



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA  
Y ZOOTECNIA**

**Efecto del consumo de *Gliricidia sepium* sobre el control de  
parásitos adultos *Cooperia punctata* en bovinos F1 (Holstein x  
Cebú) infectados artificialmente**

**T E S I S**

Que para obtener el título de

**MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA**

**P R E S E N T A**

**MIRTHA DINORAH GONZÁLEZ TORRALBA**

**Asesores**

Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz

Dra. Elke von Son de Fernex



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

La comunicación va mucho más allá de las palabras, la verdadera comunicación implica sentir al otro, escuchar con el corazón... gracias a mis becerros, por darme lo más valioso que poseían y gracias también a todos los seres no humanos que ayudaron en mi formación profesional.

Al Dr. Miguel Ángel Alonso Díaz, por su apoyo, su paciencia y su confianza.

A la Dra. Elke von Son de Fernex, gracias por las muchas lecciones, por el apoyo y la disposición constante, por la amistad.

Infinitas gracias a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia por ser mi casa y mi maestra.

Gracias también al CEIEGT (“El Clarín”), que me albergó y me ayudó a crecer... te llevo en el corazón.

Al Biol. Germán Muñoz, quién siempre me contagió de su alegría y que potencializó en mí el gusto por el agua y sus habitantes.

A la Ing. Martha Salazar, gracias por los momentos y la amistad; aún tenemos otro pastel pendiente.

A la Dra. Lucía del Rayo, gracias por la paciencia, el apoyo y las largas charlas.

Al Dr. Héctor Basurto, a la Dra. Leticia Galindo, a “Carlitos”, a “Chava”, a Pascual y finalmente a Alex, gracias sinceras por brindarme su apoyo, pero más aún su amistad.

Al Dr. Alejandro Bailón, gracias por su disposición constante y porque fue un apoyo invaluable en una de las etapas más importantes y difíciles de mi formación profesional.

Al Dr. Miguel Ángel Blanco Ochoa, quien me acogió desde el principio y me brindó la oportunidad de aprender a su lado.

Al Dr. Roberto Gil Sala, por ser guardián de vida y porque sus palabras fueron motivación para culminar.

Este trabajo es el resultado conjunto de muchos; gracias a todos por hacerlo posible.

## DEDICATORIAS

A mamá, por construirme de su sangre y de sus huesos, por llenar mi vida de ternura, por enseñarme a caminar y a amar. Tus brazos son el hogar al que mi corazón siempre tenderá.

A papá, mi árbol inquebrantable, el hombre fuerte y noble que tiene por siempre, mi amor, respeto y admiración.

A mis hermanos, los escritores de mil historias compartidas, compañeros de raíces, aventuras, crecimiento y corazón.

Fidel: tu tesón y valentía guía mis pasos. Te tengo bien pintado en la memoria: cerrando y recerrando veinte veces una puerta, o haciendo ridiculeces por montón y sin recato, pero también te recuerdo siendo ejemplo, entregado, responsable...siempre bueno.

Lauro: mi protector empedernido, dualidad hecha de fuerza y corazón. Recuerdo mis travesuras, el pocillo, los cojines, los consejos y mi primer par de botines, pero más que todo recuerdo la firmeza dulce con que tus brazos y piernas siempre me cuidaron. Nunca dejaré de agradecer tu complicidad y apoyo.

A Libertad, la mujer hecha de alas, café y poesía. Contigo aprendí que la hermandad une distancias, subsana diferencias, rompe prejuicios, maximiza virtudes y llena de gozo y esperanza nuestro etéreo camino por la vida. Gracias por brindarme la mejor amistad no prevista.

El verdadero amor no es ciego, y yo te veo con los ojos de mi cuerpo y de mi corazón. A Erick, mi compañero de vida, gracias por saltar conmigo y enseñarme que no existe abismo si volamos juntos.

A Máximo Darío, el ser hecho de estrellas que me eligió; tu luz me da el impulso de mil cometas...

A Melissa, la hermana que encontré en el camino y que me brindó lo más sublime, su amistad. Gracias por las mil aventuras, por las diez mil hazañas, por las incontables risas y los muchos panes, gracias por tanto.

Porque hablar de sueños, estrellas y sabores es posible... cuando tienes un amigo del alma: Gerardo.

