, pero en caso de *E. staigeriana* serían necesarios 344 µl ($M1.V1=M2.V2$ o $1\text{ g} \cdot 300\text{ µl}=0.872.V2$).

- **Producción de diluciones seriadas en tubos Falcon de 15 ml pre identificados:**
- 10% (100 mg/ml): 459 µl de sustancia + 200 µl de tween 80 + 3.341 µl de agua destilada
- 5% (50 mg/ml); 2m de solución anterior + 2 ml de agua destilada y así mismo para 2.5% (25 mg/ml), 1.25% (12.5 mg/ml), 0,625% (6.25 mg/ml), 0.3125% (3,125 mg/ ml), 0.156% (1.56 mg/ml), 0.078% (0.78mg/ml). Etc.
- Control tween: 80: 100 µl de tween 80+ 1.900 µl de agua destilada
- Control negativo: agua destilada
- Control positivo: tiabendazol 25 mµl/ml (protocolo 8/20012)

- Agitar los tubos fuertemente en vórtex
- Inserta en cada uno de los 6 pozos consecutivamente 250 µl de contenido de cada tubo. Proceder de la misma forma para los tubos consecuentes.
- **En cada pozo ya existía 250 µl. atender a continuación que una solución producida a 100 mg/ml estará siendo evaluada o aprobada a 50 mg/ml**
- Iniciar por el control negativo, después del control Tween 80, sustancia evaluada probada de menor a mayor concentración y por fin el control positivo tiabendazol.
- Identificar cada línea /tratamiento de la placa de 24 pozos, tapar con plástico PVC y acondicionar en BOD a 27°C por 24 hrs.

OBS:

- Adicionar 80 µl de *E. coli* (producción protocolo 01/2008) solamente si la capacidad de eclosión está por debajo del 90%. ese volumen debe ser adicionado directamente a cada pozo y debe ser sustraído del agua destilada.
- Si un gran número de huevos son todavía larvas moviéndose en su interior, guardar un poco más para iniciar la lectura;
- De acuerdo con la sensibilidad de la producción parasitaria y cantidad de tween 80 podrá ser ajustada. Este emulsionante y más adecuado para el trabajo con aceites esenciales de DMSO.
- Se sugiere colocar los controles en placas diferentes a los tratados

Anexo 3. Comandos utilizados en el diseño estadístico mediante el Sistema SAS versión 9.0

```

DATA FACTORIAL;
INPUT TRAT$ REP EXT$ NEMA$ CONC IEH;
CARDS;
HC0.00      1      HOJA  CONTO  0      4
HC0.00      2      HOJA  CONTO  0      6
HC0.00      3      HOJA  CONTO  0      0
HC0.00      4      HOJA  CONTO  0      3
HC1.56      1      HOJA  CONTO  1.56  31
HC1.56      2      HOJA  CONTO  1.56  30
HC1.56      3      HOJA  CONTO  1.56  24
HC1.56      4      HOJA  CONTO  1.56  25
HC3.12      1      HOJA  CONTO  3.12  39
HC3.12      2      HOJA  CONTO  3.12  43
HC3.12      3      HOJA  CONTO  3.12  41
HC3.12      4      HOJA  CONTO  3.12  40
HC6.25      1      HOJA  CONTO  6.25  62
HC6.25      2      HOJA  CONTO  6.25  63
HC6.25      3      HOJA  CONTO  6.25  51
HC6.25      4      HOJA  CONTO  6.25  64
HC12.5      1      HOJA  CONTO  12.5  91
HC12.5      2      HOJA  CONTO  12.5  91
HC12.5      3      HOJA  CONTO  12.5  86
HC12.5      4      HOJA  CONTO  12.5  92
HC25.0      1      HOJA  CONTO  25.0  96
HC25.0      2      HOJA  CONTO  25.0  98
HC25.0      3      HOJA  CONTO  25.0  93
HC25.0      4      HOJA  CONTO  25.0  94
HP0.00      1      HOJA  PLACEI      0.00  4
HP0.00      2      HOJA  PLACEI      0.00  3
HP0.00      3      HOJA  PLACEI      0.00  1
HP0.00      4      HOJA  PLACEI      0.00  3
HP1.56      1      HOJA  PLACEI      1.56  24
HP1.56      2      HOJA  PLACEI      1.56  17
HP1.56      3      HOJA  PLACEI      1.56  9
HP1.56      4      HOJA  PLACEI      1.56  15
HP3.12      1      HOJA  PLACEI      3.12  17
HP3.12      2      HOJA  PLACEI      3.12  23
HP3.12      3      HOJA  PLACEI      3.12  23
HP3.12      4      HOJA  PLACEI      3.12  16
HP6.25      1      HOJA  PLACEI      6.25  22
HP6.25      2      HOJA  PLACEI      6.25  21
HP6.25      3      HOJA  PLACEI      6.25  21
HP6.25      4      HOJA  PLACEI      6.25  27
HP12.5      1      HOJA  PLACEI      12.5  57
HP12.5      2      HOJA  PLACEI      12.5  66
HP12.5      3      HOJA  PLACEI      12.5  57
HP12.5      4      HOJA  PLACEI      12.5  63
HP25.0      1      HOJA  PLACEI      25.0  95
HP25.0      2      HOJA  PLACEI      25.0  95
HP25.0      3      HOJA  PLACEI      25.0  90
HP25.0      4      HOJA  PLACEI      25.0  90
VC0.00      1      VAIN  CONTO  0.00  4
VC0.00      2      VAIN  CONTO  0.00  6

