



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

CONSUMO DE *Cratylia argentea* POR BOVINOS INFECTADOS Y NO
INFECTADOS CON NEMATODOS GASTROINTESTINALES EN VERACRUZ,
MÉXICO.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MELVIN NOEL GONZÁLEZ ARCIA

TUTORES

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz CEIEGT-FMVZ-UNAM

Dr. Braulio Valles de la Mora CEIEGT-FMVZ-UNAM

Dr. Juan Carlos Ku Vera FMVZ-UADY

Ciudad Universitaria, México DF, Mayo de 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

A los que hicieron posible el desarrollo del presente trabajo

Proyecto PAPIIT (Proyecto IN202410-3), DGAPA-UNAM.

Mis asesores

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz

Dr. Braulio Valles de la Mora

Dr. Juan Carlos Ku Vera

Al CEIEGT, por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo en sus instalaciones, al Dr. Epigmenio Castillo Gallegos, al rancho la Soledad, y todos sus trabajadores que de alguna u otra forma contribuyeron para que este fuera posible.

A mis padres, por haberme brindado confianza, apoyo y ánimo para cumplir esta meta.

A Elke von Son de Fernex, por su apoyo incondicional y porque contribuyo en gran medida en la elaboración de este trabajo.

A los profesores que me dieron clase en la FMVZ - UNAM, porque cada uno con sus valiosas aportaciones, me ayudaron a crecer como persona y como profesionista.

ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ANEXOS	ix
RESUMEN	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Nematodos gastrointestinales y su impacto en la ganadería bovina	4
2.1.2. Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales (NGI)	5
2.1.3. Control de nematodos gastrointestinales (NGI)	7
2.1.4. Control químico	7
2.2. Métodos alternativos de control de nematodos gastrointestinales	8
2.2.1. Inmunonutrición	8
2.2.2 Plantas medicinales y efecto antihelmíntico (AH) de leguminosas forrajeras	11
2.2.2.1. Compuestos polifenólicos	13
2.2.2.1.1. Efecto de los compuestos polifenólicos en la nutrición de los rumiantes; ¿benéficos o perjudiciales?	15
2.2.2.1.2. Mecanismos de adaptación de los rumiantes a los compuestos polifenólicos	16
2.2.2.2. Automedicación	17
2.3. Consumo voluntario	17
2.4. Proceso de degradación del forraje para la obtención de nutrientes	18
2.5. Generalidades de las proteínas	20
2.5.1. Proteínas en la alimentación del ganado bovino	20
2.5.2. Proteína microbiana	21
2.6. Derivados de purinas	21
2.7. Generalidades de leguminosas arbustivas para la alimentación del ganado	22

2.7.1. Descripción botánica de la leguminosa <i>Cratylia argentea</i>	23
2.7.2. Valor nutritivo de <i>Cratylia argentea</i>	24
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	28
HIPÓTESIS	28
III. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Localización del estudio	29
3.2 Experimento I. Evaluación del consumo y del metabolismo del nitrógeno en bovinos alimentados con niveles crecientes de la leguminosa <i>Cratylia argentea</i>	29
3.2.1. Animales experimentales y su manejo	29
3.2.2. Diseño experimental	30
3.2.3. Dieta experimental	30
3.2.4. Colección y procesamiento de muestras	31
3.2.5. Mediciones y técnicas de laboratorio	32
3.2.5.1. Consumo de materia seca	32
3.2.5.2. Determinación de materia seca y materia orgánica en el alimento	32
3.2.5.3. Determinación de nitrógeno (N) y proteína cruda (PC)	32
3.2.5.4. Determinación de fibra en el material vegetativo de la dieta	32
3.2.5.5. Digestibilidad <i>in situ</i>	33
3.2.5.6. Concentración de urea en plasma	33
3.2.5.7. Concentración de N ureico en orina	33
3.2.5.8. Cuantificación de heces totales y orina total	34
3.2.5.9. Derivados de purinas	34
3.2.6. Análisis estadístico	34
3.3. Experimento II. Consumo de la leguminosa <i>C. argentea</i> por bovinos infectados y no infectados con infecciones mixtas de nematodos gastrointestinales	35
3.3.1. Periodo de evaluación y animales experimentales	35
3.3.2. Manejo de animales y diseño experimental	35

3.3.3. Dieta experimental	38
3.3.4. Colección y procesamiento de muestras	38
3.3.5. Mediciones y técnicas de laboratorio	38
3.3.5.1. El consumo, materia seca, materia orgánica, proteína cruda, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido y lignina	38
3.3.5.2. Eliminación de huevos por gramo de heces	38
3.3.6. Análisis estadístico	39
IV. RESULTADOS	40
4.1. Experimento I.	40
4.1.1. Composición química de la dieta ofrecida y rechazada por bovinos	41
4.1.2. Consumo de materia seca	42
4.1.3. Consumo de proteína cruda por animales con dieta de leguminosa:gramínea a diferentes niveles de inclusión	43
4.1.4. Concentración de urea en suero sanguíneo de bovinos alimentados con dietas a diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea	44
4.1.5. Excreción de heces	45
4.1.6. Consumo y excreción de nitrógeno	46
4.1.7. Consumo de agua, excreción de orina total y pH de la orina	47
4.1.8. Derivados de purinas (DP)	49
4.1.9. Nitrógeno ureico	50
4.2. Experimento II	51
4.2.1. Consumo de materia seca en bovinos infectados y no con nematodos gastrointestinales	51
4.2.2. Tasa de sustitución del <i>Brachiaria arrecta</i> - pasto Tanner por <i>C. argentea</i> en bovino infectados y no con nematodos gastrointestinales	52
4.2.3. Eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales por gramo de heces	53
V. DISCUSIÓN	54
5.1. Calidad de la dieta según los tratamientos evaluados	54
5.2. Consumo de materia seca	55

5.3. Consumo de proteína cruda	56
5.4. Urea en sangre por efecto de los tratamientos evaluados	57
5.5. Nitrógeno en heces y orina	58
5.6. Derivados de purina	59
5.7. Consumo de forraje por animales infectados o no con nematodos gastrointestinales	60
VI. CONCLUSIÓN	62
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
VIII. Anexos	75

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Distribución aleatoria de los tratamientos en el cuadrado latino 4x4	30
Cuadro 2. Composición química de <i>Cratylia argentea</i> y <i>Brachiaria arrecta</i> ofrecida a bovinos F1 (Hostein x Cebú) a diferentes niveles de inclusión	40
Cuadro 3. Composición química de la dieta (g /kg de MS) rechazada por bovinos F1 (Hostein x Cebú) con diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea	41
Cuadro 4. Relación entre el consumo de MS y la excreción total de heces	45
Cuadro 5. Consumo y excreción de nitrógeno	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fotografía de <i>Cratylia argentea</i>	23
Figura 2. Diagrama del manejo de los animales durante el segundo experimento	37
Figura 3. Consumo de materia seca de bovinos con dietas a diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea	42
Figura 4. Consumo de proteína cruda por bovinos con dietas a diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea	43
Figura 5. Concentración de urea en suero sanguíneo de bovinos alimentados con dietas a diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea	44
Figura 6. Consumo de agua y excreción de orina de animales con dietas a diferente nivel de inclusión de leguminosa:gramínea	47
Figura 7. pH en la orina	48
Figura 8. Componentes de los derivados de purinas presentes en la orina	49
Figura 9. Concentración de N ureico en orina	50
Figura 10. Consumo de materia seca en bovinos infectados y no con NGI	51
Figura 11. Tasa de sustitución del pasto por la leguminosa	52
Figura 12. Eliminación de huevos por gramos de heces	53

ANEXOS

Anexo 1. Módulo de producción de vaquillas F1, CEIEGT–FMVZ–UNAM	75
Anexo 2. Instalaciones habilitadas para el desarrollo experimental	76
Anexo 3. Colecta de muestras	77
Anexo 4. Mandil colector de orina	78
Anexo 5. Digestibilidad <i>in situ</i>	79

RESUMEN

El presente estudio se realizó en el módulo de producción de vaquillas F1 “La Soledad” (CEIEGT-FMVZ-UNAM), mediante dos experimentos. El primero se realizó con la finalidad de evaluar el consumo de la leguminosa *Cratylia argentea* a niveles crecientes de inclusión en dietas mixtas con *Brachiaria arrecta*. Se utilizó un diseño de cuadrado latino 4 x 4, con toretes F1 (Holstein x Cebú) de 212±17 kg de peso vivo (PV). Se evaluaron cuatro niveles de inclusión de *C. argentea* y *B. arrecta*: T1) 0:100, T2) 15:85, T3) 30:70 y T4) 45:55. En cada animal, se tomaron muestras de sangre antes de ofrecer y 6 horas post-ofrecimiento del alimento para evaluar la concentración de urea (mg/dL) en plasma. Se recolectaron las heces y la orina diariamente para determinar nitrógeno (N). En el segundo experimento, se evaluó el consumo de *C. argentea* en bovinos infectados y no infectados con nematodos gastrointestinales (NGI). Se utilizó un diseño completamente al azar con 12 terneros (¾ cebú x ¼ Holstein) de 167 ± 18 kg de PV. Al inicio del experimento, los animales se desparasitaron con levamisol y albendazol a dosis terapéuticas. Después, los animales se distribuyeron en dos grupos de seis animales: 1) infectados y 2) no infectados). El grupo infectado se inoculó por vía oral con larvas infectantes de NGI mixtos. En los dos experimentos, los animales se alojaron en corraletas individuales (1.00 m ancho x 1.80 m largo x 1.40 m altura) para facilitar la toma de muestras y ofrecimiento de las dietas experimentales. Se determinó el consumo de materia seca (kg MS/día) mediante la medición del alimento ofrecido y rechazado. En los componentes de la dieta, se evaluó la proteína cruda (PC), la fibra detergente neutro (FDN), la fibra detergente ácido (FDA), la lignina (LIG) y la digestibilidad *in situ* (DISMO). En cuanto a los resultados del primer experimento, el consumo de materia seca para el T1, T2, T3 y T4 fue de 23 ± 0.72, 34 ± 1.26, 38 ± 0.95 y 44 ± 2.66 g de MS/kg de PV, respectivamente (P<0.05). La cantidad de PC en los componentes de la dieta, *C. argentea* y *B. arrecta*, fue de 193 ± 6.4 y 62 ± 2.8 g/kg de MS, respectivamente (P<0.05). En la leguminosa, la cantidad de FDN, FDA, LIG y DISMO fue de 649 ± 22.5, 414 ± 24.4, 201 ± 14.1 y 568 ± 39.7 g/kg de MS; mientras que para el pasto *B. arrecta* fue de 812 ± 13.9, 473 ± 5.7, 106 ± 2.6 y 532 ± 9.7. No hubo diferencias en la excreción de N en heces entre tratamientos (P>0.05). Pero la concentración de urea en suero sanguíneo sí fue diferente (P<0.01). En el segundo experimento, el consumo de los bovinos infectados y no infectados fue de 22.13 ± 0.23 y 19.57±0.76 g de MS/kg de PV, respectivamente (P<0.01). Lo anterior demuestra que los bovinos infectados con cargas bajas de NGI (150 huevos por gramo de heces, hpgh) disminuyen su consumo voluntario. Se concluye que se puede suplementar toretes hasta con un 45% de *C. argentea*, aumentando el consumo de PC; además se observó un efecto de sustitución entre alimentos de baja calidad nutricional por leguminosas con moderadas concentraciones de metabolitos secundarios en los animales infectados con NGI.

I. INTRODUCCIÓN

En el trópico húmedo de México, las parasitosis por nematodos gastrointestinales son uno de los principales problemas que afectan a la ganadería bovina en pastoreo. El control de estos parásitos se ha basado, durante décadas, en el uso de antihelmínticos químicos aplicados bajo diversos esquemas de desparasitación. Actualmente, la resistencia a los antiparasitarios de los nematodos gastrointestinales (NGI) de bovinos tiene una prevalencia elevada (Becerra-Nava *et al.*, 2014; Arnaud-Ochoa y Alonso-Díaz, 2012; Sutherland y Leathwick, 2011), por lo que es necesario buscar alternativas de control. El uso de plantas leguminosas con taninos (PT) se ha identificado como una alternativa de control parasitario debido al efecto antihelmíntico (AH) directo e indirecto que tienen sobre los NGI de rumiantes (Hoste *et al.*, 2006). La acción antiparasitaria de estas plantas, se atribuye a la presencia de compuestos polifenólicos en leguminosas de clima templado y en algunas leguminosas arbóreas de clima tropical (Alonso-Díaz *et al.*, 2008a; Alonso-Díaz *et al.*, 2008b; Hoste *et al.*, 2006). Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la incubación de larvas infectantes (L₃) de NGI en extractos con moderadas concentraciones de taninos reducen el desarrollo, la viabilidad, la motilidad y la capacidad migratoria de las mismas (Alonso-Díaz *et al.*, 2008a; Alonso-Díaz *et al.*, 2008b; Athanasiadou *et al.*, 2001; Molan *et al.*, 2000). Lo anterior se ha corroborado en estudios *in vivo* utilizando como modelo pequeños rumiantes que consumen voluntariamente plantas leguminosas con taninos, pero es necesario determinar el consumo de estas plantas por los bovinos.

Por otro lado, se conoce que los forrajes de regiones tropicales tienen menor valor nutrimental en comparación a los de regiones templadas. Lo anterior implica que es necesario complementar la dieta de los rumiantes, generalmente, con alimento balanceado que es caro y fabricado con insumos que compiten con la alimentación humana (Wit *et al.*, 1996). Las leguminosas tropicales, representan una alternativa alimentaria debido a que son una fuente proteínica de alta calidad y de bajo costo; además se adaptan fácilmente a diferentes suelos y condiciones

climáticas. Los principales atributos de las leguminosas tropicales para incorporarlas como alimento en las unidades de producción son: i) su elevado contenido proteico (14-28%), ii) la baja concentración de FDN (< 40%), iii) la buena aceptación por los animales, y iv) el incremento en los parámetros productivos (Lascano y Ávila, 1991). Sin embargo, una de las principales limitantes para su utilización en la ganadería es la presencia de algunos metabolitos secundarios (aminoácidos no proteínicos, glucósidos, fitohemaglutininas, compuestos polifenólicos, alcaloides, triterpenos, oxalatos, etcétera.), también considerados factores antinutricionales, que afectan el consumo voluntario y la digestibilidad en los rumiantes (Kumar, 1992).

En condiciones naturales, los rumiantes tienden a manejar una alimentación mixta, y con ello, a desarrollar mecanismos de reconocimiento de componentes adversos o favorables (sabor, efecto antihelmíntico AH) en la dieta (Provenza *et al.*, 1996), así como a seleccionar las partes de la planta que aportan un beneficio nutricional y cubren sus requerimientos (Zemmelink y Mannetje, 2002). Recientemente, se ha planteado la hipótesis que los animales tienen la posibilidad de seleccionar plantas bioactivas con efecto medicinal (Juhnke *et al.*, 2012), pueden auto-med icarse y de esta forma, reducir el uso de medicamentos (Lisonbee *et al.*, 2009). En pequeños rumiantes, se ha observado que animales parasitados consumen mayor cantidad de materia seca (MS) de plantas con metabolitos secundarios (por ejemplo los taninos), lo que disminuye la enfermedad mediante la expulsión de parásitos adultos establecidos o bien, reduce la tasa de fertilidad de las hembras parásitas (Villalba y Landau, 2012; Villalba *et al.*, 2012). Los estudios sobre la evaluación del consumo de materia seca (CMS) de leguminosas por bovinos infectados y no infectados con NGI son escasos. Es necesario generar información sobre el consumo de leguminosas en bovinos que aparte de su potencial nutritivo, tengan efecto antihelmíntico contra los NGI más prevalentes y virulentos del trópico. Esto permitirá que los bovinos utilicen la leguminosa como fuente de nutrimentos básicos para su supervivencia y producción y obtengan efectos benéficos adicionales como el control de parásitos.

En este estudio se seleccionó la leguminosa tropical *Cratylia argentea*, debido a su valor nutricional (proteína cruda de 23%; digestibilidad *in vitro* de materia seca que oscila entre 40 - 55%) y a la concentración moderada de taninos (Osuga *et al.*, 2005) y otros metabolitos secundarios como: flavonoides, cumarinas y terpenos (von Son-de Fernex *et al.*, datos sin publicar) que tienen efecto AH *in vitro* contra NGI (von Son-de Fernex *et al.*, 2012). Esta leguminosa tiene una adaptación excelente a zonas tropicales, buena capacidad de rebrote y retención foliar durante periodos de estiaje de hasta seis meses (Castillo *et al.*, 2013). También se ha reportado un buen crecimiento en suelos ácidos y poco fértiles; lo anterior se ha asociado al particular crecimiento de sus raíces, las cuales presentan un desarrollo radicular profundo de hasta 2 m de longitud. Alcanzando así una producción de forraje verde de 20 a 30 Ton/ha por corte (cada dos - tres meses dependiendo de la precipitación pluvial; Holmann y Lascano, 2001). El objetivo de éste trabajo de investigación fue determinar el consumo voluntario de la leguminosa tropical *C. argentea*, por toretes F1 (Holstein x Cebú), a niveles crecientes de inclusión en la dieta; así como evaluar el aprovechamiento del nitrógeno aportado en la dieta. Posteriormente, y una vez seleccionado el nivel de inclusión adecuado de la leguminosa en la dieta, se buscó evaluar el comportamiento de automedicación de los bovinos, mediante el ofrecimiento de dicha leguminosa en terneros infectados y no infectados con NGI.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Nematodos gastrointestinales y su impacto en la ganadería bovina

Las nematodosis gastrointestinales representan uno de los principales problemas de salud animal en las unidades de producción extensivas y semi-extensivas de bovinos en el mundo (Vázquez-Prats *et al.*, 2004), aun cuando en ocasiones, pueden pasar desapercibidas en muchas ocasiones debido a su naturaleza subclínica (Encalada-Mena *et al.*, 2009). En infecciones naturales, las nematodosis se presentan de manera mixta. Los géneros más prevalentes en las regiones tropicales y subtropicales de México son: *Haemonchus sp.*, *Mecistocirrus sp.*, *Cooperia sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Oesophagostomum sp.*, *Ostertagia sp.* (Quiroz-Romero *et al.*, 2009). Los animales jóvenes (4 a 12 meses de edad) son los más susceptibles a las nematodosis (Encalada-Mena *et al.*, 2009); pero, el ganado adulto también llega a verse afectado (Perri *et al.*, 2011; Charlier *et al.*, 2009). Los NGI producen daño tisular severo en el tracto gastrointestinal TGI, inflamación, ulceración, pérdida de las vellosidades intestinales y necrosis, lo cual ocasiona la manifestación clínica de la enfermedad (emaciación progresiva, anemia, diarrea, disminución tanto del consumo voluntario, como de la conversión alimenticia). El desarrollo de la enfermedad a corto o mediano plazo, ocasiona fuertes pérdidas económicas dentro de las unidades de producción, por concepto de: i) disminución de hasta 50% en la ganancia de peso al primer año de edad, ii) descenso en la tasa de fertilidad por retraso a la pubertad, iii) disminución en la producción láctea y iv) pobre deposición grasa en la canal (Charlier *et al.*, 2009; Perri *et al.*, 2011). Otras pérdidas económicas se deben a la compra de medicamentos para el control de las nematodosis. En 1997, Nielsen reportó en Norteamérica un gasto anual aproximado a los 14 millones de dólares por la compra de antihelmínticos (Morris *et al.*, 2002). También se ha demostrado que las nematodosis afectan el desempeño productivo en vacas lecheras, debido a una posible acción e inhibición de diversas hormonas metabólicas (leptina, hormona tiroidea, gastrina, colecistoquinina) y galactopoyéticas (prolactina,

hormona del crecimiento, factor del crecimiento insulínico tipo1), que se refleja en una reducción en la producción láctea de 1.2 kg de leche por vaca/día (Charlier *et al.*, 2009; Perri *et al.*, 2011; Hawkins, 1993). La infección artificial con trichostrongilidos ocasiona una depresión del consumo voluntario de 15 al 50%, digestibilidad de nutrientes, hay menor retención de nitrógeno, deficiencia en el desempeño metabólico y mala utilización tanto de proteínas, como de minerales y energía (Basabe *et al.*, 2009; Villalba y Landau, 2012). Estos efectos adversos se observaron con niveles de eliminación menores a los 300 huevos por gramo de heces. Diversos estudios coinciden en que las nematodosis gastrointestinales en los animales de producción, ponen en continuo riesgo la rentabilidad de las unidades de producción de bovinos (Charlier *et al.*, 2009). En México, la ganadería de doble propósito ocupa más de 48 millones de hectáreas, donde se concentran aproximadamente el 45% del inventario bovino nacional (Chalate-Molina *et al.*, 2010); cuyo principal problema sanitario son las parasitosis (Vazquez-Prats *et al.*, 2004). Por lo tanto, el establecimiento eficiente de calendarios de control de parásitos puede mejorar los estándares nacionales de producción de leche y/o carne.