Re-mirar, romper paradigmas, creer y crecer; gracias por cerrar mi boca y abrir mi mente. Everardo (Antita).

Eres la certeza de que las diferencias pueden unir y de que el tiempo (mucho o poco) no define una amistad... Kareri.

# CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	II
DEDICATORIAS.....	IV
ÍNDICE DE CUADROS .....	VIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Impacto de las nematodosis en los sistemas de producción de rumiantes en pastoreo.....	4
2.2 Impacto de <i>Cooperia punctata</i> en la ganadería .....	4
2.3 <i>Cooperia punctata</i> y su ciclo biológico .....	5
2.4 Métodos de control.....	6
2.5 Resistencia antihelmíntica .....	8
2.6 Uso de plantas bioactivas para el control de las nematodosis gastrointestinales en rumiantes .....	8
2.7 <i>Gliricidia sepium</i> .....	10
2.7.1 Propiedades antihelmínticas de <i>G. sepium</i> .....	11
3 JUSTIFICACIÓN .....	13
4 HIPÓTESIS .....	14
5 OBJETIVOS.....	15
5.1 Objetivo General .....	15
5.2 Objetivos específicos .....	15
6 MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
6.1 Área de estudio .....	16
6.2 <i>Gliricidia sepium</i> .....	16
6.3 Larvas infectantes y donadores monoespecíficos .....	16
6.4 Animales y diseño experimental .....	17
6.5 Mediciones y técnicas de laboratorio.....	18
6.5.1 Determinación del consumo voluntario.....	18
6.5.2 Análisis químico proximal (AQP).....	18
6.6 Técnicas parasitológicas .....	19
6.6.1 Eliminación de huevos por gramo de heces (hpgh).....	19
6.6.2 Recuperación de los parásitos adultos presentes en intestino delgado.....	19
6.6.3. Cuantificación y evaluación morfométrica de los parásitos adultos.....	20
6.6.4. Evaluación de la fertilidad per cápita y fecundidad <i>in utero</i> de las.....	20

<b>7</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>20</b>
<b>8</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>23</b>
<b>8.1</b>	<b>Análisis químico proximal (AQP) de la dieta</b> .....	<b>23</b>
<b>8.2</b>	<b>Determinación del Consumo Voluntario</b> .....	<b>23</b>
<b>8.3</b>	<b>Técnicas parasitológicas</b> .....	<b>25</b>
<b>8.3.1</b>	<b>Eliminación de huevos por gramo de heces (hpgh)</b> .....	<b>25</b>
<b>8.3.2</b>	<b>Recuperación, cuantificación y evaluación de los parásitos adultos presentes en intestino delgado</b> .....	<b>27</b>
<b>8.3.3</b>	<b>Evaluación de la fertilidad <i>per cápita</i> y fecundidad de las hembras adultas recuperadas</b> .....	<b>29</b>
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>31</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>11</b>	<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>35</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales antihelmínticos (AH), mecanismo de acción y mecanismo de resistencia.....	7
<b>Cuadro 2.</b> Composición proximal de <i>G. sepium</i> .....	11
<b>Cuadro 3.</b> Metabolitos secundarios presentes en <i>G. sepium</i> (%). .....	11
<b>Cuadro 4.</b> Composición química de <i>G. sepium</i> y <i>D. decumbens</i> ofrecidos durante el periodo experimental (g/100 g MS).....	23
<b>Cuadro 5.</b> Eliminación promedio de huevos por gramo de heces entre tratamientos (Media±EE). .....	27
<b>Cuadro 6.</b> Tasa de Reducción de Adultos entre grupos experimentales T1 y T2. ....	28
<b>Cuadro 7.</b> Proporción de machos y hembras recuperados entre grupos experimentales.....	28
<b>Cuadro 8.</b> Longitud total (mm) de los parásitos adultos de <i>Cooperia punctata</i> recuperados de ambos grupos experimentales. ....	28
<b>Cuadro 9.</b> Tasa de reducción en la fertilidad del grupo T2 con respecto al T1.....	29