```

VC0.00	3	VAIN	CONTO	0.00	0
VC0.00	4	VAIN	CONTO	0.00	3
VC1.56	1	VAIN	CONTO	1.56	43
VC1.56	2	VAIN	CONTO	1.56	46
VC1.56	3	VAIN	CONTO	1.56	57
VC1.56	4	VAIN	CONTO	1.56	89
VC3.12	1	VAIN	CONTO	3.12	88
VC3.12	2	VAIN	CONTO	3.12	89
VC3.12	3	VAIN	CONTO	3.12	85
VC3.12	4	VAIN	CONTO	3.12	95
VC6.25	1	VAIN	CONTO	6.25	99
VC6.25	2	VAIN	CONTO	6.25	99
VC6.25	3	VAIN	CONTO	6.25	100
VC6.25	4	VAIN	CONTO	6.25	100
VC12.5	1	VAIN	CONTO	12.5	100
VC12.5	2	VAIN	CONTO	12.5	100
VC12.5	3	VAIN	CONTO	12.5	100
VC12.5	4	VAIN	CONTO	12.5	100
VC25.0	1	VAIN	CONTO	25.0	100
VC25.0	2	VAIN	CONTO	25.0	100
VC25.0	3	VAIN	CONTO	25.0	100
VC25.0	4	VAIN	CONTO	25.0	100
VP0.00	1	VAIN	PLACEI	0.00	4
VP0.00	2	VAIN	PLACEI	0.00	3
VP0.00	3	VAIN	PLACEI	0.00	1
VP0.00	4	VAIN	PLACEI	0.00	3
VP1.56	1	VAIN	PLACEI	1.56	16
VP1.56	2	VAIN	PLACEI	1.56	16
VP1.56	3	VAIN	PLACEI	1.56	21
VP1.56	4	VAIN	PLACEI	1.56	18
VP3.12	1	VAIN	PLACEI	3.12	49
VP3.12	2	VAIN	PLACEI	3.12	33
VP3.12	3	VAIN	PLACEI	3.12	28
VP3.12	4	VAIN	PLACEI	3.12	25
VP6.25	1	VAIN	PLACEI	6.25	93
VP6.25	2	VAIN	PLACEI	6.25	94
VP6.25	3	VAIN	PLACEI	6.25	92
VP6.25	4	VAIN	PLACEI	6.25	92
VP12.5	1	VAIN	PLACEI	12.5	100
VP12.5	2	VAIN	PLACEI	12.5	100
VP12.5	3	VAIN	PLACEI	12.5	100
VP12.5	4	VAIN	PLACEI	12.5	100
VP25.0	1	VAIN	PLACEI	25.0	100
VP25.0	2	VAIN	PLACEI	25.0	100
VP25.0	3	VAIN	PLACEI	25.0	100
VP25.0	4	VAIN	PLACEI	25.0	100

;

PROC PRINT;

PROC GLM;

CLASS TRAT EXT NEMA CONC;

MODEL IEH= EXT NEMA CONC EXT*NEMA EXT*CONC EXT*NEMA*CONC/SS3;

MEANS EXT*NEMA EXT*CONC EXT*NEMA*CONC/ TUKEY LINES;

LSMEANS EXT NEMA CONC EXT*NEMA EXT*CONC EXT*NEMA*CONC/ STDERR TDIFF

ADJUST= TUKEY;

MEANS EXT NEMA CONC EXT*NEMA EXT*CONC EXT*NEMA*CONC/ TUKEY;

PROC GLM;

CLASS TRAT;

```

MODEL IEH=TRAT/SS3;
MEANS TRAT/TUKEY LINES;
RUN;

```

Anexo 4. Comandos correspondientes al sistema Probit para calcular las concentraciones letales de ambos extractos.

```

data IEH HOJA VS H. CONTORTUS;
input extract$ dosis repetit larvas huevos total;
cards;
CAHC 0 1 73 3 76
CAHC 0 2 75 5 80
CAHC 0 3 84 0 84
CAHC 0 4 92 3 95
CAHC 1.56 1 89 40 129
CAHC 1.57 2 98 42 140
CAHC 1.56 3 106 34 140
CAHC 1.56 4 95 31 126
CAHC 3.12 1 80 52 132
CAHC 3.12 2 68 52 120
CAHC 3.12 3 67 47 114
CAHC 3.12 4 88 58 146
CAHC 6.25 1 60 97 157
CAHC 6.25 2 56 96 152
CAHC 6.25 3 69 71 140
CAHC 6.25 4 47 83 130
CAHC 12.5 1 13 130 143
CAHC 12.5 2 13 132 145
CAHC 12.5 3 20 124 144
CAHC 12.5 4 11 129 140
CAHC 25 1 5 129 134
CAHC 25 2 2 86 88
CAHC 25 3 7 99 106
CAHC 25 4 8 136 144
;
proc print data=eclo;
run;
/*proc srot data=eclo; by antipar;*/
run;
proc probit data=eclo log10 optc; /*by antipar;*/
model huevos/total=dosis / d=normal inversecl;
predpplot var=dosis cfit=black cframe=ligr inborder;
output out=B p=Prob std=std xbeta=xbeta;
run;