2.1.2. Ciclo biológico de los nematodos gastrointestinales (NGI)

El ciclo biológico de los NGI es directo y se divide en dos fases: pre-parasítica o de vida libre y parasítica. En la fase pre-parasítica, los huevos (16 - 32 blastómeros según la especie) se eliminan junto con las heces al ambiente. Cuando las condiciones climáticas son favorables (20° C y 80% de humedad relativa), el huevo eclosiona durante las primeras 24 a 30 horas y se desarrolla la larva uno (L₁); la cual, se alimentan de microorganismos presentes en las heces durante un periodo aproximado de 2 a 3 días que evoluciona a L₂. La segunda fase larvaria, se desarrolla a larva infectante (L₃) de 3 a 6 días (5 - 7 días *Haemonchus sp.*, *Trichostrongylus sp.*, *Ostertagia sp.* y *Cooperia sp.*). El género *Nematodirus sp.*, a diferencia de otros NGI, el desarrollo de sus tres fases larvarias se lleva a cabo dentro del huevo y dura 14 días en promedio, tras los

cuales eclosiona una L₃. La L₃ de los NGI se caracteriza por presentar una retención cuticular de su fase anterior, mecanismo mediante el cual ésta adquiere una vaina que le protegerá del estrés ambiental, hasta ser ingerida por su hospedador definitivo. Estas larvas infectantes desarrollan diversos mecanismos que les garantizan la continuidad de su ciclo biológico: el fototropismo positivo a la luz tenue, hidrotropismo positivo y la capacidad que poseen para ejercer una migración vertical por los pastos para situarse en la sección media-alta de la hoja, y sean ingeridas por los rumiantes (Niezen *et al.*, 1998).

La fase parasitaria inicia a partir de la ingestión de la L₃ por el hospedero definitivo. En su tránsito rumeno-omasal, se lleva a cabo el proceso biológico de desenvaine larvario, que confiere a la larva su capacidad infectante, marcando la transición entre la fase pre-parasítica y parasítica (Ozerol y Silverman, 1972). Después de desenvainar, la larva migra por el TGI donde dependiendo del género parasitario, penetra diversas zonas de la mucosa digestiva (*Ostertagia sp.* penetra en la base de las glándulas gástricas en la región antropilórica; *Haemonchus sp.* en la mucosa fúndica del abomaso; *Trichostrongylus sp.* penetra el primer tercio del intestino delgado, entre el epitelio y la membrana basal de la mucosa; *Cooperia sp.* y *Nematodirus sp.* se localizarán en la mucosa del intestino delgado, entre las vellosidades intestinales), para continuar con su ciclo biológico. De 15 a 21 días post-ingestión, la larva alcanza el estadio adulto y culmina su establecimiento parasitario, para posteriormente llevar a cabo la cópula e iniciar con la producción de huevos entre los días 16 y 23 posinfección (21 - 26 días para *Nematodirus sp.* (Cordero-del-Campillo y Rojo-Vazquez, 1999).

2.1.3. Control de nematodos gastrointestinales (NGI)

El objetivo del control de NGI es reducir la población parasitaria a niveles compatibles con la salud y el desempeño productivo. Esto se logra mediante la interrupción del ciclo biológico en su fase preparasítica (a nivel ambiental) o parasítica (dentro del hospedero). Existe una amplia gama de opciones de control que se clasifican en: químicas, inmunológicas, de manejo y biológicas (Jackson y Miller, 2006). Sin embargo, previo a la implementación de cualquier método de control contra los NGI, se deben considerar diversas variables relacionadas con la epidemiología parasitaria. Las principales variables con influencia directa sobre el control parasitario, son: i) las condiciones propias del hospedador (el estado nutricional, edad y estado inmune), ii) las relacionadas con los NGI (género y estatus de resistencia), iii) las condiciones ambientales, iv) el sistema de producción (intensivo, extensivo, semi-extensivo y familiar o de traspatio) y, v) el manejo zootécnico y/o médico que se realiza en la unidad de producción.

2.1.4. Control químico

Desde su aparición en el mercado internacional, hace 51 años, el manejo de las nematodosis se ha basado en el uso de moléculas químicas o antihelmínticos (AH), que son el principal método de control contra las parasitosis debido a su fácil aplicación, amplio espectro, y a su capacidad para maximizar la productividad y eficacia alimenticia del ganado (Jackson y Miller, 2006). Las familias más utilizadas son los benzimidazoles (BZD), imidazotiazoles (IMZ) y lactonas macrocíclicas (LM) (Nari *et al.*, 1996). Después de 25 años de investigación, se logró desarrollar una nueva molécula química, la cual es un derivado amino-acetonitrílico (AAD), y ha mostrado una eficacia del 100% contra cepas de NGI multirresistentes en unidades de producción europeas (Kaminsky *et al.*, 2011). En principio, y con base en los beneficios obtenidos en la salud y producción animal se creyó que la llegada de los AH químicos sería la solución a largo plazo al problema de NGI en el ganado; sin embargo, la rápida aparición de la resistencia

antihelmíntica (RA) ha mostrado que depender de un método de control no es sustentable.

2.2. Métodos alternativos de control de nematodos gastrointestinales

La creciente emergencia de resistencia en los NGI de bovinos, aunado a la preocupación mundial sobre la utilización de compuestos químicos en la producción, y su posible impacto tanto en el ambiente como en la salud humana, ha desencadenado una serie de investigaciones enfocadas a la búsqueda de opciones que optimicen la salud y el bienestar animal, sin poner en riesgo la sustentabilidad de las unidades de producción (Athanasiadou *et al.*, 2001; Rochfort *et al.*, 2008). Los métodos alternativos de control de NGI se clasifican en: control de parásitos en vida libre (manejo de pastoreo, control biológico) y control de parásitos dentro del hospedador (inmunonutrición, selección genética, vacunación, agujas de cobre y plantas bioactivas o medicinales) (Jackson y Miller, 2006). Debido a la relación con los objetivos de este estudio, se describirá la inmunonutrición y las plantas bioactivas o medicinales como un método alternativo de control de NGI.

2.2.1. Inmunonutrición.

La nutrición y las parasitosis son dos de las múltiples dificultades que enfrentan las unidades de producción para obtener un nivel óptimo de producción. La relación entre los parásitos y la nutrición es muy estrecha y su interacción tiene efectos en los animales (Basabe *et al.*, 2009). La comprensión de dicha relación puede controlar o disminuir los efectos adversos de las nematodosis gastrointestinales (Viney, 2002), enfatizando en la resistencia y resiliencia de los propios animales mediante el manejo adecuado de los recursos nutricionales (Houdijk *et al.*, 2012). El sistema inmunológico de los rumiantes es la base en la resistencia contra los NGI y se manifiesta por la capacidad del hospedero tanto para evitar el establecimiento larvario como para influenciar negativamente en la reproducción y supervivencia de los nematodos adultos ya establecidos (Viney, 2002). Como primer respuesta a la parasitosis, se presenta una reacción antigénica a diversas

sustancias de la secreción y excreción parasitaria, desencadenando una respuesta inmune de tipo humoral (Shallig *et al.*, 1996) o innata, la cual evoluciona a una reacción celular o adquirida, mediada principalmente por proteínas como las citocinas y eosinófilos. Ante un cuadro de nematodosis gastrointestinal, la disminución del consumo voluntario no sólo genera pérdidas en ganancias de peso, si no que retrasa los procesos dirigidos para el establecimiento de la homeostasia fisiológica. Existen varias teorías asociadas al daño que induce al estado de anorexia en los animales. Dentro de los principales factores asociados a dicho estado encontramos: i) la actividad hormonal, donde se involucra la acción de diversos neuropéptidos como el factor de liberación de corticotropina, el cual actúa fisiológicamente inhibiendo el apetito del animal (Coop y Holmes, 1996); ii) dolor agudo; iii) disminución en la motilidad intestinal; iv) alteración en la digestión de las proteínas, disponibilidad de aminoácidos y aumento en la producción de hormonas gastroentéricas como la colecistoquinina y gastrina (Hawkins, 1993). Así mismo, se ha sugerido que el daño ocasionado en la mucosa gástrica altera la función glandular, lo que a su vez genera una disminución de la producción de ácido clorhídrico, aumento del pH gástrico, lo cual impide la activación del pepsinógeno; y en consecuencia, se presenta una disminución e inclusive la ausencia de digestión de las proteínas (Min y Hart, 2003), favoreciendo a la disminución de la motilidad rumino-reticular, produciendo un estado de estasis alimentaria y con ello reducción del apetito (Coop y Kyriasakis, 1999). La pérdida de dos tipologías de proteína es otra de las alteraciones que cobran importancia en el proceso infeccioso de las nematodosis gastrointestinales. Las proteínas que se pierden son de origen exógeno (por falta de absorción o disponibilidad) y endógeno, ya sea en forma de células provenientes de la descamación epitelial o por la extravasación de las proteínas plasmáticas de alto valor biológico (especialmente albumina y globulinas) hacia el lumen gastrointestinal por pérdida del cemento intercelular en las zonas de lesión (Coop y Holmes, 1996; Knox y Steel 1996; Knox *et al.*, 2006) lo cual, eventualmente también permite el paso del pepsinógeno al plasma (Romero y Boero, 2001), generando una disminución de

dicha enzima en el TGI y con ello una disminución de la digestión proteínica (Min y Heart, 2003). Hawkins (1993) reporta que asociado al estado de hipoproteinemia, se presenta una disminución en la disponibilidad de aminoácidos, la cual puede evaluarse por el aumento en la concentración de nitrógeno en orina y heces. Ante los estados de hipoproteinemia y disminución energética, el sistema inmunológico celular se ve directamente afectado tanto en número como en morfología, siendo la fagocitosis el sistema de mayor afección (Nari y Fiel, 1994). De acuerdo con Sykes (2010), el costo nutricional que ejerce la reacción inmunológica en el hospedero se debe a factores como:

1. Aumento en la actividad metabólica durante la activación de las células de la inmunidad; reclutamiento y activación de leucocitos; y al aumento por duplicado o triplicado en el consumo de oxígeno, glucosa y glutamina (Colditz, 2008).
2. Disponibilidad de nutrientes reducida debido a la anorexia y mala absorción.
3. Alteración en las prioridades de la utilización de nutrientes durante la activación inmunológica (impide su utilización por tejidos no inmunológicos), asimismo se presenta un aumento del catabolismo proteínico en músculo esquelético y anabólico en el hígado y TGI.
4. La rápida producción de células de la inmunidad (origen proteínico).
5. Reparación del daño ocasionado en el tejido gastrointestinal del hospedador.

Sin embargo, y a pesar de los daños generados por los parásitos en los animales, diversos investigadores han reportado que la complementación proteínica de los animales con infecciones por NGI, logran establecer la homeostasia fisiológica necesaria para mantener el desempeño productivo de los animales. Knox *et al.* (2006) reportan que la suplementación con 17 g de proteína metabolizable (PM) sobre el requerimiento normal en ovinos, permite compensar las pérdidas en el organismo del animal. Así mismo, se ha reportado que el aporte de PM en la dieta de ovinos infectados con NGI, puede reducir hasta en un 50% la eliminación de huevos en heces, en un lapso de una semana tras su suplementación (Kyriazakis

y Houdijk, 2006). Gennari *et al.*, (1995) reportan que los becerros con mayor porcentaje proteico en su dieta, mostraron una baja población parasitaria, menor semiología clínica y menores alteraciones bioquímicas y hematológicas. Resultados que permiten concluir que la nutrición es un factor esencial para mantener niveles óptimos en el bienestar, salud y desempeño animal; así como para mejorar la resistencia y resiliencia de los mismos contra las nematodosis gastrointestinales (Hoste *et al.*, 2008; Houdijk, 2012).

2.2.2. Plantas medicinales y efecto antihelmíntico (AH) de leguminosas forrajeras.

El uso de plantas medicinales y/o compuestos bioactivos se ha propuesto como una alternativa para el control de NGI en rumiantes. La etnoveterinaria es una práctica que se utiliza desde tiempos remotos (Githiori *et al.*, 2006), se refiere al uso de plantas medicinales para el tratamiento de las enfermedades en los animales (Barrau *et al.*, 2005). Para disminuir el uso de AH químicos, se han realizado estudios sobre las propiedades antiparasitarias de los metabolitos secundarios de las plantas (MSP), con énfasis en leguminosas forrajeras. Los MSP son compuestos que no se relacionan directamente con el crecimiento, desarrollo o reproducción de las plantas, pero que fungen como mecanismo de defensa (bactericidas, fungicidas, insecticidas, nematodocidas) o se producen ante situaciones de estrés. Los MSP se clasifican en: i) compuestos polifenólicos (taninos, fitoestrógenos y cumarinas), ii) toxinas nitrogenadas (alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos y lectinas), iii) terpenos (lactonas sesquiterpénicas, glucósidos cardiacos, saponinas), iv) hidrocarburos poliacetilénicos y oxalatos, entre otros (Ramos *et al.*, 1998; Rios-de Alvarez *et al.*, 2012). Dentro de estos, posiblemente los compuestos polifenólicos son los más estudiados debido a su efecto AH directo y/o indirecto (Hoste *et al.*, 2012). Las primeras evidencias del efecto AH de los compuestos polifenólicos (CP) se encontraron al comparar la eliminación de huevos en heces de pequeños rumiantes pastoreando con leguminosas de clima templado (Hoskin *et al.*, 2000;

Niezen *et al.*, 1995); y posteriormente, diversos investigadores enfocaron sus trabajos en el estudio del efecto AH *in vitro* de los taninos sobre larvas infectantes L₃ de diversas especies de NGI, mediante la utilización de extractos de leguminosas (Alonso-Diaz *et al.*, 2008a; Alonso-Diaz *et al.*, 2008b; Novobilsky *et al.*, 2011; Novobilsky *et al.*, 2013; von Son-de Fernex *et al.*, 2012).

Dichos estudios han permitido concluir que algunos MSP ejercen un efecto AH en larvas infectantes (L₃) como: inhibición de la eclosión de huevos y desenvaine larvario, disminución en la motilidad, inhibición del desarrollo y alimentación, y una afectación en la fertilidad de las hembras. Efectos asociados directamente a la presencia de diversos CP y a su capacidad para precipitar proteínas (Hoste *et al.*, 2006). Las estructuras parasitarias están principalmente constituidas por proteínas, por lo que, la formación de complejos estables entre los CP y las proteínas estructurales de los NGI, impedirá que se lleve a cabo el establecimiento y/o desarrollo parasitario adecuado. Sin embargo, los estudios elaborados con leguminosas tropicales han sido principalmente por medio de estudios *in vitro* (Ademola y Eloff, 2010; Alonso-Diaz *et al.*, 2008a; Alonso-Diaz *et al.*, 2008b; Cenci *et al.*, 2007; Minho *et al.*, 2008; Novobilsky *et al.*, 2013; von Son-de Fernex *et al.*, 2012); siendo pocos los estudios *in vivo* que se han llevado a cabo, y todos enfocados a los pequeños rumiantes (Hernandez-Villegas *et al.*, 2012; Martinez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2010; Vatta *et al.*, 2011).

2.2.2.1. Compuestos polifenólicos

Los CP son aquellos MSP producidos durante la síntesis de aminoácidos aromáticos, a partir del ácido shiquímico (Swain, 1979). No constituyen un grupo químico. Sin embargo, contienen una gran variedad de estructuras moleculares. Los CP se caracterizan por su amplia actividad biológica (precipitación proteica y formación de complejos con polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas), la cual cobra gran interés tanto médico (antiinflamatorio, antioxidante, antimicrobiano, potencial anticarcinogénico) como industrial (Cushnie y Lamb, 2011; Handique y Baruah, 2002; Wojdylo *et al.*, 2007). En general, su estructura química está conformada por un número variable de moléculas de carbono, hidrógeno y oxígeno (grupos hidroxilo (-OH) + hidrocarburo aromático), que dependiendo la cantidad y su localización dentro de la molécula, darán origen a múltiples compuestos con denominación y función diferente (Waghorn, 2008); agrupándose en tres categorías i) ácidos fenólicos, ii) flavonoides, y iii) taninos (Isaza, 2007).

Los flavonoides poseen una estructura básica de 15 átomos de carbono dispuestos en tres anillos (A-B-C); existen 14 clases de flavonoides, y su clasificación dependerá del nivel de oxidación y saturación en los anillos de carbono bioactivas (Wojdylo *et al.*, 2007). Así mismo, los diferentes compuestos incluidos en cada clase varían de acuerdo al patrón de sustitución de los anillos A y B; influenciando directamente la estabilidad del radical fenoxílico, y con ello sus propiedades bioactivos (Wojdylo *et al.*, 2007). Los taninos son fenoles hidrosolubles cuyo peso molecular varía entre 500 y 3,000 daltones (Da) y su característica principal es su gran capacidad de precipitación proteínica, de alcaloides, coloides y carbohidratos. Los taninos han sido clasificados según su complejidad molecular, en tres diferentes grupos: i) taninos hidrolizables, ii) taninos derivados del ácido elágico glucosilados o no, y iii) taninos condensados (TC); siendo éstos últimos los de mayor interés médico ya que no producen intoxicación en el ganado. Los taninos condensados o derivados de

proantocianidinas, son compuestos polifenólicos conformados por unidades de flavonoides enlazadas mediante ligaduras de carbono (C-C) (Schofield y Pell, 2001). La longitud de cadena de los TC es variable, presentándose desde dímeros, hasta polímeros de 20 unidades de flavonoides (Waghorn, 2008). Dichos compuestos se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas y suelen producir antocianidinas por degradación ácida, razón por la cual también se les conoce como proantocianidinas.

La característica principal de los TC es su capacidad de formar complejos con proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos, esteroides, alcaloides y saponinas. Los factores que determinan la formación de dicho complejo son: tamaño de la molécula, composición de aminoácidos, peso molecular de la proteína y el pH (Haslam, 1996). Por lo general, la estabilidad molecular es elevada y dependiente de diversos factores. Cuando la interacción entre moléculas se da mediante enlaces hidrofóbicos y de hidrógeno, ésta tendrá una naturaleza reversible; sin embargo, cuando los grupos fenólicos sufren un proceso de oxidación, su unión será irreversible, convirtiéndose en una quinona. Así mismo, la formación de complejos tiene una naturaleza de tipo pH dependiente, formándose cuando éste es cercano a neutro y desasociándose cuando el pH es menor o igual a tres. El complejo tanino-proteína se forma a partir de enlaces de hidrógeno entre los grupos fenólicos de los taninos y el grupo cetoamida de las proteínas (Haslam, 1996), este proceso de formación es normalmente reversible y tanto las proteínas como los taninos pueden recuperarse intactos. No obstante, si dicho compuesto entra en contacto con un ambiente alcalino y con oxígeno, los polifenoles pueden oxidarse a quinonas y éstas formar enlaces covalentes con aminoácidos nucleofílicos (lisina, cisteína) de asociación irreversible (Hagermann *et al.*, 1998).

2.2.2.1.1. Efecto de los compuestos polifenólicos en la nutrición de los rumiantes ¿benéficos o detrimentales?

La actividad de los compuestos polifenólicos en la nutrición de rumiantes ha sido reportada con efectos, tanto benéficos (mayor concentración de proteína de sobrepaso para su absorción, prevención de timpanismo) como detrimentales (alteración en la digestión, disminución del consumo voluntario, sensación astringente, disminución de la actividad microbiana en rumen por deficiencia de amonio); sin embargo, se sugiere que la presentación de uno u otro dependerá directamente de la naturaleza y concentración de los mismos, así como de la especie animal que les ingiere y su capacidad de adaptación (Waghorn, 2008).