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Consumo voluntario de MS representado en porcentaje de peso vivo (%PV) (Media±DE).....	24
<b>Figura 2.</b> Consumo de proteína cruda (PC) total entre tratamientos, representada como gramos de PC por día (g/día) (Media ± DE).....	24
<b>Figura 3.</b> Cinética de eliminación de huevos por gramo de heces (EHPGH) entre los tratamientos (Log10 (HPGH+1)).....	25
<b>Figura 4.</b> Correlación entre el consumo de <i>G. sepium</i> (g MS) y la eliminación de huevos por gramo de heces (EHPGH).....	26
<b>Figura 5.</b> Comparación de la fecundidad de las hembras de <i>Cooperia punctata</i> de ambos grupos experimentales; obtenida mediante el conteo de huevos <i>in utero</i> .....	30

# 1 INTRODUCCIÓN

Las infecciones por nematodos gastrointestinales (NGI) constituyen una de las principales causas de pérdidas económicas en la producción de rumiantes en el mundo, en particular bajo condiciones de pastoreo (Rodríguez-Vivas, *et al.*, 2011). El uso de antihelmínticos comerciales ha sido la principal forma de control de los NGI en los sistemas de producción; sin embargo, este método se encuentra limitado debido al rápido desarrollo de resistencia antihelmíntica (RA) (Hoste *et al.*, 2015). *Cooperia* spp. es un género de NGI endémico del ganado en pastoreo en las regiones tropicales y subtropicales, el cual ha sido reportado como uno de los géneros con mayor prevalencia en el mundo (Fielet *et al.*, 2012; Kenyon y Jackson, 2012). La cooperiosis genera pérdidas en los sistemas extensivos de producción, debido a una disminución del desempeño animal (disminución de consumo voluntario, disminución en la ganancia diaria de peso y producción láctea, y disminución de los parámetros reproductivos) así como los costos por tratamiento y manejo. La búsqueda de alternativas eficientes, que además minimicen el uso de antihelmínticos para el control parasitario en rumiantes constituye un reto para la producción animal a nivel mundial (Arece *et al.*, 2012).

El uso de plantas bioactivas, en especial las leguminosas tropicales y de clima templado, se han propuesto como una alternativa eficiente para el control de NGI (Basabe *et al.*, 2009). Así mismo, algunas de estas plantas tienen la capacidad de fungir como nutraceuticos, los cuales se definen como: “*Un alimento capaz de combinar el valor nutricional y los efectos benéficos sobre la salud de los animales*” (Hoste *et al.*, 2015). Característica que ha sido directamente relacionada a la presencia de metabolitos secundarios o compuestos bioactivos (Hoste *et al.*, 2015).

Estudios *in vivo* utilizando plantas nativas como *Artemisia brevifolia*, *Zanthoxylum zanthoxyloides*, *Sericea lespedeza*, *Manihot esculenta*, han reportado que su consumo mejora la respuesta animal ante infecciones parasitarias, debido a los efectos directos e indirectos de los metabolitos secundarios presentes en las plantas o sus extractos (Hounzangbe-Adote *et al.*, 2005; Iqbal *et al.*, 2004; Min *et al.*, 2004; Sokerya and Preston, 2003). Los efectos directos de los metabolitos secundarios están asociados a su capacidad para formar complejos con las proteínas presentes en las estructuras parasitarias, lo cual afecta su biología (inhibición del desarrollo y desarrollo larvario, inhibición de la eclosión de huevos e incluso mortalidad) (Hoste *et al.*, 2006). Por otro lado, los efectos indirectos (reducción de la fertilidad de las hembras y la eliminación de huevos y expulsión de los parásitos adultos) se han asociado a un incremento en la resiliencia y resistencia de los animales a las infecciones parasitarias (Kyriazakis *et al.*, 2010. Arece *et al.*, 2012).

En la ganadería bovina tropical, existen recursos forrajeros que podrían ser utilizados como nutraceuticos y que han sido poco evaluados contra los principales NGI que afectan a los bovinos. *Gliricidia sepium* es un árbol forrajero ampliamente utilizado en México, Centroamérica y regiones tropicales de sudamérica y Asia, tanto para la alimentación del ganado (Pérez, *et al.*, 2014), como con propósitos medicinales en humanos, entre los que destaca su uso para tratar afecciones de la piel (sarampión, salpullido, granos, entre otras), para disminuir la fiebre, curar el “empacho”, para tratar el dolor de cabeza, para combatir parásitos, así mismo, se le atribuyen propiedades diuréticas y antihistamínicas (Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana: Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana).