```

```

data IEH HOJA VS H. PLACEI;
input extract$ dosis repetit larvas huevos total;
cards;
CAHP 0 1 76 3 79
CAHP 0 2 78 2 80
CAHP 0 3 84 1 85
CAHP 0 4 90 3 93
CAHP 1.56 1 85 27 112
CAHP 1.56 2 131 27 158
CAHP 1.56 3 128 13 141
CAHP 1.56 4 132 24 156
CAHP 3.12 1 85 17 102
CAHP 3.12 2 89 27 116
CAHP 3.12 3 98 29 127
CAHP 3.12 4 126 24 150
CAHP 6.25 1 88 25 113
CAHP 6.25 2 89 24 113
CAHP 6.25 3 79 21 100
CAHP 6.25 4 84 31 115
CAHP 12.5 1 32 43 75
CAHP 12.5 2 35 68 103
CAHP 12.5 3 35 47 82
CAHP 12.5 4 35 60 95
CAHP 25 1 4 73 77
CAHP 25 2 3 59 62
CAHP 25 3 7 60 67
CAHP 25 4 6 55 61
;
proc print data=eclo;
run;
/*proc srot data=eclo; by antipar;*/
run;
proc probit data=eclo log10 optc; /*by antipar;*/
model huevos/total=dosis / d=normal inversecl;
predplot var=dosis cfit=black cframe=ligr inborder;
output out=B p=Prob std=std xbeta=xbeta;

run;

```

```

Data IEH FRUTO VS H. CONTORTUS;
input extract$ dosis repetit larvas huevos total;
cards;
CAVC 0 1 73 3 76
CAVC 0 2 75 5 80
CAVC 0 3 84 0 84
CAVC 0 4 92 3 95
CAVC 1.56 1 53 46 99
CAVC 1.56 2 69 51 120
CAVC 1.56 3 65 55 120
CAVC 1.56 4 43 57 100
CAVC 3.12 1 13 109 122
CAVC 3.12 2 16 114 130
CAVC 3.12 3 15 120 135
CAVC 3.12 4 17 97 114
CAVC 6.25 1 5 101 106
CAVC 6.25 2 2 135 137
CAVC 6.25 3 1 106 107
CAVC 6.25 4 0 85 85
CAVC 12.5 1 0 131 131
CAVC 12.5 2 0 134 134
CAVC 12.5 3 0 118 118
CAVC 12.5 4 0 138 138
CAVC 25 1 0 110 110
CAVC 25 2 0 108 108
CAVC 25 3 0 108 108
CAVC 25 4 0 97 97
;
proc print data=eclo;
run;
/*proc srot data=eclo; by antipar;*/
run;
proc probit data=eclo log10 optc; /*by antipar;*/
model huevos/total=dosis / d=normal inversecl;
predpplot var=dosis cfit=black cframe=ligr inborder;
output out=B p=Prob std=std xbeta=xbeta;
run;

```

```

data IEH FRUTO VS H. PLACEI;
input extract$ dosis repetit larvas huevos total;
cards;
CAVP 0 1 76 3 79
CAVP 0 2 78 2 80
CAVP 0 3 84 1 85
CAVP 0 4 90 3 93
CAVP 1.56 1 115 22 137
CAVP 1.56 2 109 20 129
CAVP 1.56 3 115 31 146
CAVP 1.56 4 115 25 140
CAVP 3.12 1 41 39 80
CAVP 3.12 2 96 48 144
CAVP 3.12 3 68 27 95
CAVP 3.12 4 86 29 115
CAVP 6.25 1 6 84 90
CAVP 6.25 2 8 116 124
CAVP 6.25 3 11 135 146
CAVP 6.25 4 9 100 109
CAVP 12.5 1 0 105 105
CAVP 12.5 2 0 113 113
CAVP 12.5 3 0 110 110
CAVP 12.5 4 0 114 114
CAVP 25 1 0 80 80
CAVP 25 2 0 92 92
CAVP 25 3 0 85 85
CAVP 25 4 0 77 77
;
proc print data=eclo;
run;
/*proc srot data=eclo; by antipar;*/
run;
proc probit data=eclo log10 optc; /*by antipar;*/
model huevos/total=dosis / d=normal inversecl;
predplot var=dosis cfit=black cframe=ligr inborder;
output out=B p=Prob std=std xbeta=xbeta;
run;

```