Se ha reportado que elevadas concentraciones de CP en la dieta de los rumiantes, pueden afectar de forma negativa el consumo voluntario y la digestión de fibra y proteína, resultando en una baja producción animal. Concentraciones bajas a moderadas (4.6%) de dichos compuestos han mostrado una mejor utilización del nitrógeno en los animales (Barahona *et al.*, 1996; Carulla, 1994). Dada su capacidad de precipitación de la proteína, los taninos tienen la capacidad de reducir la solubilidad y degradación ruminal de la misma, permitiendo en los rumiantes una mayor eficiencia en la utilización del nitrógeno por un incremento en su flujo, y en la absorción de aminoácidos de mejor calidad a nivel del duodeno (Bernal-Bechara, 2007). Dentro de los efectos benéficos reportados por Min *et al.* (2003) se mencionan mejoras en diversos parámetros productivos (reproducción, producción láctea y valor nutricional) y prevención de timpanismo, debido a una reducción en la producción de gases ruminales. Asimismo, se ha reportado que con el consumo de CP se observa una disminución en la carga parasitaria de los rumiantes, especialmente contra los NGI abomasales. Se ha reportado que la presencia de taninos en la dieta de los rumiantes puede modificar las rutas de excreción del nitrógeno, disminuyendo la cantidad eliminada en orina e incrementando la excretada por heces, lo cual a su vez, desde un punto de vista ecológico, tiene un efecto benéfico en el suelo (Flores *et al.*, 1999).

2.2.2.1.2. Mecanismos de adaptación de los rumiantes a los compuestos polifenólicos

El estudio de los posibles mecanismos de adaptación de los animales hacia los MSP ha sido poco estudiado en ganado bovino; sin embargo, se sabe que los rumiantes han desarrollado diversas adaptaciones tanto fisiológicas como etológicas que permiten contrarrestar los efectos de los mismos (Provenza *et al.*, 1990). Se reporta que los animales que consumen continuamente forrajes con elevadas concentraciones de MSP, pueden disminuir los efectos detrimentales ejercidos mediante otras adaptaciones fisiológicas como la secreción de proteínas endógenas (glicoproteínas), aumento en la secreción de mucosidad oral y la adaptación de la flora ruminal para la detoxificación de diversos MSP (Ramos *et al.*, 1998; Silanikove, *et al.*; 1996). Del mismo modo, trabajos de investigación como los de Alonso-Díaz *et al.* (2012) y Ammar *et al.* (2011), hacen referencia a las posibles adaptaciones fisiológicas de los pequeños rumiantes hacia algunos CP, especialmente con los taninos, reportando la presencia y/o secreción de proteínas salivales, como las proteínas ricas en prolina (PRP), las cuales poseen una elevada afinidad para la formación de complejos con diversos CP, lo cual permite un mayor consumo de forrajes con elevadas concentraciones de MSP, sin ejercer efectos detrimentales en los pequeños rumiantes.

2.2.2.2. Automedicación

Se sabe que los animales modifican su conducta alimentaria con base en sus necesidades evolutivas, permitiéndoles una mejor adaptación al medio ambiente al que se encuentran expuestos. También, se ha reportado que los animales tienen la capacidad de modificar su preferencia por ciertos alimentos que les permitan mejorar su nutrición; sugiriendo que los animales pueden seleccionar forrajes con propiedades medicinales que les permitan reducir el índice de enfermedades (Lisonbee *et al.*, 2009). En pequeños rumiantes infectados con *H. contortus* se ha reportado un aumento en el consumo de plantas con taninos (Martínez-Ortiz-de-Montellano *et al.*, 2010). Tomando en consideración la literatura reciente que demuestra la capacidad de los animales para seleccionar plantas bioactivas (Juhnke *et al.*, 2012), se puede suponer que si los animales tuvieran acceso a plantas con dichas propiedades, éstos podrían automedicarse cuando les fuera fisiológicamente necesario, reduciendo así la utilización de medicamentos dentro de la unidad de producción (Lisonbee *et al.*, 2009).

Otros estudios se han basado en el potencial AH de algunos forrajes y plantas, en los cuales se ha logrado demostrar que los animales con altas cargas parasitarias, tienden a ingerir una mayor cantidad de plantas ricas en MSP disminuyendo así la carga parasitaria (Villalba y Landau, 2012; Villalba *et al.*, 2012).

2.3. Consumo voluntario

El consumo voluntario es uno de los mejores indicadores del valor nutritivo de un alimento para bovinos (Macedo *et al.*, 2010) quienes demandan diariamente nutrimentos, que deben ser cubiertos por el alimento disponible. Esto depende de dos aspectos elementales: i.) calidad nutritiva y ii.) la cantidad consumida por el animal. Ambas condiciones deben cumplirse, puesto que es posible que un alimento tenga el contenido ideal de nutrimentos, pero si la cantidad consumida por el animal no es suficiente, las necesidades no quedarán satisfechas. Por otro lado, aun cuando la cantidad consumida sea la indicada, si la calidad es mala, el

déficit estará presente. De acuerdo con Forbes (1995) el consumo voluntario es “la cantidad de materia seca consumida por un animal durante un período en el cual tiene acceso libre al alimento”. Por otro lado Freer (1981) sugiere que el consumo voluntario, implica el control ejercido por el animal y no de quien lo maneja; y menciona que, en animales confinados, lo indicado es medirlo como la cantidad consumida cuando se ofrece un exceso de 15% de los requerimientos, y se le permite el acceso al menos durante 20 horas continuas.

El consumo de alimento está influenciado en primer lugar por la sensación de hambre y saciedad; considerando que el primero produce una sensación inquietante y el segundo resulta en algo generalmente placentero (Forbes, 1995). Aunque se propone que un animal ingiere la cantidad de alimento que satisface sus requerimientos, esto ha sido puesto en duda para el caso de rumiantes (Emmans y Kyriazakis, 2001). Los factores implicados en la regulación del consumo se han clasificado de acuerdo a su origen; algunos de ellos son inherentes al animal, otros al alimento y otros del ambiente.

2.4. Proceso de degradación del forraje para la obtención de nutrimentos

Para realizar la degradación de los forrajes, el tracto digestivo de los bovinos cuenta con diversos microorganismos como bacterias, protozoarios y hongos, que son los encargados de degradar las partículas del forraje para facilitar el aprovechamiento de los nutrimentos que utiliza el animal para cubrir sus requerimientos. Este proceso está influenciado principalmente por la edad del animal, la calidad y cantidad de la fibra del forraje, nivel nutricional del animal, frecuencia de alimentación y el uso de suplementos (Van Lier y Regueiro, 2008). De esta forma, la digestión de la proteína depende de su degradabilidad para ser atacada por las bacterias proteolíticas ruminales, o para utilizarse directamente por el tracto posterior digestivo como proteína verdadera o sobrepasante, que es la que genera la mayor cantidad de aminoácidos esenciales indispensables para la producción de carne o leche. Cuando se le suministra una dieta balanceada al bovino y suficiente nitrógeno amoniacal a los microorganismos ruminales, estos no

degradan la proteína de los alimentos, que es de alta calidad, y por lo tanto puede ser aprovechada con mayor eficiencia por el organismo del animal (Villalobos, 2000; Galindo y Marrero, 2005).

La degradación de la fibra del forraje se realiza principalmente en el rumen por bacterias de los géneros *Ruminococcus* y *Butyrivibrio* que degradan la celulosa. Esta degradación también se puede llevar a cabo en el intestino delgado como en el ciego, aunque en baja proporción. Lo anterior depende de factores como el tipo de dieta y forraje, la tasa de pasaje y el tamaño de partículas. El pH del rumen cercano a la neutralidad, favorece el incremento de la población de las bacterias celulolíticas y por lo tanto, la disponibilidad de ácidos grasos volátiles que son la principal fuente de energía del rumiante (Marden *et al.*, 2008 y Moallen *et al.*, 2009). Una de las metodologías para determinar el aprovechamiento de los alimentos, en este caso forrajes, es la digestibilidad in vivo con el uso de corraletas individuales que permiten hacer mediciones de consumo, excreción de heces y orina de una forma más precisa (NRC, 2000; NRC, 2001). Para la realización de este estudio se diseñaron y construyeron 12 corraletas con la finalidad de facilitar las mediciones arriba mencionadas.

2.5. Generalidades de las proteínas

Las proteínas son las macromoléculas más abundantes de las células y sus componentes y desarrollan diversas funciones biológicas. Todas las proteínas están formadas por diferente número y combinaciones de un grupo de 20 aminoácidos mínimo que poseen en su estructura al menos un átomo de nitrógeno (Nelson y Cox, 2000). A la proteína de la dieta se le refiere como proteína cruda, la cual para las materias primas y alimentos se define como el contenido de nitrógeno multiplicado por 6.25. Lo anterior se basa en la presunción de que el contenido de nitrógeno en los ingredientes es de 16 g por cada 100 g de proteína (NRC, 2001).

2.5.1. Proteínas en la alimentación del ganado bovino

El N que se ofrece en exceso o por arriba de los requerimientos de los animales, se excreta como urea en la orina principalmente. La cantidad de nitrógeno excretado depende del CMS, la concentración proteínica y la digestibilidad de la dieta.

Para hacer eficiente el uso de N en la producción animal y evitar su desperdicio, es necesario que una primera estrategia sea formular raciones con cantidades de proteína en la dieta que no rebasen los requerimientos (Wu *et al.* 2001). Mulligan *et al.* (2004) reportaron una asociación lineal positiva entre el consumo de nitrógeno y el nitrógeno excretado en orina, heces y leche. Wu y Satter (2000) demostraron que al reducir el contenido de proteína de la ración, se redujo la excreción total y urinaria de nitrógeno.

2.5.2. Proteína microbiana

De acuerdo con el papel que juegan los microorganismos ruminales en la degradación de las estructuras de la pared celular y que la proteína microbiana tiene una gran calidad, las raciones de los rumiantes deben ser formuladas para permitir el máximo crecimiento microbiano (Carro, 2001). Los microorganismos utilizan el amonio, los aminoácidos y pequeños péptidos para producir proteína que se compone de 75% de proteína verdadera y 25% de ácidos nucleicos (AFRC, 1993). La proteína microbiana contribuye entre el 40 y el 90% de los aminoácidos que llegan al intestino delgado, aunque en ocasiones puede alcanzar el 100% (Samaniego, 1996). Mientras que el aporte de nitrógeno microbiano (NM) al animal varía entre 14 y 60 g (NM)/kg de materia orgánica digestible fermentable en el rumen (ARC, 1984). Esta variación se debe a la influencia de varios factores relativos a la dieta o al ambiente ruminal (Bahadur, 1997). Así, los aminoácidos que llegan al duodeno pueden tener tres orígenes: la proteína microbiana sintetizada en el rumen, la sobrepasante y la de origen endógeno (Calsamiglia *et al.*, 1996). La proteína microbiana es la forma más económica de suplementar proteína al ganado; además, la composición de aminoácidos de la proteína verdadera es similar a la de la proteína de los principales productos animales (Verbic, 2002).

2.6. Derivados de purinas

Los derivados purínicos son constituyentes de las células microbianas, que se encuentran principalmente en forma de nucleótidos y los más representativos son los de adenina y de guanina. Los ácidos nucleicos microbianos que abandonan el rumen sufren una digestión extensiva en el intestino delgado, donde los nucleótidos de purina son hidrolizados en nucleósidos y bases libres que son absorbidas. En los bovinos, la gran mayoría de las bases libres son degradadas hasta ácido úrico en su paso por la mucosa, debido a la alta actividad de la xantina oxidasa. Estas bases libres tienen una disponibilidad limitada para incorporarse en

los ácido nucleicos tisulares, proceso al cual se le denomina reciclaje (Roa y Céspedes, 2011). Sin embargo, en el hígado, la actividad de las enzimas para el reciclaje y la degradación es muy activa, y habrá competencia por los substratos, por lo cual las purinas absorbidas que no sean incorporadas en los ácidos nucleicos tisulares son completamente convertidos en productos metabólicos finales: alantoína y ácido úrico (Chen y Gomes, 1995; Sandoval y Herrera, 1999). La excreción urinaria es la primera ruta para la disposición de los derivados púricos, siendo la saliva y la leche otras vías de excreción que cuantitativamente representan una pequeña proporción. Debido a que las purinas que llegan al duodeno pueden ser posteriormente metabolizadas por el animal y excretadas en la orina en forma de alantoína y ácido úrico, se ha propuesto a la excreción urinaria de derivados púricos como un parámetro válido para estimar, a través de ecuaciones, el flujo duodenal de proteína microbiana (Chen *et al.*, 1990).

2.7. Generalidades de leguminosas arbustivas para la alimentación del ganado

En leguminosas tropicales para pastoreo, es prioritario encontrar especies con alto nivel de utilización y persistentes. En leguminosas para corte o de semilla, la cantidad y calidad del material comestible es de primera importancia; mientras que en árboles y arbustos, la persistencia a largo plazo, la cantidad y calidad del forraje utilizable junto con la accesibilidad y la facilidad de cosecha, constituyen aspectos esenciales (Coates, 1995). Especies como *Gliricidia sepium* (cocuite), *Leucaena leucocephala* (leucaena, guaje o huaxin) o *Eritryna poepigiana* (colorin o moté), se han utilizados en la alimentación animal en el trópico por su aporte nutricional. No obstante, pueden tener algunas desventajas como la intolerancia a suelos ácidos y periodos secos muy prolongados, así como la presencia de compuestos secundarios. En el trópico húmedo de México, con predominancia de suelos ácidos es imperativo encontrar especies adaptadas a esta limitante edáfica (Enríquez-Quiroz *et al.*, 2003). Leguminosas como *Cratylia argentea*, ofrecen grandes beneficios a la producción ganadera en el trópico mexicano.

2.7.1. Descripción botánica de la leguminosa *Cratylia argentea*

El género *Cratylia* pertenece a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Papilionoideae*, tribu *Phaseoleae* y subtribu *Diocleinae*. Es una planta que crece en forma de arbusto pero puede convertirse en liana de tipo voluble cuando está asociada a plantas de porte mayor. Ramifica desde la base del tallo y se reportan hasta 11 ramas en plantas de 1.5 a 3.0 m de altura. Las hojas son trifoliadas y estipuladas, los folíolos son membranosos o coriáceos con los dos laterales ligeramente asimétricos. La inflorescencia es un pseudo-racimo nodoso con 6 a 9 flores por nodosidad. Las flores varían en tamaños de 1.5 a 3.0 cm con pétalos de color lila y el fruto es una legumbre dehiscente que contiene de 4 a 8 semillas en forma lenticular, circular o elíptica (Argel y Lascano, 1998).



Figura 1. Fotografía de *Cratylia argentea*

C. argentea es un arbusto del género neotropical que se distribuye en forma natural al sur de la cuenca del río Amazonas, y al este de la Cordillera de los Andes, abarcando parte de Brasil, Perú, Bolivia y la cuenca del Río Paraná al noreste de Argentina (Queiroz y Coradin, 1995). Pizarro (1995) señala que la alta

retención foliar, particularmente de hojas jóvenes y la capacidad de rebrotar durante la época de sequía son las características más sobresalientes de *C. argentea*. Lo anterior se debe a sus fuertes raíces, que alcanzan hasta dos metros de longitud y aumentan su resistencia a la sequía, aun en condiciones extremas como las que presentan los suelos pobres y ácidos. Por otra parte, produce abundante semilla y su establecimiento es relativamente rápido cuando las condiciones son adecuadas (Argel y Lascano 1998).

2.7.2. Valor nutritivo de *Cratylia argentea*

La calidad nutritiva de una planta forrajera está en función de su composición química, digestibilidad y aceptación (consumo voluntario). Análisis químicos realizados en muestras de leguminosas arbustivas cosechadas en Colombia (Lascano, 1995) mostraron que el follaje comestible (hojas + tallos finos) de *C. argentea* (tres meses de rebrote) tuvo un contenido de proteína cruda (23.5%), similar al de otras especies conocidas como *Calliandra calothyrsus* (23.9%), *Eritrina poeppigiana* (27.1%), *Gliricidia sepium* (25.45) y *Leucaena leucocephala* (26.5%). La digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) del forraje de *C. argentea* fue mayor (48%) que el de *C. calothyrsus* (41%), pero menor que *G. sepium* (51%), *E. fusca* (52%) y *L. leucocephala* (53%) (Argel y Lascano, 1998). Wilson y Lascano (1997), aseguran que por su alto contenido de PC y bajos niveles de taninos, *C. argentea* es una excelente fuente de nitrógeno utilizable en el rumen.

Otros estudios, mostraron que la digestibilidad *in vitro* de la materia seca (DIVMS) de *C. argentea*, fue mayor (53%), que la de otras leguminosas adaptadas a suelos ácidos como *Codariocalyx giroides* (30%) y *F. macrophylla* (20%), lo cual está asociado a su bajo contenido de taninos condensados (Lascano, 1995). Raaflaub y Lascano (1995) observaron en estudios de campo que las vacas lecheras rechazaban el follaje inmaduro de *C. argentea* cuando éste se ofrecía fresco, pero que lo consumían si se oreo o deshidrata. Así, en un ensayo con ovinos en jaulas metabólicas a los cuales se les ofreció forraje (hojas + tallos finos) inmaduro y

maduro de *C. argentea* en estado fresco, oreado y secado al sol. Los resultados mostraron que el consumo de *C. argentea* inmadura fresca fue bajo, pero que aumentó significativamente cuando se oreó (24 ó 48 horas) o secó al sol. El consumo por los ovinos de forraje maduro fue alto independiente del tratamiento poscosecha. Sin embargo, de acuerdo con Argel y Lascano (1998) es importante indicar que no existe ningún problema de consumo del forraje de *C. argentea* en estado inmaduro por vacas lecheras cuando éste se ofrece en mezcla con pastos de corte o con pequeñas adiciones de melaza. Lo anterior se confirmó cuando vacas en pastoreo con acceso a un banco de *C. argentea* consumían bien el forraje maduro y en menor grado el forraje inmaduro. El bajo consumo de *C. argentea* en este estado inmaduro no es en sí una desventaja, por el contrario, se considera una gran ventaja para facilitar el manejo de esta leguminosa en pastoreo directo. Argel y Lascano (1998) indican que *C. argentea* podría ser incorporada en franjas en pasturas con gramíneas para conformar así un sistema silvopastoril.

Para definir el potencial forrajero de *C. argentea* como suplemento de proteína en sistemas de corte y acarreo, se han realizado una serie de ensayos en la Estación CIAT-Quilichao, donde se evaluó su contribución en la nutrición de rumiantes alimentados con gramíneas de baja calidad y en la producción de leche de vacas en pastoreo (Argel y Lascano, 1998).

Wilson y Lascano (1997) mencionan que en estudios de suplementos hechos con *C. argentea*, encontraron que esta leguminosa contribuye a aliviar las deficiencias proteínicas de los rumiantes, algo común en la época de sequía debido a la alta degradación de las proteínas en el rumen. En un estudio se suplementó con diferentes niveles de *C. argentea* y caña de azúcar a vacas lechera en pastoreo (1.5% de MS del PV). Los resultados de Ávila y Lascano, citado por Argel y Lascano (1998) mostraron que la suplementación resultó en aumentos crecientes de producción de leche (1.2 a 2.2 L por vaca/día) a medida que se incrementó la proporción de *C. argentea* (0, 25, 50 y 75%) en el suplemento. Sin embargo, la

respuesta a la inclusión de *C. argentea* en el suplemento dependió del potencial de producción de leche de las vacas y de la calidad de la gramínea en la pastura. Vacas con poco potencial de producción de leche (3 a 4 L) no respondieron a la suplementación con *C. argentea*. Tampoco se observó respuesta a la suplementación caña y *C. argentea* cuando la gramínea (hojas) en la pastura utilizada por las vacas tenía niveles de proteína de más de 7% (Argel y Lascano, 1998).

Por otra parte, la suplementación (7 a 10 g MS/kg PV por día) de *C. argentea* a vacas en pastoreo en *Brachiaria* tuvo un efecto positivo (8 al 14% de aumento) en la producción diaria de leche durante la época de sequía y en menor grado (0 a 7% de aumento) en época lluviosa (Lascano, 1995). Los resultados muestran que el uso de *C. argentea* como un suplemento para vacas de doble propósito, puede suplir un 80% de los requerimientos de proteína del animal que normalmente es suplido con pollinaza y tiene un potencial para producir entre 7 y 9 L/vaca/día (Ibrahim *et al.*, 1998). Sin embargo, Franco *et al.*, (1997) indican que la suplementación con *C. argentea* durante la época lluviosa no representa una estrategia atractiva de alimentación, debido a que las vacas bajo pastoreo de *H. rufa* y *B. brizantha* presentan niveles de producción de leche similares a los encontrados en los animales suplementados con *C. argentea*.