Por otro lado, se ha reportado que los extractos de hojas de *G. sepium* tienen propiedades antihelmínticas contra algunas fases biológicas de *Haemonchus contortus* (von Son-de Fernex *et al.*, 2012), contra huevos y larvas del mosquito *Anopheles stephensi*, y actividad ovicida contra el fitonematodo *Meloidogyne incognita* (Pérez, *et al.*, 2014, Adekunle and Akinlua, 2007). El extracto acetónico de *G. sepium* (9.6 mg mL<sup>-1</sup>) tiene la capacidad de inhibir la eclosión de huevos de *Cooperia punctata* en un 100 % (von Son de Fernex *et al.*, 2016). Estudios recientes reportan el aislamiento de una cumarina de las hojas de *G. sepium* con elevado potencial antihelmíntico (von Son de Fernex *et al.*, 2017). En evaluaciones *in vivo*, se reportó que el consumo de hojas frescas de *G. sepium* por bovinos infectados artificialmente con *C. punctata*, redujo el establecimiento larvario en un 76.9 % (von Son de Fernex, 2016). No obstante, hasta nuestro conocimiento no se ha reportado el posible efecto antihelmíntico del consumo de hojas frescas de *G. sepium* sobre las fases adultas de *C. punctata* en bovinos. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto antihelmíntico *in vivo* del consumo de follaje de *G. sepium* sobre parásitos adultos de *C. punctata*, en bovinos F1 (Ho X Cebú) infectados artificialmente.

## **2 REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1 Impacto de las nematodosis en los sistemas de producción de rumiantes en pastoreo**

Las infecciones por NGI son uno de los mayores problemas de salud en las unidades de producción de rumiantes en pastoreo, de las zonas tropicales y subtropicales (Liébano, *et al.*, 2011). Los NGI afectan el desempeño animal debido a una disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso y en ocasiones, causan la muerte de los animales (Mendoza de Gives y Valero, 2009). El impacto económico de las nematodosis se relaciona con pérdidas económicas directas (disminución de la producción de carne y/o leche) e indirectas (debido a que se aumenta el costo de producción por concepto de gastos en el control y tratamientos de las parasitosis) (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2011). Se estima que el costo anual de las nematodosis gastrointestinales en México alcanza los \$ 445, 096, 562 millones de dólares americanos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

### **2.2 Impacto de *Cooperia punctata* en la ganadería**

*Cooperia* spp se considera el nematodo gastrointestinal más común en las regiones tropicales, siendo *C. punctata* una de las especies de mayor prevalencia y patogenicidad (Yatsuda y Vieira Bressan, 2000). La cooperiosis, al igual que el resto de las parasitosis gastrointestinales, afecta principalmente a animales en etapa de desarrollo y crecimiento, ocasiona disminución del consumo voluntario (Basabe *et. al.*, 2009), pérdida de peso, retraso en la pubertad y por ende, el resto de parámetros productivos (Perri *et. al.*, 2011). La infección de un becerro con 179, 200 L<sub>3</sub> de *C. punctata* resultó en su muerte a los 25 días post-infección

(Yatsuda y Vieira-Bressan, 2000). También se reportó que en becerros de 5 meses de edad, la dosis única de 130, 000 L<sub>3</sub> de *C. punctata* fue suficiente para matar a dos de los seis animales infectados artificialmente (Yatsuda y Vieira-Bressan, 2002). Stromberg, *et al.* (2012) reportaron que las infecciones por *C. punctata* ocasionaron una disminución en la ganancia diaria de peso de 0.11 kg y en el consumo de materia seca de 0.68 kg/día. Así mismo, se ha reportado que ganado infectado mono-específicamente con larvas de *C. punctata* muestra alteraciones en el metabolismo de la albúmina y en el balance/retención de nitrógeno, disminución del consumo voluntario de hasta 680 g/animal/día y retraso en el crecimiento de hasta un 13.5 %, comparados con animales libres de la infección (Vieira-Bressan *et al.*, 1996; Stromberg *et al.*, 2012). Al disminuir el consumo voluntario de los animales infectados, se afecta también su capacidad para absorber o utilizar nutrientes (Stromberg, *et al.*, 2012), lo que deriva en la interrupción de procesos fisiológicos secundarios como crecimiento, desarrollo, reproducción y producción láctea (Stromberg, *et al.*, 2012; Li y Gasbarre, 2009). Por todo lo anterior, se concluye que las infecciones por *C. punctata* constituyen un riesgo considerable para la rentabilidad de las unidades productivas en todo el mundo.