Existen pocos estudios en animales en desarrollo, a pesar de que estos tienen requerimientos importantes de proteína cruda. Por lo tanto, debido a la cantidad y calidad de *C. argentea* es una opción que puede disminuir la dependencia en el uso de concentrados proteicos que son caros.

En un estudio González *et al.*, (2012) implementaron un experimento con *C. argentea* asociada a *B. brizantha*–Toledo (T1), comparada con la gramínea sola (T2), en vaquillas Holstein x Cebú. Se asignó a cada tratamiento 10 vaquillas (peso inicial: 251±44 kg; y 2.5 unidades animal ha), de 11 meses de edad promedio, en pastoreo rotacional, en dos áreas de pastoreo (T1 y T2), cada una con 2.2 ha, divididas a su vez en seis potreros. Se evaluó durante el periodo de sequía las ganancias diarias de peso GDP (kg/animal) cada 28 días, las cuales

fueron de 839 ± 258 g y 580 ± 278 g, para T1 y T2, respectivamente. Considerando estos resultados reportan que la asociación *Cratylia argentea* –*Brachiaria brizantha*-Toledo es una opción factible para mejorar los índices productivos de vaquillas, bajo condiciones de pastoreo en épocas críticas, sin necesidad de granos o suplemento comercial, en el trópico húmedo de Veracruz.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el consumo de materia seca de *Cratylia argentea* ofrecida en diferentes niveles de inclusión en la dieta de bovinos machos con una infección mixta y no infectados con nematodos gastrointestinales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Determinar bajo un sistema de corte y acarreo, el consumo de materia seca de *C. argentea* ofrecida en diferentes niveles de inclusión de la dieta a bovinos con una infección mixta y no infectados con nematodos gastrointestinales.

b) Evaluar la composición química de la dieta de bovinos con diferentes niveles de inclusión de *C. argentea* y del rechazo (proteína cruda, fibra detergente neutro, fibra detergente ácido, lignina, materia orgánica, y digestibilidad *in situ*).

c) Evaluar la concentración de urea en plasma, materia seca (MS) y nitrógeno (N) en heces, N y derivados de purinas en la orina de bovinos alimentados con diferentes niveles de inclusión de *C. argentea* en la dieta.

HIPÓTESIS

El consumo voluntario se incrementará, conforme mayor sea el porcentaje de inclusión de *C. argentea* en la dieta.

El consumo de *C. argentea* por bovinos con una infección mixta de nematodos gastrointestinales será mayor que en los bovinos no infectados.

Los animales suplementados con *C. argentea* presentarán un incremento en las concentraciones de N en heces, orina y urea en plasma.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización del estudio

El estudio se realizó en el Módulo de producción de vaquillas F1 (Holstein x Cebú) “La Soledad”, que pertenece al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ-UNAM) (Anexo 1), localizado en el municipio de Atzalan, Veracruz (km 3.5 del camino vecinal Martínez de la Torre-Novara). El clima es cálido-húmedo Af(m)W”(e) con una temperatura y precipitación media anual de 23.4 °C y 1,840 mm, respectivamente (García, 1981).

3.2. Experimento I. Evaluación del consumo y de la utilización del nitrógeno en bovinos alimentados con niveles crecientes de la leguminosa *Cratylia argentea*.

3.2.1. Animales experimentales y su manejo

Del 8 de abril al 17 de junio del 2013, se utilizaron cuatro toretes F1 (Holstein x Cebú) de 212 ± 17 kg de peso vivo (PV). Los animales se alojaron en corraletas individuales (1.0 m de ancho x 1.8 m de largo x 1.4 m de altura) con tarimas de 0.2 m de altura (Anexo 2), para facilitar la colecta de muestras. Aproximadamente, 30 días antes de iniciar el experimento, los cuatro toretes se sometieron a manejo diario que consistió en la colocación de gamarras – arneses y cepillado con la finalidad de que se acostumbraran al manejo durante el periodo experimental. Además, dos días antes del inicio de la fase experimental, los animales se desparasitaron con levamisol a una dosis de 7.5 mg/kg de PV, vía intramuscular y albendazol a una dosis de 8.5 mg/kg de PV, vía oral y vitaminaron con ADE a una dosis de 5 mL por animal. Se les suministró sal mineral (50g animal/día) y agua *ad libitum* para cubrir sus requerimientos básicos de 8.0 a 10.0% del PV animal (Sager, 2000).

3.2.2. Diseño experimental.

Se utilizó un diseño experimental de cuadrado latino (4 x 4) que consistió en cuatro periodos de 17 días (10 días de adaptación y 7 días de periodo experimental). Los animales se distribuyeron de forma aleatoria, dentro de cada periodo, a cada uno de los tratamientos siguientes (T):

Cuadro 1. Distribución aleatoria de los tratamientos en el cuadrado latino 4x4.

Donde, los periodos fueron las hileras, los animales las columnas y los tratamientos (T) las celdas.

Periodos de 7 días	Bovino 1	Bovino 2	Bovino 3	Bovino 4
1	T3	T1	T2	T4
2	T4	T2	T3	T1
3	T1	T3	T4	T2
4	T2	T4	T1	T3

3.2.3. Dieta experimental

Durante la fase experimental de cada periodo, las dietas se formularon a base de heno de *Brachiaria arrecta* (pasto Tanner) y de la leguminosa *C. argentea* (hoja y tallos finos) que se ofertó, mediante el método de corte y acarreo, a diferentes niveles de inclusión de acuerdo al tratamiento:

- T1) dieta basal de pasto Tanner.
- T2) 15% de *C. argentea* y 85% de pasto Tanner.
- T3) 30% de *C. argentea* y 70% de pasto Tanner.
- T4) 45% de *C. argentea* y 55% de pasto Tanner.

Durante la fase experimental, los animales tuvieron acceso al alimento de la dieta y al agua *ad libitum*. Se les ofreció 10% más del alimento consumido durante el periodo de adaptación (10 días antes del periodo experimental).

La dieta durante el periodo de adaptación consistió en un 5% de *C. argentea* y 95% de pasto Tanner. Los animales se pesaron previo ayuno de 17 horas, al inicio

y al final de cada periodo, para estimar el consumo de materia seca con base al PV de cada animal.

3.2.4. Colección y procesamiento de muestras

Para determinar la calidad del forraje y del follaje ofrecido a los animales, se tomó una muestra diaria de 300g tanto de *C. argenta* como de *B. arrecta* (pasto Tanner) por separado. Para conocer la calidad del alimento rechazado, también se tomó una muestra diaria de 300g de ambos componentes. Cada muestra se identificó y se almacenó en bolsas de polietileno para su posterior traslado al laboratorio de nutrición del CEIEGT.

Durante el periodo experimental, de cada animal se tomaron muestras diarias de sangre (5 ml a las 9:00 horas) de la vena caudal para determinar la concentración de urea en suero sanguíneo. Los muestreos se realizaron dos veces al día (antes de ofrecer la dieta y seis horas post-ofrecimiento) en tubos al vacío sin anticoagulante. También se realizó la colecta individual de heces durante los siete días experimentales de cada periodo; del total de heces, se tomó una muestra de 500g en bolsas de polietileno las cuales se transportaron al laboratorio de nutrición para el análisis de materia seca y de N. Las heces se colectaron, inmediatamente después de que el animal defecara con la finalidad de evitar pérdidas por pisoteo (Anexo 3).

Para la colecta total de orina, se diseñó un mandil que se colocó cubriendo el prepucio de los animales por medio de arneses (Anexo 4). Esto permitió que la orina se depositara por medio de un embudo y una manguera hacia un recipiente plástico, el cual era vertido cada dos horas en un contenedor individual. La orina total se midió cada 24 horas; se colectó una muestra diaria de 200 mL de orina la cual se acidificó mediante la adición de ácido sulfúrico a un pH de 2 para evitar el crecimiento bacteriano. El pH se corroboró con un potenciómetro. Después, las muestras se transportaron y se congelaron a -20 °C hasta su análisis. Todos los días se midió el consumo de agua.

Cada día, a las 07:00 horas, se pesó el rechazo del forraje/follaje, una vez pesado el rechazo, se procedía a pesar el pasto y la leguminosa por separado de acuerdo al tratamiento y peso vivo de cada animal. Después se midieron: el i) rechazo del agua (pesando la oferta y el rechazo en kg.), ii.) excreción total de orina iii.) el pH de la orina (fue medido con un potenciómetro) , iv.) excreción de heces (pesado con balanza electrónica). Posteriormente a las 6 horas cumplidas de haber tomado la primera muestra de sangre del día, se tomaba la segunda muestra a las 14:00 horas. A las 16:00 horas se volvía a repartir de comer haciéndolo de la misma forma que en la mañana.

3.2.5. Mediciones y técnicas de laboratorio

3.2.5.1. Consumo de materia seca. El consumo de materia seca (kg MS/día) se determinó por medio del pesaje del alimento ofrecido a los animales y del rechazado por los mismos (Mupeyo *et al.*, 2011).

3.2.5.2. Determinación de materia seca y materia orgánica en el alimento. Para determinar el contenido de materia seca del forraje y del follaje ofrecido, se utilizó el método de deshidratación de las muestras a 60° C durante 48 horas. El contenido de MO se calculó mediante la diferencia entre el contenido de MS y el contenido de cenizas. Estas últimas se determinaron mediante el método descrito por Van Soest *et al.* (1991).

3.2.5.3. Determinación de N y proteína cruda (PC). La determinación de la PC del forraje ofrecido y rechazado se realizó mediante el método de Kjeldahl (AOAC, 1984). Además se cuantificó por medio del mismo método el N en las heces.

3.2.5.4. Determinación de fibra en el material vegetativo de la dieta. Tanto en el follaje como en el forraje ofrecido y rechazado se determinaron la fibra en detergente neutro (FDN), la fibra en detergente ácido (FDA) y lignina con un analizador de fibras ANKOM^{200®} (Goering y Van Soest, 1970).

3.2.5.5. Digestibilidad *in situ*. Esta se determinó con el método de la Bolsa de Dacrón (Orskov *et al.*, 1980). Se utilizaron dos vacas de la cruce $\frac{3}{4}$ *Bos taurus* - $\frac{1}{4}$ *Bos indicus* con un peso promedio de 670 ± 50 kg, fistuladas en el rumen, con cánulas de plastisol de 10 cm de diámetro interno (Anexo 5). Los animales pastaron gramas nativas (*Paspalum spp*, *Axonopus spp*) a una carga animal equivalente de 2 vacas/ha, recibieron diariamente dos kg/vaca de un alimento balanceado con 14% de PC, proveniente de un solo lote. Las bolsas de digestión ruminal (10 X 20 cm; 53 mm de poro) se incubaron en bolsas grandes dentro del rumen durante 48 horas. Después, se retiraron y se lavaron en una lavadora (cinco ciclos) hasta que el agua de lavado estaba clara. Las bolsas se secaron en una estufa de aire forzado a 60° C durante 72 horas. Se utilizaron tres bolsas de digestión ruminal para cada tratamiento.

3.2.5.6. Concentración de urea (mg/dL) en plasma. Para determinar los niveles de urea se utilizó la metodología de química sanguínea en seco, mediante el analizador de química sanguínea IDEXX VetTest®.

3.2.5.7. Concentración de N ureico (mg/dL) en orina. Para determinar los niveles de nitrógeno ureico en orina, se realizó por la metodología de UV, que implica una serie de reacciones i.) Hidrolisis de urea para la producción de amonio y dióxido de carbono. ii.) En la presencia de glutamato deshidrogenasa (GLDH) y una reducción de nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), el amonio se combina con α -ketoglutarato (α -KG) para producir L-glutamato. iii.) La disminución de la concentración de NADH es directamente proporcional a la concentración de urea. Lo cual se determina midiendo la absorbancia a 340 nm.

3.2.5.8. Cuantificación de heces totales y orina total. La cantidad de heces se midió con la técnica de recolección total de heces. La orina se midió por medio de la técnica de recolección total de orina.

3.2.5.9. Derivados de purinas. Para medir el ácido úrico se utilizó un *kit* de análisis Spin React®, con el que se construyó una curva de calibración que va de 2 a 6 mg/dL. La determinación de alantoína en orina se realizó con la técnica sugerida por Chen *et al.* (1990).

3.2.6. Análisis estadístico

Se utilizó el siguiente modelo para un análisis de varianza de cuadrado latino: Para las variables de respuesta de calidad de los componentes de la dieta ofrecida y rechazada, consumo voluntario, excreta total de heces y de orina, N en heces, N ureico en orina, urea en suero sanguíneo, derivados de purinas, dependiendo la naturaleza de los datos, se utilizó ANOVA y prueba de Tukey, o Kruskal-Wallis. Se correlacionó el consumo de PC y la concentración de urea en suero sanguíneo, el consumo de MS y la excreción de heces, el consumo de agua y la excreción de orina por medio del análisis de Pearson. Así mismo, se realizaron análisis de correlación y regresión lineal entre el consumo de proteína cruda y la concentración de urea en plasma a las 0 y 6 horas; y con la concentración de nitrógeno ureico en orina.

$$Y_{ijkl} = \mu + \chi_j + \eta_k + \tau_l + \xi_{ijkl}$$

Dónde:

Y_{ijkl} es la variable de respuesta medida en la i-ésima hilera, j-ésima columna y l-ésimo tratamiento

μ es la media general, común a todas las observaciones

χ_j es el efecto de la j-ésima hilera (j = 1, 2, 3,.....n)

η_k es el efecto de la k-ésima columna (k = 1, 2, 3,.....n)

τ_l es el efecto del l-ésimo tratamiento (l = 1, 2, 3,n)

ξ_{ijkl} es la variación residual (error experimental): $\mu = 0, \sigma^2 = 1$

3.3. Experimento II. Consumo de la leguminosa *C. argentea* por bovinos con y sin infección mixta por nematodos gastrointestinales.

3.3.1. Periodo de evaluación y animales experimentales

Este experimento se realizó del 15 de septiembre al 28 de octubre del 2013. Se utilizaron 12 becerros $\frac{3}{4}$ cebú x $\frac{1}{4}$ Holstein de 167 ± 18 kg PV. Durante el periodo experimental los animales se alojaron en corraletas individuales (con un área de 1.8 m^2 , 1.0 m ancho x 1.8 m largo x 1.4 m altura) con piso de cemento.

3.3.2. Manejo de animales y diseño experimental

Dos semanas antes del periodo experimental, todos los animales se desparasitaron con Levamisol a una dosis de 7.5 mg/kg de PV por vía intramuscular y albendazol a una dosis de 8.5 mg/kg de PV, vía oral. Después del periodo residual del principio activo (3 días), los animales tuvieron un periodo de adaptación durante 8 días a la dieta y a las corraletas. Posteriormente, el día 9, se realizó un análisis coproparasitoscópico para comprobar que los animales estuvieran libres de parásitos. Se formaron dos grupos de seis animales cada uno, balanceados por el peso vivo para ser los grupos infectado y no infectado con NGI. Cada animal del grupo infectado se inoculó con una dosis de 85,000 larvas (L3) de NGI (495 L3/kg de PV) de bovinos; obtenidas del laboratorio de sanidad

animal del CEIEGT-FMVZ-UNAM. El inóculo de L3 estuvo conformado por larvas de *Cooperia sp.* (67.08%), *Oesophagostomum radiatum* (29.94%), *Nematodirus sp.* (2.39%) y *Haemonchus sp.* (0.59%).

El grupo no infectado permaneció con un protocolo de desparasitación a base de ivermectina al 1% a una dosis de 200 µg/kg de PV por vía subcutánea y levamisol a una dosis de 7.5 mg/kg de PV, vía intramuscular, con la finalidad de mantenerlos libres de infecciones de NGI. Todo el periodo experimental, los dos grupos experimentales estuvieron separados y no tuvieron contacto para evitar la contaminación de NGI entre tratamientos. A partir del día de la infección, cada dos días se tomó una muestra de heces directamente del recto de cada animal (50 g aproximadamente) para determinar y monitorear la eliminación de huevos de NGI por g de heces utilizando la técnica de McMaster.

El día 24 post-infección, después de confirmar que la mayoría de los animales infectados estaban eliminando alrededor de 80 huevos por g de heces, se procedió a ofrecer la leguminosa como suplemento a ambos grupos durante 15 días. Los animales fueron pesados después de haber sido dietados por 17 horas al inicio y al final del experimento.

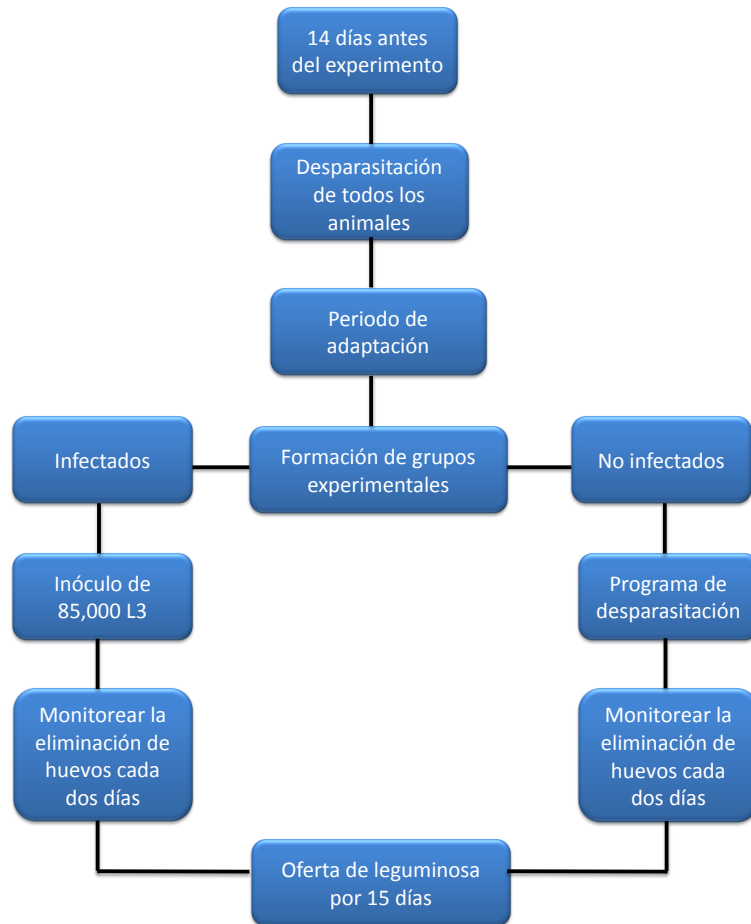


Figura 2. Diagrama del manejo de los animales durante el experimento.

3.3.3. Dieta experimental

Durante el periodo de adaptación, todos los animales recibieron una dieta basal de pasto Tanner henificado y 50g MS de *C. argentea*. También se suplementaron con alimento concentrado (12% PC) a razón del 0.4% de su PV.

En el periodo experimental, todos los animales tuvieron acceso a una dieta de *C. argentea ad libitum* durante cuatro horas en la mañana (de las 8:00 a las 12:00 horas) Después se les ofreció sales minerales y alimento balanceado a razón del 0.4% de su PV. Una vez que se terminaran el alimento, se les ofreció pasto Tanner *ad libitum* durante 17 horas al día. Además, los animales contaron con agua *ad libitum* durante todo el experimento.

3.3.4. Colección y procesamiento de muestras

Para determinar la calidad del forraje y follaje en condiciones de oferta y rechazo, diariamente se tomaron muestras (300 g) de ambos componentes por separado para ser analizadas en el laboratorio.

Para evaluar la eliminación de huevos por g de heces, cada dos días se tomaban muestras de heces directamente del recto de los animales y eran llevadas al laboratorio.

3.3.5. Mediciones y técnicas de laboratorio

3.3.5.1. Consumo de MS, MO, PC, FDN, FDA y lignina. Fueron determinados utilizando las metodologías descritas para el primer experimento.

3.3.5.2. Eliminación de huevos por gramo de heces. Se tomó una muestra de heces cada dos días directamente de la ampolla rectal, a partir del inicio del experimento. Se realizó el conteo directo de huevos de NGI por gramo de heces mediante la técnica de McMaster modificada (Raynaud, 1970).

3.3.6. Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completo al azar, empleando el siguiente modelo:

Para las variables de respuesta de calidad de los componentes de la dieta ofrecida y rechazada (PC, FDA, FDN, LIG), consumo voluntario, se utilizó ANOVA y pruebas de Tukey para comparación entre medias. Para determinar las posibles diferencias significativas entre la tasa de sustitución del pasto Tanner por C. argentea en bovinos infectados y no infectados por NGI, se realizó un análisis estadístico Kruskal-Wallis.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_j + \xi_{ij}$$

Y_{ij} es la variable de respuesta medida en la i-ésima UE dentro del j-ésimo tratamiento

μ es la media general, común a todas las observaciones

τ_j es el efecto del j-ésimo tratamiento (j = 1, 2, 3,, n)

ξ_{ij} es la variación residual (error experimental): $\sum \xi_{ij} = 0, \sum \xi_{ij}^2 = 1$

IV. RESULTADOS

4.1. Experimento I.

4.1.1. Composición química de la dieta ofrecida y rechazada por bovinos

La composición química y digestibilidad *in situ* de *Cratylia argentea* y *Brachiaria arrecta*, ofrecida a los animales, se presentan en el Cuadro 2. La cantidad de proteína cruda (PC) de la leguminosa *C. argentea* fue de 193 ± 6.4 g/kg de materia seca (MS); mientras que para *B. arrecta*, la cantidad de PC fue de 62 ± 2.8 g/kg de MS ($P < 0.05$). La cantidad de lignina (LIG) y cenizas (CEN) fue superior en la leguminosa ($P < 0.05$). La cantidad de materia orgánica (MO), fibra detergente neutro (FDN), celulosa (CEL) y hemicelulosa (HEM) fue mayor en el forraje ($P < 0.05$).

Cuadro 2. Composición química de *Cratylia argentea* y *Brachiaria arrecta* ofrecida a bovinos F1 (Holstein x Cebú) a diferentes niveles de inclusión.

Composición química y digestibilidad de la dieta (g/kg de MS \pm E.E).

Componente	MO	PC	DIG	FDN	FDA	LIG	CEL	HEM	CEN
<i>Brachiaria arrecta</i>	912 \pm 3.4 _a	62 \pm 2.8 _a	532 \pm 9.7 _a	812 \pm 13.9 _a	473 \pm 5.7 _a	106 \pm 2.6 _a	367 \pm 4.6 _a	339 \pm 18.3 _a	88 \pm 3.4 _a
<i>Cratylia argentea</i>	888 \pm 12.1 _a	193 \pm 6.4 _b	568 \pm 39.7 _a	649 \pm 22.5 _b	414 \pm 24.4 _a	201 \pm 14.1 _b	212 \pm 12.6 _b	235 \pm 6.9 _b	112 \pm 12.1 _a

Letras diferentes dentro de la misma columna, son estadísticamente diferentes al nivel de $P < 0.05$. Materia orgánica (MO), Proteína cruda (PC), Digestibilidad (DIG), Fibra detergente neutro (FDN), Fibra detergente ácido (FDA), Lignina (LIG), Celulosa (CEL), Hemicelulosa (HEM), Cenizas (CEN).

La composición química y digestibilidad *in situ* de *C. argentea* y *B. arrecta*, rechazado por los animales, se presentan en el Cuadro 3. En la medida que se incrementó el porcentaje de inclusión en la dieta de *C. argentea*, aumentó la cantidad de PC y LIG en el alimento rechazado. La cantidad de FDN y FDA fue menor en el alimento rechazado.

Cuadro 3. Composición química de la dieta (g/kg de MS) rechazada por bovinos F1 (Holstein x Cebú) con diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea.

Composición química de los componentes rechazados de la dieta (g/kg de MS±E.E).				
Tratamientos	T1	T2	T3	T4
MO	919±6.0 ^a	900±10.2 ^{ab}	879±7.9 ^b	875±8.0 ^b
PC	53±6.8 ^a	82±7.2 ^b	106±7.6 ^c	127±2.1 ^d
DIG	445±12.0 ^a	439±25.7 ^a	473±20.8 ^{ab}	504±12.4 ^b
FDN	811±17.9 ^a	774±4.7 ^{ab}	733±19.2 ^b	707±10.4 ^{bc}
FDA	489±7.2 ^a	482±11.9 ^{ab}	469±5.2 ^a	455±4.0 ^{bc}
LIG	131±9.3 ^a	152±13.4 ^{ab}	167±6.2 ^b	184±4.8 ^{bc}
CEL	359±10.0 ^a	329±18.0 ^b	302±3.7 ^b	272±6.8 ^c
HEM	322±13.1 ^a	293±8.6 ^{ab}	264±15.6 ^b	251±14.2 ^{bc}
CEN	81±6.0 ^a	100±10.2 ^a	119±6.8 ^b	125±8.0 ^b

Letras diferentes dentro de la misma fila, son estadísticamente diferentes al nivel de P<0.05. Materia orgánica (MO), Proteína cruda (PC), Digestibilidad (DIG), Fibra detergente neutro (FDN), Fibra detergente ácido (FDA), Lignina (LIG), Celulosa (CEL), Hemicelulosa (HEM), Cenizas (CEN). Los tratamientos estuvieron conformados por *C. argentea* y *B. arrecta* con la siguiente proporción, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente.

4.1.2. Consumo de materia seca

El consumo de MS para cada tratamiento se muestra en la Figura 3. Los animales de los T1, T2, T3 y T4 consumieron 23 ± 1.5 , 34 ± 2.5 , 38 ± 1.5 y 44 ± 4.7 g de MS/kg de PV respectivamente, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos T1: T2, T3, T4 y T2:T4 ($P < 0.05$).

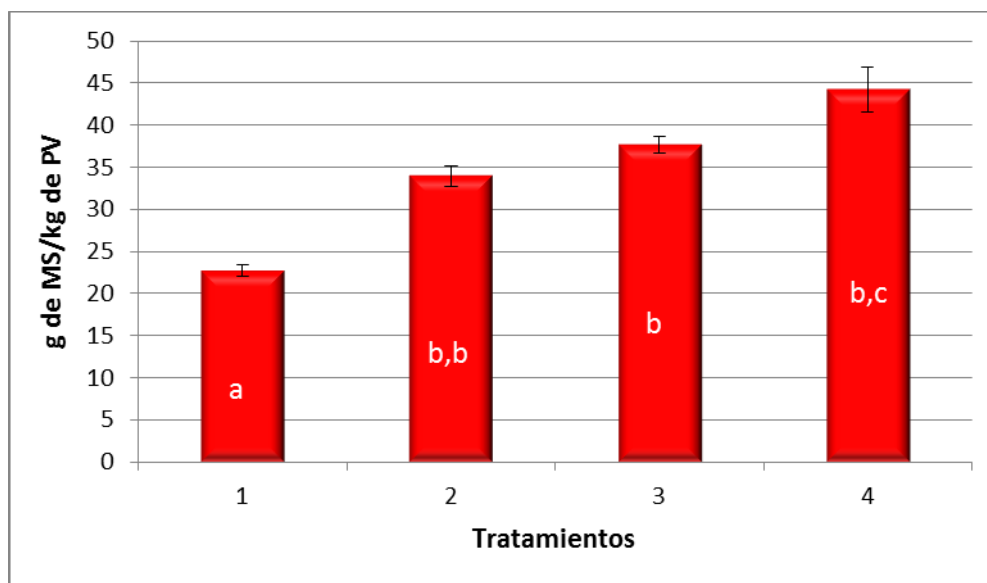


Figura 3. Consumo de materia seca de bovinos (F1 Holstein x Cebú) alimentados con *Cratylia argentea* y *Brachiaria arrecta* con las proporciones, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente. Letras diferentes entre tratamientos, son estadísticamente diferentes al nivel de $P < 0.05$.

4.1.3. Consumo de proteína cruda por animales que consumieron una dieta de leguminosa:gramínea a diferentes niveles de inclusión

El consumo de PC de los animales incrementó en la medida que aumentó el porcentaje de inclusión de *C. argentea* en la dieta ($P < 0.05$), excepto para los tratamientos 2 y 3 ($P > 0.05$). El consumo total de PC para el T1, T2, T3 y T4 fue de 302.5 ± 23.1 , 604 ± 69.2 , 817 ± 50.0 y $1,156 \pm 167.2$ g de PC, respectivamente (Figura 4).

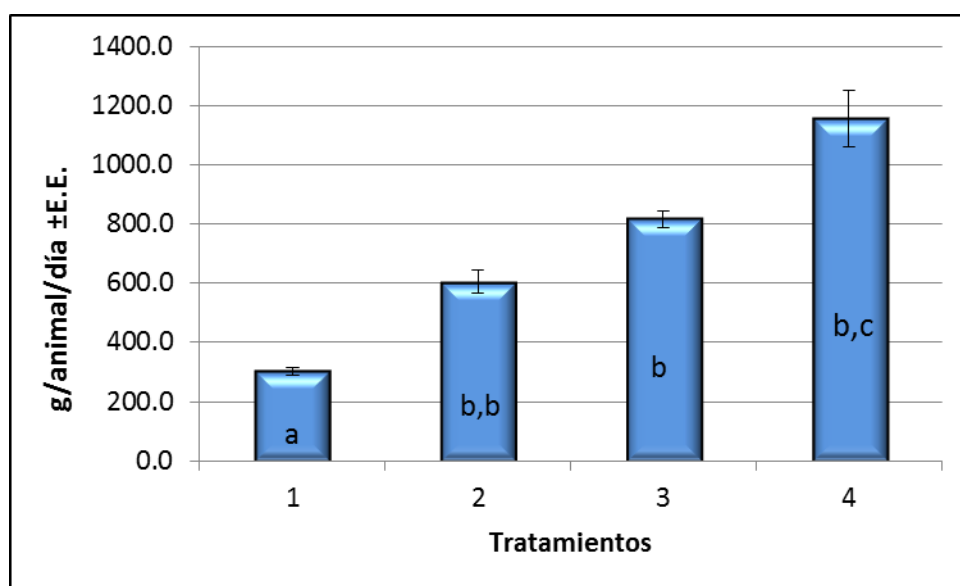


Figura 4. Consumo de proteína cruda por bovinos con dietas a diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea. Letras diferentes entre tratamientos, son estadísticamente diferentes al nivel de $P < 0.05$. Los tratamientos estuvieron conformados por *C. argentea* y *B. arrecta* con la siguiente proporción, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente.

4.1.4. Concentración de urea en suero sanguíneo de bovinos alimentados con dietas a diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea (antes y después de comer)

La concentración de urea en el suero sanguíneo de los bovinos para cada tratamiento se presenta en la Figura 5. Tanto a la hora 0 como a la hora seis después del tratamiento, la concentración de urea se incrementó al aumentar el nivel de inclusión de *C. argentea* en la dieta ($P < 0.05$). La mayor concentración de urea se presentó en los animales del T4 con 12.2 y 14.9 mg/dl a la hora 0 y seis, respectivamente; sin embargo se encontraron diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos ($P < 0.05$). No obstante el T3 fue el único que mostró diferencia estadísticamente significativa al comparar la concentración de urea entre la cero y las seis horas ($P < 0.05$).

El coeficiente de correlación entre el consumo de PC y la concentración de urea a las cero y seis horas fue de 0.7016 y 0.7043, respectivamente ($P < 0.05$). El análisis de regresión, mostró que por cada unidad de PC consumida, la concentración de urea en sangre medida a las cero y seis horas, se incrementó 3.325 y 3.775 mg/dl, respectivamente.

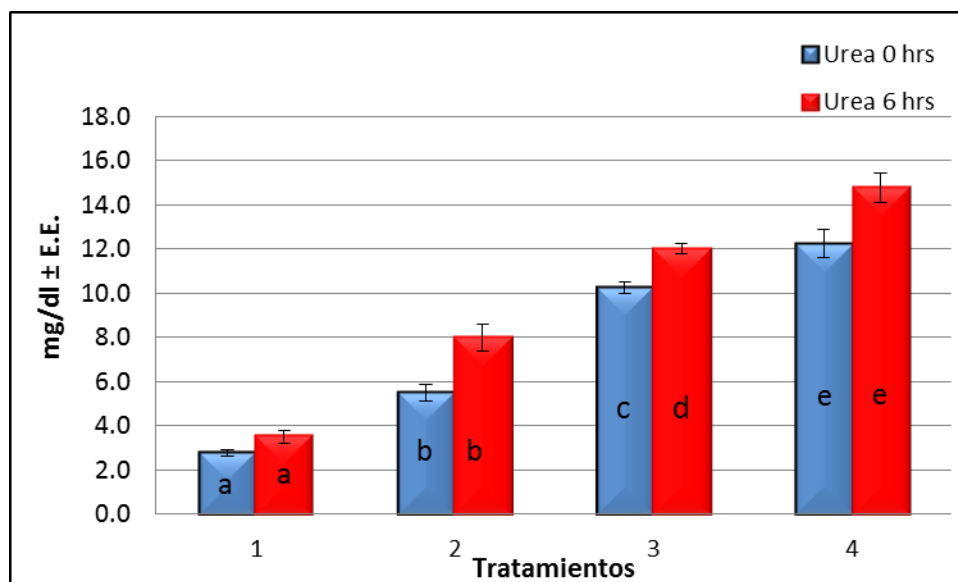


Figura 5. Concentración de urea en suero sanguíneo de bovinos alimentados con dietas a diferentes niveles de inclusión de leguminosa:gramínea. Letras diferentes entre tratamientos, son estadísticamente diferentes al nivel de $P < 0.05$. Los tratamientos estuvieron conformados por *C. argentea* y *B. arrecta* con la siguiente proporción, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente.

4.1.5. Excreción de heces

Cuadro 4. Relación entre el consumo de materia seca y la excreción total de heces.

Letras diferentes dentro de la misma fila, son estadísticamente diferentes al nivel de $P < 0.05$.

Consumo de materia seca (MS) y excreta de heces, g de MS/100 kg PV/animal/día±E.E.				
Tratamientos	T1	T2	T3	T4
Consumo de MS	2,291±150.2 ^a	3,387±247.6 ^b	3,744±150.3 ^b	4,429±474.9 ^b
Excreción de heces	1,008±44.9	1,046±64.5	1,089±22.4	1,004±79.9

En el Cuadro 4 se presenta la excreción de heces totales de los animales en cada tratamiento. No hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) en la excreción de heces entre tratamientos.

4.1.6. Consumo y excreción de nitrógeno

Los valores totales de nitrógeno consumido y excretado se muestran en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Consumo y excreción de nitrógeno.

Nitrógeno (N) consumido y excretado en heces, g de N/100 kg PV/animal/día±E.E.				
Tratamientos	T1	T2	T3	T4
N consumido	23±2.3 ^a	45±4.0 ^{bb}	61±3.4 ^b	86±9.9 ^{bc}
N excretado en heces	9±0.9	9±1.3	10±1.0	8±1.3

Letras diferentes dentro de la misma fila, son estadísticamente diferentes al nivel de P<0.05. En el Cuadro 5 se presenta el consumo y la excreción de nitrógeno de los animales en cada tratamiento. Encontrándose diferencia estadísticamente en el consumo de N en T1: T2, T3, T4 y T2: T4. No así, en el nitrógeno excretado (P> 0.05).

4.1.7. Consumo de agua, excreción de orina y pH de la orina

En la Figura 6, se muestra que tanto el consumo de agua como la cantidad de orina total no fue diferente ($P > 0.05$) en los animales de los diferentes tratamientos. Sin embargo, el pH de la orina fue significativamente menor en los animales del T1 ($P < 0.05$) (Figura 7.). El coeficiente de correlación entre el consumo de PC y el pH de la orina fue de 0.7764 ($P < 0.05$).

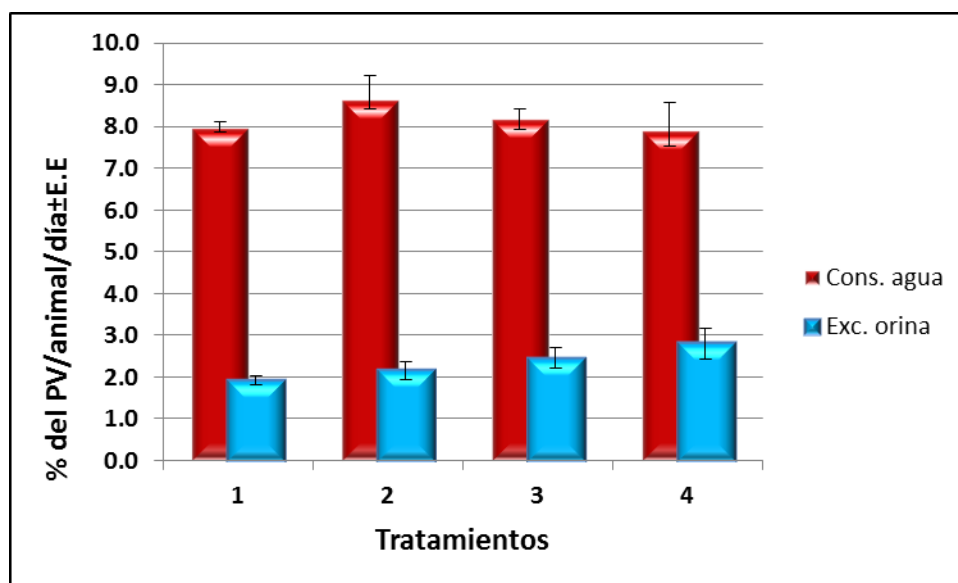


Figura 6. Consumo de agua y excreción de orina de animales con dietas a diferente nivel de inclusión de leguminosa:gramínea. Los tratamientos estuvieron conformados por *C. argentea* y *B. arrecta* con la siguiente proporción, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente.

El pH de la orina en los animales que consumieron el T1, T2, T3 y T4.

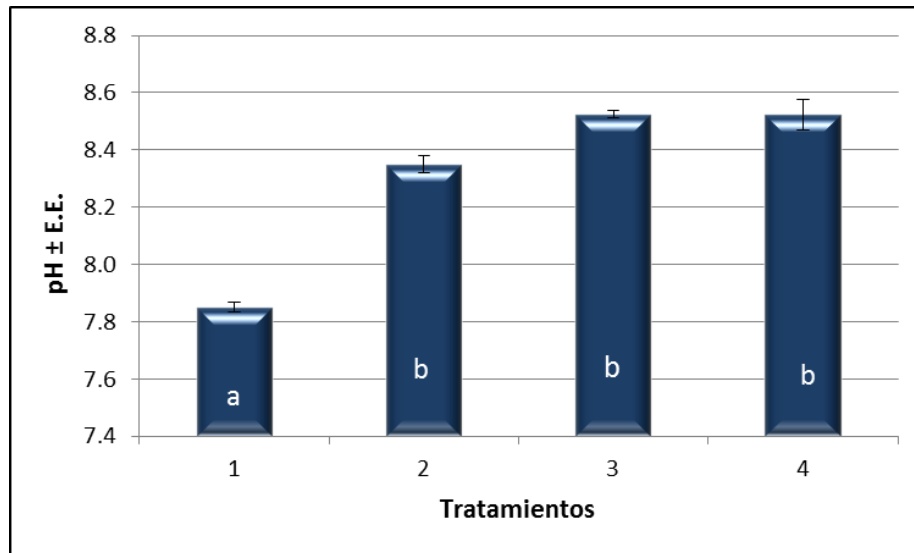


Figura 7. pH de la orina. Letras diferentes entre tratamientos, son estadísticamente diferentes al nivel de $P < 0.05$. Los tratamientos estuvieron conformados por *C. argentea* y *B. arrecta* con la siguiente proporción, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente.

4.1.8. Derivados de purinas (DP)

Los niveles de ácido úrico (ppm \pm E.E.) para T1, T2, T3 y 4 fueron de 4.4 ± 1.3 , 18.5 ± 10.7 , 38.2 ± 24.1 y 25.1 ± 5.1 respectivamente; mientras que los niveles de alantoína (ppm \pm E.E.) alcanzaron valores de 129.0 ± 50.2 , 216.1 ± 113.2 , 251.3 ± 222.4 y 242.3 ± 125.8 respectivamente, para cada tratamiento. La concentración de ácido úrico y alantoína en la orina, no mostró diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($P > 0.05$).

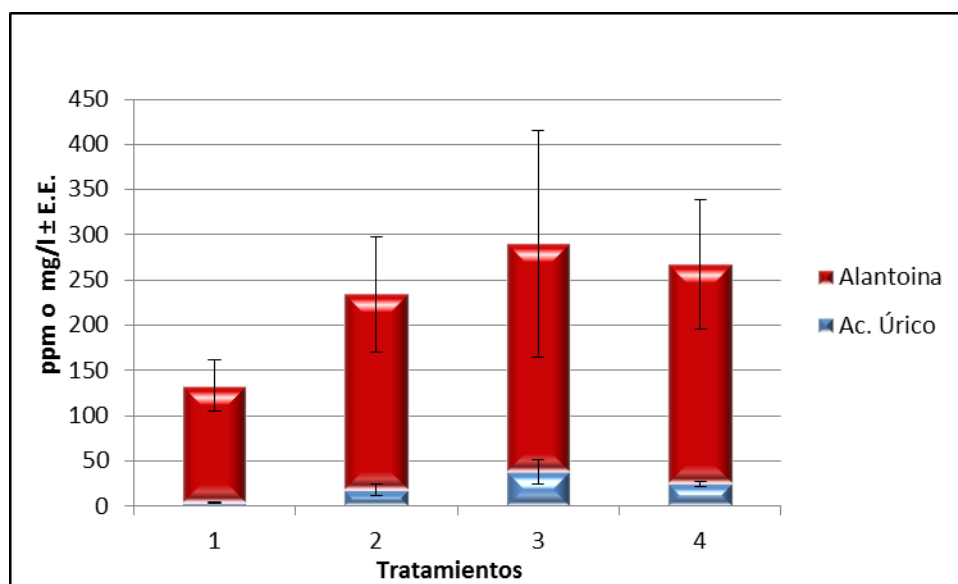


Figura 8. Componentes de los derivados de purinas presentes en la orina. Letras diferentes entre tratamientos, son estadísticamente diferentes al nivel de $P < 0.05$. Los tratamientos estuvieron conformados por *C. argentea* y *B. arrecta* con la siguiente proporción, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente.

4.1.9. Nitrógeno ureico en orina

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración de N ureico en T1:T3, T4 y T2:T4 ($P<0.05$). Se observó un incremento lineal de 88.585 mg/dl, conforme se incrementó el porcentaje de inclusión de *C. argentea* en la dieta ($P<0.05$). También se observó una correlación de 0.6076 entre el consumo de PC y el N ureico.

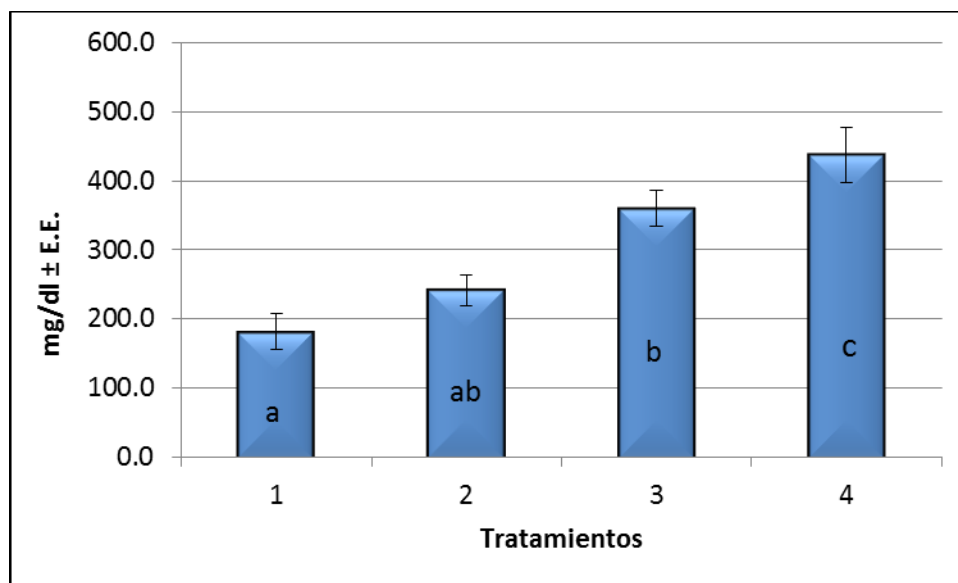


Figura 9. Concentración de nitrógeno ureico en orina. Letras diferentes entre tratamientos, son estadísticamente diferentes al nivel de $P<0.05$. Los tratamientos estuvieron conformados por *C. argentea* y *B. arrecta* con la siguiente proporción, T1 (0:100), T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55) respectivamente.

4.2. Experimento II.

4.2.1. Consumo de materia seca en bovinos infectados y no con NGI (g de MS por kg de PV \pm E.E)

La Figura 10 muestra el consumo de MS para los bovinos infectados y no infectados con NGI, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, mostrando un mayor consumo por parte de los bovinos no infectados 22.13 ± 0.23 y 19.57 ± 0.76 g de MS/kg de PV, respectivamente ($P < 0.01$).

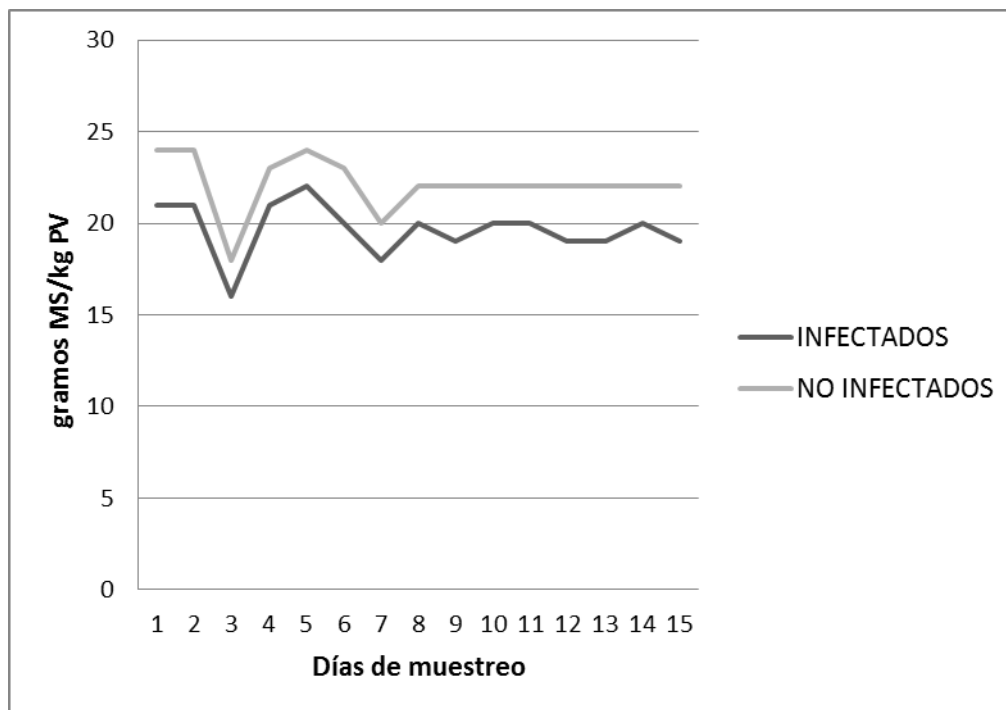


Figura 10. Consumo de materia seca en bovinos infectados y no con nematodos gastrointestinales.

4.2.2. Tasa de sustitución de *Brachiaria arrecta* - pasto Tanner por *C. argentea* en bovinos infectados y no con NGI (% de consumo de cada componente en el total de la dieta)

Los valores de sustitución de la gramínea, por la leguminosa con respecto al total de la dieta ofrecida fueron de 14.4% y 12.4% para el grupo infectado y el no infectado, respectivamente ($P < 0.05$); mientras que la tasa de consumo del pasto Tanner alcanzó valores de 85.6% y 87.6% ($p < 0.05$).

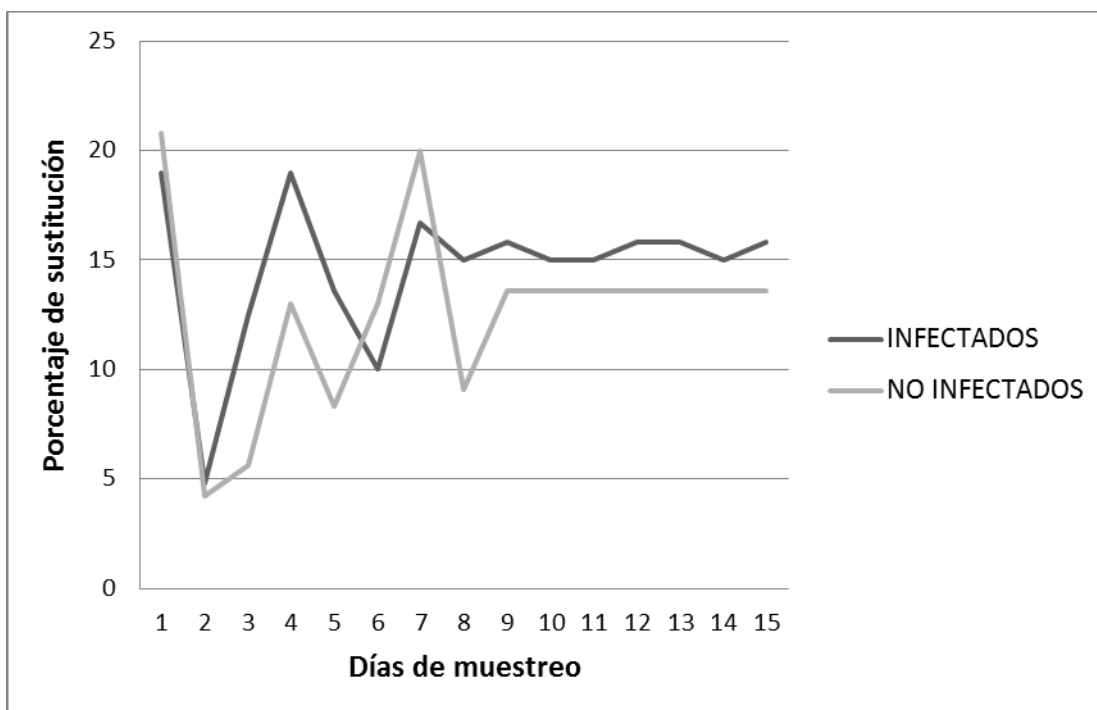


Figura 11. Tasa de sustitución del pasto Tanner por la leguminosa *Cratylia argentea* en bovinos con y sin infección por nematodos gastrointestinales.

4.2.3. Eliminación de huevos de NGI por gramos de heces

Los animales infectados al inicio del experimento eliminaron 80 huevos/g de heces y al finalizar el experimento 150 huevos/g de heces.

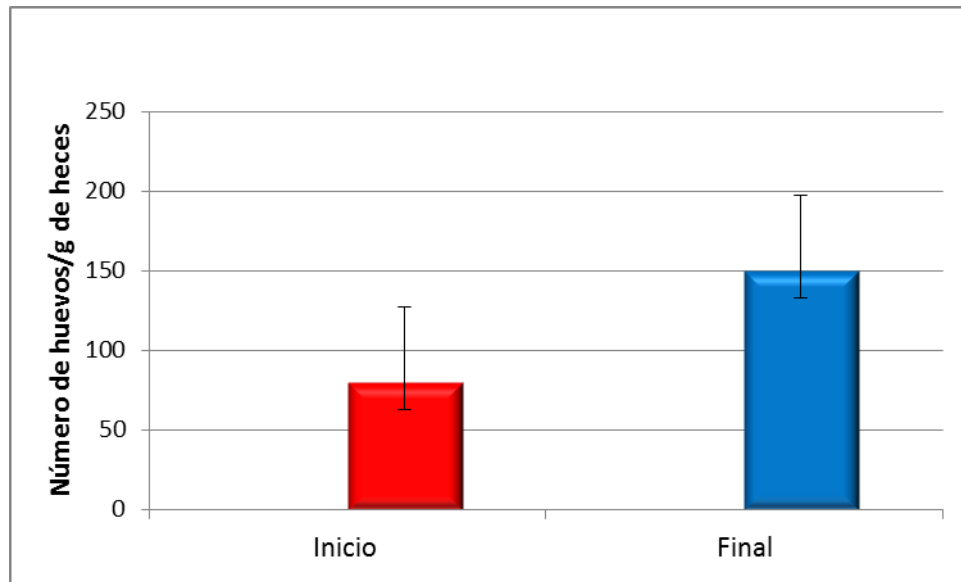


Figura 12. Eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales al inicio y final del experimento.

V. DISCUSIÓN

Experimento I.

5.1. Calidad de la dieta según los tratamientos evaluados

En este estudio se utilizaron dietas conformadas con diferentes niveles de inclusión de pasto Tanner y de la leguminosa *Cratylia argentea*. La composición química de ambos materiales vegetativos es representativa de la calidad reportada para el trópico en diversas épocas del año. La calidad del pasto Tanner, en términos de proteína cruda (PC) (62 ± 2.8 g/kg de materia seca –MS-) y digestibilidad (532 ± 9.7 g/kg de MS), estuvo por debajo de los parámetros óptimos de calidad. Existen varios factores que pueden influir para que se presenten estos valores: edad de corte, falta de fertilización, calidad del suelo. Es posible que en este estudio la calidad del pasto Tanner estuvo asociada a la edad al corte que fue mayor a 90 días. Para *C. argentea*, los valores de PC, fibra detergente neutro (FDN) y fibra detergente ácido (FDA) fueron consistentes con los reportado por González *et al.* (2012) y Castillo *et al.* (2013), bajo condiciones similares de clima y tipo de suelo. No obstante, la cantidad de lignina (201 ± 79 g/kg MS) fue superior a lo reportado por los mismos autores (15.1% y $16.7 \pm 1.3\%$, respectivamente). La digestibilidad *in situ* (DISMS) obtenida a las 48 horas ($56.8 \pm 2.2\%$) fue muy superior a lo reportado por Suárez *et al.* (2008) (35%). Con el porcentaje de lignina obtenido se esperaría un decremento en la digestibilidad; ya que ésta ha mostrado mantener una correlación negativa con la digestibilidad, y positiva con la madurez de la planta (Jung y Allen, 1995); sin embargo, la lignina es un polímero estructural de naturaleza fenólica, cuya cuantificación mediante la técnica de fraccionamiento de Van Soest puede ser sobreestimada ante la presencia de taninos y otros compuestos polifenólicos (Aufrère y Guérin, 1996). A pesar de que *C. argentea* se considera una leguminosa no taninífera (Bernal *et al.*, 2008), se ha reportado una moderada concentración de polifenoles con alta actividad biológica, lo cual puede influir en la cuantificación de lignina mediante el método utilizado.

5.2. Consumo de materia seca

El objetivo de este estudio fue determinar, bajo un sistema de corte y acarreo, el consumo de materia seca de *C. argentea* ofrecida en diferentes niveles de inclusión de la dieta de bovinos. Se observó que la inclusión de *C. argentea* en la dieta aumentó el consumo de MS ($P < 0.05$). Comparativamente, los animales del T1 (0:100) consumieron menos cantidad de MS que los animales de los T2 (15:85), T3 (30:70) y T4 (45:55). Hernández-Gil *et al.* (2006) mencionan que el consumo voluntario de MS se encuentra directamente relacionado tanto con la cantidad como con la calidad nutricional de los componentes de la dieta. La baja calidad del pasto Tanner, en términos de PC y digestibilidad, pudo contribuir para que los animales del T1 consumieran menos MS. En la dieta de bovinos, es necesario un porcentaje de PC superior a 70 g/kg de MS para un óptimo funcionamiento ruminal (Van Soest, 1994). La falta de nitrógeno (N) ruminal, consecuentemente, puede inducir una reducción del consumo voluntario de MS (Wilson y Lascano, 1997). Además, se ha documentado que los componentes de la fibra (por ejemplo la lignina) pueden limitar el consumo de MS en bovinos (Sandoval-Castro *et al.*, 2005). Los animales en los tratamientos con diferente nivel de inclusión en la dieta de *C. argentea* mostraron mayor consumo de MS (T4>T3>T2). La poca información que existe sobre el consumo de *C. argentea* por bovinos coincide en que la inclusión en la dieta de la leguminosa aumenta el consumo de MS. Se reportó un incremento en el consumo voluntario de *C. argentea* conforme se aumenta el porcentaje de inclusión de la leguminosa en la dieta lo cual se asoció a la utilización de hoja fresca y libre de tallos (Wilson y Lascano, 1997; Benavides *et al.*, 2010). Por otro lado, Franco *et al.* (1997) reportaron que novillonas de 250 a 350 kg PV consumieron 2.788 kg/100 kg PV, de una dieta basal de *Hyparrhenia rufa* adicionada con 2 kg MS/100 kg PV/día de *C. argentea* pre-marchita. En ganado lechero, se comparó el consumo voluntario de MS (CVMS) entre grupos alimentados con ensilado de sorgo, con y sin la adición de *C. argentea* (2 y 3 kg de MS) y se demostró que la suplementación con

dicha leguminosa incrementó el consumo de MS (Sánchez y Ledin, 2006). Está documentado que las leguminosas tropicales pueden ser una alternativa en la alimentación del ganado bovino por su contenido nutricional. Pero también se ha señalado que estas plantas pueden ser nocivas para los rumiantes por la presencia de compuestos secundarios (Muller-Harvey, 2006). En el trópico, tanto árboles como arbustos pueden contener altas concentraciones de compuesto secundarios y/o lignina que pueden modular la ingestión por rumiantes (Sandoval-Castro *et al.* 2005). Lo anterior puede ocurrir cuando se presenta en exceso algún nutriente (ej. proteína cruda), cuando hay desbalance de nutrientes como la presencia de baja cantidad de energía o la presencia de toxinas que limitan el consumo mediante una sensación de saciedad (Provenza, 2006). *Cratylia argentea* ha sido clasificada como una leguminosa no-taninífera que posee bajos niveles de compuestos secundarios (Osuga *et al.*, 2005); en estudios cualitativos de cromatografía en capa fina se encontraron niveles incipientes de flavonoides, ácidos hidroxicinámicos, terpenos y saponinas (von Son-de Fernex *et al.*, datos no publicados). No obstante, en este estudio, el consumo de MS no se vio afectado.

5.3. Consumo de proteína cruda

Otros estudios coinciden en que *C. argentea* posee un alto contenido de PC (20%) Castillo *et al.*, (2013). En este trabajo, se encontró que el consumo de PC fue directamente proporcional al porcentaje de inclusión de *C. argentea* en la dieta ($P < 0.05$), debido a un posible incremento en la tasa de sustitución de la gramínea debido a la mala calidad de la misma, así como a una mayor disponibilidad de la leguminosa. El mayor consumo de PC se vio reflejado en la concentración de urea en suero, la cual mostró un incremento lineal, donde los animales del T4 tuvieron una concentración mayor en las horas cero y seis (12.2 y 14.9 mg/dL respectivamente).

5.4. Urea en sangre por efecto de los tratamientos evaluados

El consumo elevado de PC se ha asociado negativamente con el consumo de MS (Fenderson y Bergen, 1976). Además de que se ha reportado que vacas con una concentración de urea en sangre mayor a 20 mg/dL presentan problemas reproductivos, resultando en bajas tasas de concepción (Ferguson *et al.*, 1993). La concentración de urea en sangre de los animales en T2, T3 y T4 estuvieron dentro de los parámetros óptimos de salud del ganado bovino que van de 6 a 22 mg/dL (RAR, 2000). Kohn *et al.* (2005) mencionan que los herbívoros tienen la capacidad de reciclar la urea de la sangre al intestino, favoreciendo los procesos de fermentación generadores de energía. Esta capacidad que poseen los rumiantes, para mantener diferentes concentraciones de urea en el plasma sanguíneo, les permite sobrevivir en condiciones de baja cantidad y calidad de proteína dietaria. Por otro lado, en este trabajo, se observó un coeficiente de correlación de 0.7016 y 0.7043, entre el consumo de PC y la concentración de urea a las cero y seis horas, respectivamente ($P < 0.05$). En un estudio previo con novillonas (Ho x Cebú) pastoreando/ramoneando en un sistema de pastoreo en monocultivos de *B. brizantha* o praderas asociadas de *B. brizantha* con *C. argentea*, la concentración de urea en sangre fue de 10.8 ± 0.6 y 7.2 ± 0.2 mg/dL para el tratamiento de asociación gramínea-leguminosa y el grupo control (sólo pastoreo de gramínea), respectivamente (González *et al.*, 2012). Carroll *et al.* (1988) reportaron en ganado lechero, una concentración de urea en suero de 10 mg/dL de urea con dietas con 20% de PC; valor que en éste trabajo, puede ser el intersección entre las concentraciones obtenidas para el T2 y T3, correspondientes a las inclusiones de 15% y 30% de la leguminosa. Debido a la repetibilidad en la asociación entre el consumo de PC y niveles de urea en sangre de bovinos alimentado con *C. argentea*, es factible poder utilizar la medición de urea en sangre para determinar el consumo de PC en animales bajo condiciones de pastoreo/ramoneo en sistemas silvopastoriles donde se incluya la misma leguminosa. No obstante, es

necesario realizar estudios y mediciones en campo mediante experimentos controlados para poder seguir generando información al respecto.

5.5. Nitrógeno en heces y orina

En cuanto a la eliminación de nitrógeno en heces y orina, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ($P > 0.05$); no obstante, se observó un incremento lineal en la eliminación de N ureico en la orina, conforme se incrementó el porcentaje de inclusión de *C. argentea* en la dieta. Hess *et al.* (2004) reportaron en ovinos alimentados con dietas basales de pasto henificado (*B. dictyoneura*) con y sin la inclusión de *C. argentea* (2:1 o 1:2), que la presencia de la leguminosa en la dieta incrementó el consumo de MS, el consumo de N y la excreción de N por la vía urinaria. También mencionaron que el incremento en la eliminación de N estuvo relacionado a un mayor volumen de orina y mayor consumo de agua, lo cual es inconsistente con los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, ya que la cantidad de orina total y el consumo de agua no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los cuatro tratamientos ($P > 0.05$). Las inconsistencias encontradas en éste trabajo de investigación podría asociarse a la diferencia en la edad de la leguminosa al corte, así como a la especie animal utilizada como modelo experimental (Kohn *et al.*, 2005).

5.6. Derivados de purina

Los derivados de purinas en orina (ácido úrico y alantoina) no fueron diferentes entre tratamientos. En contraparte, Hess *et al.*, (2004) mencionan un incremento en la excreción de alantoina y derivados púricos en ovinos alimentados con *C. argentea*, sugieren que el aporte metabólico de proteína se mejoró debido a un incremento en el aporte de proteína microbiana. En este trabajo, la estimación de síntesis de proteína microbiana propuesta por Chen y Gomes (1992) dio valores negativos, evidenciando que el modelo propuesto no se ajustó a las estimaciones realizadas. Dragomir *et al.* (2007) tampoco pudieron determinar la síntesis de proteína microbiana en ovinos mediante el mismo método de estimación y concluyeron que esto se debió a que la ecuación se estructuró con animales con un nivel de alimentación mayor y en consecuencia, cuando los valores utilizados en un diseño experimental exceden de dichos rangos, no es posible calcular la síntesis de proteína microbiana. También mencionan que es probable que los valores de síntesis proteica no alcanzaran los esperados, debido a que los coeficientes de conversión de la energía disponible en rumen y el nitrógeno para generar proteína microbiana, son altamente susceptibles al grado de madurez de la planta y su método de conservación. Esto último también pudiese ser consistente con este trabajo de investigación ya que se utilizó una leguminosa con una edad al corte de aproximadamente 300 días.

Experimento II.

5.7. Consumo de forraje por animales infectados o no con NGI

Se evaluó el consumo voluntario (CV) de materia seca en bovinos infectados y no infectados con NGI. Al analizar los datos expresados en porcentaje de peso vivo (% PV), no se pudieron apreciar diferencias estadísticamente significativas, tal como lo reporta Sykes en 1982; sin embargo, al determinar los gramos de MS consumidos/kg PV, se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos, mostrando un mayor consumo por parte de los bovinos libres de infección por NGI ($p < 0.01$). Las diferencias en el CV son consistentes con los reportes previos sobre la anorexia inducida por las nematodosis gastrointestinales en rumiantes (Coop y Kyriazakis, 1999). Así mismo, si se toma en consideración que *Cooperia* sp. representó el 67% del inóculo utilizado en la infección artificial, es posible relacionar estrechamente la disminución del consumo con la presencia de dicho NGI. Stromberg *et al.* (2012) reportan en bovinos, disminuciones en el CV de hasta 0.68 kg MS día en animales infectados monoespecíficamente con *Cooperia punctata*; y sugiere que *C. punctata* tiene efectos detrimentales tanto en consumo como en la absorción y/o utilización de los nutrientes aportados en la dieta. No obstante, los valores de sustitución de la gramínea por la leguminosa con respecto al total de la dieta ofrecida, fueron de 14.4% y 12.4% para el grupo infectado y el no infectado, respectivamente ($P < 0.05$); mientras que la tasa de consumo del pasto Tanner alcanzó valores de 85.6% y 87.6% ($P < 0.05$). Dichos valores indican que los animales infectados con NGI consumieron un mayor porcentaje de la leguminosa y menor porcentaje de pasto Tanner en comparación al grupo libre de infección. Hasta nuestro conocimiento, no se han realizado estudios que evalúen el consumo de leguminosas en bovinos infectados con NGI; sin embargo, diferentes estudios han reportado que ovinos infectados con *H. contortus* incrementan el consumo de plantas ricas en taninos, lo cual afecta directamente la biología y fertilidad del NGI (Martínez-Ortiz de Montellano *et al.*,

2010). Así mismo, se han reportado efectos inmunonutricionales, donde algunos metabolitos secundarios tienen la capacidad de formar complejos con las proteínas protegiéndolas de la degradación ruminal, aumentando el flujo de proteína de sobrepaso, favoreciendo así al sistema inmunológico; permitiendo a los rumiantes infectados, alcanzar la homeostasia fisiológica con mayor rapidez (Hoste *et al.*, 2012). A pesar de que *C. argentea* ha sido clasificada como una leguminosa no-taninífera, ésta contiene múltiples metabolitos secundarios como flavonoides glicosilados y saponinas (von Son-de Fernex *et al.* datos no publicados), los cuales en estudios bio-dirigidos han mostrado tener un efecto antiparasitario (Barrau *et al.*, 2005; Chapagain *et al.*, 2008). A pesar de que el modelo experimental no permitió la evaluación del efecto antihelmíntico directo o indirecto que pudiesen haber ejercido los metabolitos secundarios, el comportamiento de consumo observado en los bovinos infectados, sugiere un posible efecto nutracéutico de *C. argentea*, el cual deberá ser evaluado posteriormente.

VI. CONCLUSIÓN:

El consumo voluntario de los animales suplementados con la leguminosa, aumentó en todos los niveles con respecto al grupo testigo. Los niveles de nitrógeno en heces y orina no mostraron aumentos significativos entre tratamientos; sin embargo, el nitrógeno sérico incrementó significativamente entre los mismos, sin sobrepasar los parámetros clínicos aceptables. Los animales con una infección por nematodos gastrointestinales, disminuyeron el consumo voluntario de materia seca en comparación con el grupo libre de infección, no obstante la tasa de sustitución de la gramínea por *C. argentea* fue mayor en los primeros. Los animales infectados consumieron una mayor proporción de la leguminosa con respecto al total de MS ingerida; mientras que los no infectados mostraron una mayor consumo de la gramínea. Por lo tanto, la inclusión de *C. argentea* en la dieta de bovinos representó una alternativa viable para la nutrición de los mismos. Se sugiere realizar trabajos de investigación que evalúen el efecto tanto directo como indirecto de *C. argentea* sobre las infecciones por NGI.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

- A.O.A.C. Official Methods of Analysis 13 th Edition, 1984.
- Ademola IO, Eloff JN. In vitro anthelmintic activity of *Combretum molle* (R. Br. ex G. Don) (Combretaceae) against *Haemonchus contortus* ova and larvae. *Vet Parasitol* 2010; 169: 198-203.
- AFRC. Energy and Protein Requirements of Ruminants. Wallingford-UK: CAB International 1993.
- Alonso-Díaz M.A, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal CM. Amino acid profile of the protein from whole saliva of goats and sheep and its interaction with tannic acid and tannins extracted from the fodder of tropical plants. *Small Ruminant Research* 2012; 103: 69-74.
- Alonso-Díaz MA, Torres-Acosta, JF, Sandoval-Castro CA, Aguilar-Caballero AJ, Hoste H. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Vet Parasitol* 2008a; 153: 313-319.
- Alonso-Díaz, MA, Torres-Acosta, JF, Sandoval-Castro CA, Capetillo-Leal C, Brunet S, Hoste H. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 2008b;153: 187-192.
- Ammar H, López S, Salem AZM, Bodas R, González JS. Effect of saliva from sheep that have ingested quebracho tannins on the in vitro rumen fermentation activity to digest tannin-containing shrubs. *Animal Feed Science and Technology* 2011; 163: 77-83.
- ARC. The Nutrient Requirements of Ruminant Livestock. Commonwealth Agricultural Bureaux, Slough 1984; Suppl 1.
- Argel P y Lascano C. *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze: Una nueva leguminosa arbustiva para suelos ácidos en zonas subhúmedas tropicales. *Pasturas tropicales* 1998; 20(1): 1-7.
- Arnaud-Ochoa R, Alonso-Díaz MA. Unidades de producción bovina con nematodos gastrointestinales resistentes al albendazol (benzimidazoles) en México. *Revista Científica* 2012; FCV-LUZ 22: 315-320.
- Athanasiadou S, Kyriazakis I, Jackson FRLC. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep in vitro and in vivo studies. *Veterinary Parasitology* 2001; 99: 205-219.
- Aufrère J, and Guérin H. Critical review of chemical and enzymatic methods for the estimation of nutritive value in roughages. *Ann. Zootech* 1996; 45: suppl. 21-38.
- Bahadur D. Purine nitrogen index, a posible parameter for rapid feed evaluation in ruminants. Thesis for the degree of Master of Science, University of Aberdeen, UK 1997; 79 p.
- Barahona R, Lascano CE, Cochran R, Morrill J. Efecto del manejo poscosecha del forraje y la adición del polietilenglicol en la concentración y la astringencia de

- taninos condensados en leguminosas tropicales. *Pasturas tropicales* 1996; 18: 41-46.
- Barrau E, Fabre N, Fouraste I, Hoste H. Effect of bioactive compounds from Sainfoin (*Onobrychis viciifolia* Scop.) on the in vitro larval migration of *Haemonchus contortus*: role of tannins and flavonol glycosides. *Parasitology* 2005; 131: 531-538.
- Basabe J, Eiras DF, Romero JR. Nutrition and Gastrointestinal Parasitism in Ruminant Production. *Arch Zootec* 2009; 58: 131-144.
- Becerra-Nava R, Alonso-Díaz MA, Fernández Salas A, Quiroz RH. First report of cattle farms with gastrointestinal nematodes resistant to levamisole (imidazothiazoles) in Mexico 2014; ISSN: 0304-4017.
- Benavides CCA, Valencia MM, Estrada AJ. Efecto de la veranera forrajera Carro (*Cratylia argentea*) sobre la ganancia de peso de ganado doble propósito. *vet. Zootec.* 2010; 4: 23-27.
- Bernal L, Ávila P, Ramírez G, Lascano CE, Tiemann T, y Hess H. Efecto del ensilaje y el heno de *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* sobre la producción de gas in vitro. *Arch. Latinoam. Prod. Anim.* 2008; 16(3):101-107.
- Bernal-Bechara LC. Efecto de las mezclas de las leguminosas *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal in vitro y producción de leche en bovinos. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira, Colombia 2007.
- Calsamiglia S, Stern MD and Firkins JL. Comparison of nitrogen-15 and purines as microbial markers in continuous culture. *Journal of Animal Science.* 1996; 74: 1375-81
- Carro MD. La determinación de la síntesis de proteína microbiana en el rumen: comparación entre marcadores microbianos (Revisión). *Invest Agraria: Producción y Sanidad Animal* 2001; 16: 5-27
- Carroll DJ, Barton BA, Anderson GW y Smith RD. Influence of protein intake and feeding strategy on reproductive performance of dairy cows. *Journal of Dairy Sciences* 1988; 71:470-481.
- Carulla EJ. Forage intake and N utilization by sheep as affected by condensed tannins. Tesis PhD. University of Nebraska, Lincoln, EU 1994.
- Castillo GE, Estrada FJG, Valles-de la Mora B, Castelán OOA, Ocaña ZE, Jarillo RJ. Rendimiento total de materia seca y calidad nutritiva de hojas y tallos jóvenes de cuatro accesiones de *Cratylia argentea* en el trópico húmedo de Veracruz, México. *Avances en Investigación Agropecuaria* 2013; 17: 79-94.
- Cenci FB, Louvandini H, McManus CM, Dell'Porto A, Costa DM, Araujo SC, Minho AP, Abdalla AL. Effects of condensed tannin from *Acacia mearnsii* on sheep infected naturally with gastrointestinal helminthes. *Vet Parasitol* 2007;144: 132-137.
- Chalate-Molina H, Gallardo-Lopez F, Pérez-Hernández P, Lang-Ovalle FP, Otraga-Jimenez E, Vilaboja AJ. Características del sistema de producción bovinos de doble propósito en el estado de Morelos, México. *Zootecnia Tropical* 2010; 2:3;1-8.

- Chapagain BP, Saharan V, Wiesman Z. Larvicidal activity of saponins from *balanites aegyptiaca* callus against *Aedes aegypti* mosquito. [Bioresour Technol.](#) 2008; 99:1165-8.
- Charlier J, Camuset P, Claerebout E, Courtay B, Vercruyse J. A longitudinal survey of anti-Ostertagia ostertagi antibody levels in individual and bulk tank milk in two dairy herds in Normandy. *Res. Vet. Sci.* 2007; 83: 194–197.
- Charlier J, Hoglund J, von Samson-Himmelstjerna G, Dorny P, Vercruyse J. Gastrointestinal nematode infections in adult dairy cattle: impact on production, diagnosis and control. *Vet Parasitol* 2009; 164: 70-79.
- Chen XB and Gomes MJ. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives- and overview of the technical details. Int. Feed Resources Unit, Rowett Research Institute. Aberdeen. UK. 1992; 1-19.
- Chen XB and Gomes MJ. Estimation of microbial protein supply to sheep and cattle based on urinary excretion of purine derivatives - An overview of the technical details. International Feed Resources Unit Rowett Research Institute, Bucksburn Aberdeen, UK. 1995; 1-21.
- Chen XB, Mathiewson J, Hovell FD De B and Reeds PJ. Measurement of purine derivatives in urine of ruminants using automated methods. *British Journal of Nutrition.* 1990; 53: 23-33.
- Coates DB. Tropical legumes for large ruminants, Cap 8 in: Tropical legumes in animal nutrition. D Mello, J.P.F & Devendra, C. (editors) CAB International, Oxon England 1995; 191-230 pp.
- Colditz IG. Six costs of immunity to gastrointestinal nematode infections. *Parasite Immunology* 2008; v.30, p.63-70.
- Coop RL and Kyriazakis I. Nutrition-parasite interaction. *Vet. Parasitol.* 1999; 84: 187-204.
- Coop RL, Holmes PH. Nutrition and Parasite Interaction. *International Journal for Parasitology*, 1996; Vol. 26, No. 8/9, pp. 951-962.
- Cordero-del-Campillo M, Rojo-Vázquez FA. *Parasitología Veterinaria* 1999. McGraw-Hill Interamericana, Madrid, España.
- Corwin RM. Economics of gastrointestinal parasitism of cattle. *Veterinary Parasitology* 1997; 72: 451-460.
- Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 99-107.
- Dragomir C, Pop S, Nicolae M, Dihoru A, Stoica I. Effect of the stage of maturity and mode of conservation of Sudangrass on the efficiency of microbial proteosynthesis in rumen. *Archiva Zootechnica* 2007; vol. 10.
- Emmans G, Kyriazakis I. Consequences of genetic change in farm animals on food intake and feeding behaviour. *Proceedings of the Nutrition Society* 2001; 60: 115-125.
- Encalada-Mena LA, Corbala-Bermejo AC, Vargas-Magañas JJ, García-Ramírez MJ, Uicab-Brito L, Río-Rodríguez J. Prevalencia de nematodos gastroentéricos de

- becerros en sistemas de doble propósito del municipio de Escárcega, Campeche, México. *Agrociencia* 2009; 43: 569-576.
- Enríquez QJF, Hernández A, Pérez J, Quero A y Moreno J. Densidad de siembra y frecuencias de corte en el rendimiento de *Cratylia argentea* (Desvaux) O. Kuntze en el sur de Veracruz. *Tec. Pec. Mex.* 2003; 42(1): 75-84.
- Fenderson CL, y Bergen WG. Effect of excess dietary protein on feed intake and nitrogen metabolism in steers. *J. Anim Sci.* 1976; 42: 1323-1330.
- Ferguson J, Galligan T, Blanchard T, and Reeves M. Serum urea nitrogen and conception rate: The usefulness of test information. *J. Dairy Sci.*, 1993; 76: 3742-3746.
- Flores O, Ibrahim M, et al. El efecto de los taninos de especies leñosas forrajeras sobre la utilización de nitrógeno por bovinos. En: *Revista agroforestería en las Américas.* 1999; Vol 6 No 23. pág. 42-44.
- Forbes JM. *Voluntary food intake and diet selection in farm animals.* CABI Publishing.. Wallingford, UK 1995.
- Franco MH, Ibrahim M, Pezo D, Camero A, Araya J. Efecto del premarchitamiento y la adición de melaza sobre la calidad nutricional y el consumo de *Cratylia argentea* en bovinos bajo pastoreo de *Hyparrhenia rufa* durante la época seca en el trópico subhúmedo de Costa Rica. 1997; Artículo 1 Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 36 p.
- Freer M. The control of food intake by grazing animals. Cap. 6. En: Morley, F.W.H. *Grazing animals.* 1.B. De: Neiman-Sorensen, A.; Tribe, D.E. *World Animal Science* 1981. Elsevier Scientific Publishing Company. Amsterdam, The Netherlands.
- Galindo J y Marrero Y. Manipulación de la fermentación microbiana ruminal. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola.* 2005. 39: 439-450.
- Gennari S, Abdalla A, Vitti D, Meirelles C, Lopes R y Viera M. *Haemonchus placei* in calves: effects of dietary protein and multiple experimental infection on worm establishment and pathogenesis. *Vet. Parasitol* 1995; 59: 119-126.
- Githiori JB, Athanasiadou S, Thamsborg SM. Use of plants in novel approaches for control of gastrointestinal helminths in livestock with emphasis on small ruminants. *Vet Parasitol* 2006;139: 308-320.
- Goering HK, Van Soest P. *Forage Fiber Analysis.* USDA, Agriculture Handbook 1970; 379. Washington DC: Agricultural Research Service.
- González AMN, Valles-de la Mora B, Alonso DMA, Castillo GE, Eliazar Ocaña ZE, Jarillo RJ. Effect of grazing *Cratylia argentea* associated with *Brachiaria brizantha*-Toledo on quality pasture and weight gain in Holstein X Zebu heifers. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 2012; 15 SUP 2: S1-S11.
- Hagerman A.E.; M.E. Rice; N.T. Rritchard.,1998.Mechanisms of protein precipitation for two tannins, pentagalloyl glucose and epicateching (4-8) catechin (procyanidin). *J Agric Food Chem*; 46: 2590-2595.
- Handique J, Baruah J. Polyphenolic compounds: an overview. *Reactive & Functional Polymers* 2002; 52: 163-188.

- Haslam E. Natural Polyphenols (Vegetable Tannins) as Drugs: Possible Modes of Action. *J Nat Prod* 1996; 59: 205-215.
- Hawkins JA. Economic benefits of parasite control in cattle. *Veterinary Parasitology* 1993; 46: 159-173.
- Hernández-Gil M, Sandoval Castro CA y Ku Vera JC. *Consumo Voluntario de bovinos en pastoreo en el trópico*. Universidad Autónoma de Yucatán, México 2006; 368.
- Hernandez-Villegas MM, Borges-Argaez R, Rodriguez-Vivas RI, Torres-Acosta JF, Mendez-Gonzalez M, Caceres-Farfan M. In vivo anthelmintic activity of *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus* in goats. *Vet Parasitol* 2012.
- Hess HD, Beuret RA, Lotscher M, Hindrichsen IK, Machmuller A, Carulla JE, et al. Ruminal fermentation, methanogenesis and nitrogen utilization of sheep receiving tropical grass hay-concentrate diets offered with *Sapindus saponaria* fruits and *Cratylia argentea* foliage. *Anim. Sci.* 2004; 79:177–189.
- Holmann F, Lascano C. Sistemas de alimentación con leguminosas para intensificar fincas lecheras: un proyecto ejecutado por el Consorcio Tropiclleche. CIAT: Working doc; 2001; 184: 1-109.
- Holmann F, Lascano CE. Sistemas de alimentación con leguminosas para intensificar fincas lecheras: Un proyecto ejecutado por el consorcio tropiclleche. CIAT Working Document 184. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical), Cali, Colombia, and ILRI (International Livestock Research Institute), Nairobi, Kenia. 2001; 109 pp.
- Hoskin SO, Wilson PR, Barry TN, Charleston WAG y Waghorn GC. Effect of forage legumes containing condensed tannins on lungworm (*Dictyocaulus* sp.) and gastrointestinal parasitism in young red deer (*Cervus elaphus*). *Research in Veterinary Science* 2000; 68, 223-230.
- Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol* 2006; 22: 253-261.
- Hoste H, Martinez-Ortiz-De-Montellano C, Manolaraki F, Brunet S, Ojeda-Robertos N, Fourquaux I, Torres-Acosta JF, Sandoval-Castro CA. Direct and indirect effects of bioactive tannin-rich tropical and temperate legumes against nematode infections. *Veterinary Parasitology* 2012; 186: 18-27.
- Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Aguilar-Caballero AJ. Nutrition-parasite interactions in goats: is immunoregulation involved in the control of gastrointestinal nematodes? *Parásitology Immunology* 2008; 30: 79-88.
- Houdijk JG, Kyriazakis I, Kidane A, Athanasiadou S. Manipulating small ruminant parasite epidemiology through the combination of nutritional strategies. *Vet Parasitol* 2012; 186: 38-50.
- Isaza JH. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia et Technica*. Univ. Tecnol. Pereira 2007; 33: 13–18.
- Isaza MJH. Taninos o polifenoles vegetales. *Scientia Et Technica XIII*, 2007; 13-18.
- Jackson F, Miller J. Alternative approaches to control--quo vadit? *Vet Parasitol* 2006; 139: 371-384.

- Juhnke J, Miller J, Hall JO, Provenza FD, Villalba JJ. Preference for condensed tannins by sheep in response to challenge infection with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol* 2012; 188: 104-114.
- Jung HG, and Allen MS. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 1995; 73: 2774–2790.
- Kaminsky R, Bapst B, Stein PA, Strehlau GA, Allan, BA, Hosking BC, Rolfe PF, Sager H. Differences in efficacy of monepantel, derquantel and abamectin against multi-resistant nematodes of sheep. *Parasitol Res* 2011; 109: 19-23.
- Knox M, Torres-Acosta JFJ y Aguilar-Caballero A. Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol* . 2006; 139: 385-393.
- Knox MR, y Steel JW. Nutritional enhancement of parasite control in small ruminant production systems in developing countries of south-east Asia and the Pacific. *International Journal for Parasitology* 1996; 26,963-970.
- Kohn RA, Dinneen MM and Russek-Cohen E. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, pigs and rats. *J. Anim. Sci.* 2005; 83: 879-889.
- Kumar R. Anti-nutritional factors, the potential risks of toxicity and methods to alleviate them. In *Legume Trees and Other Fodder Trees as Protein Sources for Livestock*, 1992; 102: 145–160 [A Speedy and PL Pugliese, editors]. Rome: FAO.
- Kyriazakis I, Houdijk JGM. Immunonutrition: Nutritional control of parasites. *Small Rumin. Res.* 2006; 62:79–82.
- Lascano C, Plazas C. Utilidad de la leguminosa semiarbustiva *Cratylia argentea* en sistemas de ganado de doble propósito del Piedemonte Llanero: Validación y difusión. Informe Final. CIAT, Cali, Colombia; Programa Nacional de Transferencia de Tecnología (PRONATTA), Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (Colombia). 2003; 61.
- Lascano CE y Avila P. Potencial de producción de leche en pasturas solas y asociadas con leguminosas adaptadas a suelos ácidos. *Pasturas Tropicales* 1991; 13(3): 2-10.
- Lascano CE. Calidad nutritiva de *Cratylia argentea*. En: Pizarro, E. A y Coradin, L. (eds). Embrapa, Cenargen, CPAC y CIAT, Memorias Taller sobre *Cratylia* realizado del 19 al 20 de julio de 1995 en Brasilia, Brasil. p. 83-97.
- Lisonbee LD, Villalba JJ, Provenza FD, Hall JO. Tannins and self-medication: Implications for sustainable parasite control in herbivores. *Behav Processes* 2009; 82: 184-189.
- Macedo R, Tarré RM, Ferreira E, Rezende CP, Pereira JM, Cadisch G, Rouws JRC, Alves BJR, Uquiaga S, Boddey RM. Forage intake and botanical composition of feed for cattle fed *Brachiaria*/legume mixtures. *Scientia Agricola* 2010; 67: 384–392.
- Marden JP, Julien C, Monteils V, Auclair E, Moncoulon R, Bayourthe C. how does live yeast differ from sodium bicarbonate to stabilize ruminal ph in high-yielding dairy cows. *J Dairy Sci* 2008; 91:1320-1331.

- Martinez-Ortiz-de-Montellano C, Vargas-Magana JJ, Canul-Ku HL, Miranda-Soberanis R, Capetillo-Leal C, Sandoval-Castro CA, Hoste H, Torres-Acosta JF. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 2010; 172: 283-290.
- Min BR y Hart SP. Tannins for suppression of internal parasites. *J. Anim. Sci.* 2003; 81 (E. Suppl, 2), E102-E109.
- Min BR, Miller D, Hart SP, Tomita G, Loetz E y Sahlu T. Direct effects of condensed tannins on gastrointestinal nematodes in grazing Angora goats. *J. Anim. Sci.* 2003; 81(Suppl. 2):23.Abstr.).
- Minho AP, Bueno ICS, Louvandini H, Jackson F, Gennari SM, Abdalla AL. Effect of *Acacia molissima* tannin extract on the control of gastrointestinal parasites in sheep. *Animal Feed Science and Technology* 2008; 147: 172-181.
- Moallem U, Lehrer H, Livshitz L, Zachut M, Yakoby S. The effects of live yeast supplementation to dairy cows during the hot season on production, feed efficiency and digestibility. *J Dairy Sci* 2009; 92:343-351.
- Molan AL, Waghorn GC, Min BR, McNabb WC. The effect of condensed tannins from seven herbages on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitologica* 2000; 47: 39-44.
- Morris CA, Cullen NG, Green RS, Hickey SM. Sire effects on antibodies to nematode parasites in grazing dairy cows. *New Zealand Journal of Agricultural Research* 2002; 45: 179-185.
- Mueller-Harvey. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Volume 86, Issue 13, pages 2010–2037, October 2006.
- Mulligan F, Dillon P, Callan J, Rath M, O'Mara F. Supplementary concentrate type affects nitrogen excretion of grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2004; 87: 3451-3460.
- Mupeyo B, Barry TN, Pomroy WE, Ramirez-Restrepo CA, Lopez-Villalobos N, Pernthaner. Effects of feeding willow (*Salix spp.*) upon death of established parasites and parasite fecundity. *Anim Fed Sci and Tech.* 2011; 164: 8-20.
- Nari A y Fiel C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención y control. Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur, Montevideo 1994; 76.
- Nari A, Salles J, Gil A, Waller PJ, Hansen JW. The prevalence of anthelmintic resistance in nematode parasites of sheep in Southern Latin America: Uruguay. *Vet Parasitol* 1996; 62: 213-222.
- National Research Council (NRC). Nutrient requirements of Dairy Cattle. 7 rev. ed. *Natl. Acad. Sci.*, Washington, DC. 2001; 382 p.
- National Research Council (NRC). The Nutrient Requirements of beef Cattle, 7th ed. Revised Edition. National Academy of Sciences, Washington, DC. 2000; 234.
- Nelson D, Cox M. Lehninger principles of biochemistry. 3rd edition. Worth Publishers. New York, U.S.A. 2000; 1152.
- Nielsen AC. Farm Market Index (anthelmintic purchases - dairy cattle). Wellington, A. C. Nielsen (NZ) Limited (formerly MRL Research Group) 1997.

- Niezen JH, Charleston WAG, Hodgson J, Miller CM, Waghorn TS and Robertson HA. Effect of plant species on the larvae of gastrointestinal nematodes which parasitise sheep. *International Journal for Parasitology* 1998; 28: 791–803.
- Niezen JH, Waghorn TS, Charleston WA. y Waghorn GC. Growth and gastrointestinal parasitism in lamb grazing one of seven herbage and dosed with larvae for six weeks. *J. Agric. Sci.* 1995; 125:281–289.
- Novobilsky A, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. Condensed tannins act against cattle nematodes. *Vet Parasitol* 2011; 182: 213-220.
- Novobilsky A, Stringano E, Hayot Carbonero C, Smith LM, Enemark HL, Mueller-Harvey I, Thamsborg SM. In vitro effects of extracts and purified tannins of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) against two cattle nematodes. *Vet Parasitol* 2013.
- Orskov ER, Hovell FD and Mould F. Uso de la técnica de la bolsa de nylon para la valuación de alimentos. *Prod. Anim. Trop.* 1980; 5: 213 – 233.
- Osuga IM, Abdulrazak SA, Ichinohe T y Fujihara T. Chemical composition, degradation characteristics and effect of tannin on digestibility of some browse species from Kenya harvested during the wet season. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 2005; 18:54-60.
- Ozerol NH, Silverman PH. Enzymatic studies on the exsheathment of *Haemonchus contortus* infective larvae: the role of leucine aminopeptidase. *comp biochem physiol* 1972; 42: 109-121.
- Paolini V, Fouraste I y Hoste H. In vitro effects of three woody plants and sainfoin extracts on 3rd-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitology* 2004; 129:69-77.
- Perri AF, Mejia ME, Licoff N, Lazaro L, Miglierina M, Ornstein A, Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM. Gastrointestinal parasites presence during the peripartum decreases total milk production in grazing dairy Holstein cows. *Vet Parasitol* 2011; 178: 311-318.
- Pizarro E A. Introducción y Evaluación de leguminosas forrajeras arbustivas en el Cerrado Brasileño 1995; pp. 40 – 49.
- Provenza FD, Burritt EA, Clausen TP, Bryant JP, Reichardt PB and Distel RA. Conditioned flavor aversion: a mechanism for goats to avoid condensed tannins in blackbrush. *Am. Nat* 1990; 136:810–828.
- Provenza FD, Scott CB, Phy TS, Lynch JJ. Preference of sheep for foods varying in flavors and nutrients. *J Anim Sci.* 1996; 74(10):2355-61.
- Provenza FD. Behavioural mechanisms influencing use of plants with secondary metabolites by herbivores. BSAS Publication 34. The assessment of intake, digestibility and the roles of secondary compounds. Edited by C.A. Sandoval-Castro, F.D.DeB.D. Hovell, J.F.J. Torres-Acosta and A. Ayala-Burgos. Nottingham University Press. 2006; 183-195.
- Queiroz LPDE y Coradin L. Biogeografía de *Cratylia* y áreas prioritarias para coleta. En: Potencial del Género *Cratylia* como leguminosa forrajera. EMPRAPA, CENARGEN, CPAC Y CIAT. Memorias Taller sobre *Cratylia* realizado del 19 – 20 de Julio de 1995 en Brasilia, Brasil. P. 1 – 28.

- Quiroz-Romer H, Chavarría-Martínez B, Hernandez-Suarez A, Ochoa-Galván P, Cruz-Perez J, Cruz-Mendoza I. Efecto de una nueva formulación de ivermectina + abamectina de larga duración contra nematodos gastrointestinales y la diferencia en ganancia de peso en bovinos. *Veterinaria México* 2009; 40: 157-165.
- Raaflaub M y Lascano CE. The effect of wilting and drying on intake rate and acceptability by sheep of the shrub legume *Cratylia argentea*. *Tropical Grasslands* 1995; 29: 97-101.
- Ramos GP, Frutos P, Giráldez FJ, Mantecón AR. Los compuestos secundarios de las plantas en la nutrición de los herbívoros. In *Arch Zootec (España)*, 1998; 597-620.
- Raynaud JP. Etude de l'efficacité d'une technique de coproscopie quantitative pour le diagnostic de routine et le contrôle des infestations parasitaires des bovins, ovins, équins et porcins. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 1970; 45: 321-342.
- Research Animal Resources (RAR). Reference values for laboratory animals. University of Minnesota. 2000. (On line). www.Ahc.umn.edu/rar/refvalues.html.
- Rios-de Alvarez L, Jackson F, Greer A, Bartley Y, Bartley DJ, Grant G, Huntley JF. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet Parasitol* 2012; 186: 390-398.
- Roa ML, Céspedes DA. Digestibilidad de forrajes arbóreos en bovinos utilizando jaulas metabólicas. *Sist prod agroecol.* 2011; 2:2.
- Rochfort S, Parker AJ, Dunshea FR. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 2008; 69: 299-322.
- Romero JR, Boero CA. Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la Argentina. *Analecta Vet.* 2001; 21(1):21-37.
- Sager LR. Agua para bebida de bovinos. Reedición de la serie técnica. www.produccion-animal.com.ar. 2000; 126.
- Samaniego MA. Comparison of methods for the measurement of digesta flow and microbial protein supply in sheep. Thesis for the degree of Master of Science, University of Aberdeen, UK. 1996; 51.
- Sánchez NR y Ledin I. Effect of feeding different levels of foliage from *Cratylia argentea* to creole dairy cows on intake, digestibility milk production and milk composition. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 2006; 38:343-351.
- Sandoval CA and Herrera F. Estimación de la síntesis de proteína microbial en rumiantes a través de la medición de los derivados de purina en orina. *Revista Biomédica.* 1999; 10: 241-51.
- Sandoval Castro CA, Lizarraga-Sanchez HL y Solorio Sanchez FJ. Assesment of tree fodder preference by cattle using chemical composition, *in vitro* gas production and *in situ* degradability. *Animal Feed Science and Technology* 2005; 123-124: 277-289.
- Schofield PMD, Pell AN. Analysis of condensed tannins: a review. *Animal Feed Science and Technology* 2001; 91: 21-40.
- Shallig HDFH, Moyo DZ, Hendrikx WML, Eysker M. Bovine humoral immune responses to *Haemonchus placei* excretory secretory antigens. *Veterinary Parasitology* 1996; 65: 289-296.

- Silanikove N, Gilboa N, Perevolotsky A, Nitsan Z. Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes. *Small Ruminant Research* 1996; 21: 195-201.
- Stromberg BE, Gasbarre LC, Waite A, Bechtol DT, Brown MS, Robinson NA, Olson EJ and Newcomb H. *Cooperia punctata*: Effect on cattle productivity? *Vet. Parasitol* 2012; 183: 284-291.
- Suárez JC, Carula JE y Velásquez JE. Composición química y digestibilidad in vitro de algunas especies arbóreas establecidas en el piedemonte Amazónico. *Zootecnia Trop.* 2008; 26: 231-234.
- Sutherland IA, Leathwick DM. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue? *Trends Parasitol* 2011; 27: 176-181.
- Swain RG. Tannins and Lignins in herbivores their interaction with secondary plant metabolites (ed) G.A.Jasen Academic, Press, New York. 1979.
- Sykes A R. Nutritional and physiological aspects of helminthiasis in sheep. sheep. In: *Biology and Control of Endoparasites* (Edited by synons L.E.A., Donald A.D. and DINEEN J.K.), Academic press, Sydney 1982; 217-234.
- Sykes AR. Host immune responses to nematodes: benefit or cost? Implications for future development of sustainable methods of control R. *Bras. Zootec.* 2010; 39:376-382.
- Van Lier E y Regueiro M. Digestión en retículo-rumen. Departamento de producción animal y pasturas. Universidad La República. Montevideo, Uruguay 2008; 30.
- Van Soest PJ, Robertson JB, Lewis BA. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1991; 74: 3583–3597.
- Van Soest PJ. *Nutritional Ecology of the Ruminants*. 2nd ed., Cornell University Press. New York 1994.
- Vatta AF, Kandu-Lelo C, Ademola IO, Eloff JN. Direct anthelmintic effects of *Cereus jamacaru* (Cactaceae) on trichostrongylid nematodes of sheep: in vivo studies. *Vet Parasitol* 2011; 180: 279-286.
- Vázquez-Prats V.M, Flores-Crespo J, Valencia CS, Herrera-Rodríguez D, Palacios-Franquez A, Liébano-Hernandez E, Pelcastre-Ortega A. Frecuencia de nematodos gastroentéricos en bovinos de tres áreas de clima subtropical húmedo de México. *Técnica Pecuaria México* 2004; 42: 237-245.
- Verbic J. Factors affecting microbial protein synthesis in the rumen with emphasis on diets containing forages. *Milchproduktion und Rindermast, Dundesanstalt für alpenländische Landwirtschaft Gumpenstein, 8952 Irdning.* 2002; 1-6
- Villalba JJ, Landau SY. Host behavior, environment and ability to self-medicate. *Small Ruminant Research* 2012; 103: 50-59.
- Villalba JJ, Miller J, Hall JO, Clemensen AK, Stott R, Snyder D, Provenza FD. Preference for tanniferous (*Onobrychis viciifolia*) and non-tanniferous (*Astragalus cicer*) forage plants by sheep in response to challenge infection with *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research* 2012.
- Villalobos JC. Interrelación de suplementos proteicos y energéticos con la calidad de forraje de animales en pastoreo. VIII Congreso Internacional de Nutrición Animal. Chihuahua, México 2000; 3-44.

- Viney M. How do host immune responses affect nematode infections? *Trends in Parasitology* 2002;18: 63-65.
- von Son-de Fernex E, Alonso-Diaz MA, Valles-de la Mora B, Capetillo-Leal CM. In vitro anthelmintic activity of five tropical legumes on the exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. *Exp Parasitol* 2012; 131: 413-418.
- Waghorn G. Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production—Progress and challenges. *Animal Feed Science and Technology* 2008; 147: 116-139.
- Wilson QT y Lascano C. *Cratylia argentea* como suplemento de un heno de gramínea de baja calidad utilizado por ovinos. *Past. Trop.* 1997; 19: 2-8.
- Wit J, Westra PT y Nell AJ. Livestock and the environment Finding a balance: Environmental impact assessment of landless livestock ruminant production systems. International Agricultural Centre, Wageningen, the Netherlands 1996.
- Wojdylo A, Oszmianski J, Czemerzys R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry* 2007; 105: 940-949.
- Wu Z, Satter L. Milk production during the complete lactation of dairy cows fed diets containing different amounts of protein. *Journal of Dairy Science* 2000; 83: 1042-1051.
- Wu Z, Tozer P, Groff E. Dietary manipulation to reduce nitrogen excretion by lactating dairy cows. *In: Proceedings Paper from Penn State's 2001 Dairy Cattle Nutrition Workshop-November 2001*; 6-7.
- Zemmelink G, y Mannelje L. Value for animal production (VAP) : a new criterion for tropical forage evaluation. *Animal Feed Science and Technology* 2002; 96: 31–42.

VIII. Anexos

Anexo 1: Modulo de producción de vaquillas F1, CEIEGT-FMVZ-UNAM.



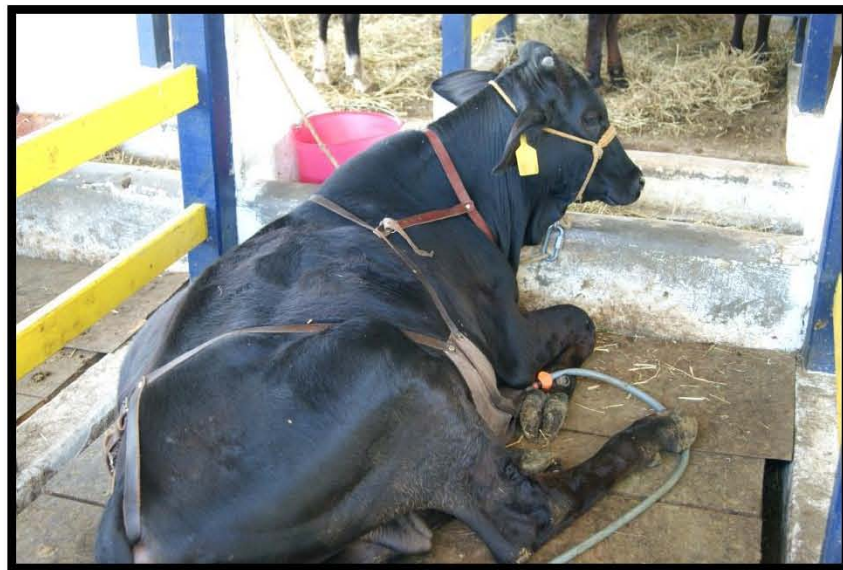
Anexo 2: Instalaciones habilitadas para el desarrollo experimental.



Anexo 3. Colecta de muestras.



Anexo 4. Mandil colector de orina.



Anexo 5. Digestibilidad *in situ*.