### **2.3 *Cooperia punctata* y su ciclo biológico**

*C. punctata* es un NGI perteneciente al phylum *Nematoda*, orden *Strongylida*, superfamilia *Trichostrongylida*. *C. punctata* posee un ciclo directo, similar al de otros NGI, el cual se divide en dos fases. En la primera fase o fase pre-parasítica, los huevos se excretan al medioambiente a través de las heces de los bovinos. Los huevos de *C. punctata* son ovalados y su tamaño oscila entre 70-100 µm de longitud por 40-60 µm de anchura; y son eliminados

junto con las heces en la fase de blástula (8 a 16 blastómeros). Una vez en el medio ambiente, y si las condiciones son adecuadas (26 °C y 96 % HR), en el interior del huevo se desarrolla la larva 1 (L<sub>1</sub>) que eclosiona en la materia fecal, muda a L<sub>2</sub> y finalmente a una larva infectante (L<sub>3</sub>). Una de las características principales de la L<sub>3</sub> es la retención cuticular de su fase anterior, la cual le confiere protección del estrés medioambiental (temperatura y humedad) (Niezen *et al.*, 1998) y finalmente podrán migrar a la pastura, donde permanecen hasta ser ingeridas por un hospedador. Bajo las condiciones óptimas, ésta fase de vida libre tiene una duración promedio de 7 días.

La fase parasítica da inicio tras la infección de los animales mediante la ingestión de L<sub>3</sub> con la pastura. Posterior a la ingesta, las larvas pierden la vaina (durante las primeras 13 horas post-infección) en el abomaso (sitio previo al órgano blanco) por efecto de diversos estímulos del hospedador, obteniendo así su capacidad infectante (Lesage y Mallet., 1987).

Las larvas desenvainadas penetran en la mucosa intestinal entre las vellosidades intestinales, donde mudan nuevamente y se convierten en L<sub>4</sub> (4 días post-infección); después de la última muda se transforman en juvenil y finalmente en adultos, que tras la cópula da inicio la eliminación de huevos (Cordero *et al.*, 1999). El periodo pre-patente de *C. punctata* es de 13 días, mientras que la patencia tiene una duración de 9 a 15 meses (von Son-de Fernex, 2016).

## **2.4 Métodos de control**

Un método de control parasitario eficiente debería considerar la implementación de diferentes tecnologías, uso racional y adecuado de los productos químicos, aplicaciones programadas y estratégicas; además, el entorno social y ambiental. No obstante, desde la aparición de los antihelmínticos sintéticos (AH), el control de NGI se ha basado casi

exclusivamente en la quimioprofilaxis. Los antihelmínticos disponibles para el control de los NGI en el ganado bovino pertenecen a las familias de los benzimidazoles (BZD), imidazotiazoles (IMZ) y lactonas macrocíclicas (LM) (Kaplan, 2004 y Wolstenholme *et al.*, 2014). El uso inapropiado de los AH ha generado la emergencia de poblaciones de NGI resistentes, y se ha cuestionado la sustentabilidad de éstos compuestos como principal mecanismo de control (Leathwick *et al.*, 2013) (Ver cuadro 1).

**Cuadro 1.** Principales antihelmínticos (AH), mecanismo de acción y mecanismo de resistencia.

<b>Clase</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Mecanismo de resistencia</b>
<b>Benzimidazoles</b>	Unión a la $\beta$ -tubulina evitando la formación de microtúbulos, lo que inhibe la captación de glucosa, la secreción de proteínas y la producción de microtúbulos. La muerte se produce por inanición del parásito.	Mutaciones en el gen de $\beta$ -tubulina, causándole cambios estructurales. Como consecuencia, el fármaco ya no puede unirse a su sitio diana.
<b>Imidazotiazoles / tetrahidropirimidinas</b>	Colinérgico mimético que causa la parálisis espástica de los parásitos, los cuales son expulsados por el peristaltismo normal.	Posible implicación de cambios estructurales en el receptor, impidiendo la unión del fármaco. También se han propuesto cambios en la sensibilidad del receptor hacia la acetilcolina.
<b>Lactonas macrocíclicas</b>	Mantiene abiertos los canales de cloruro regulados por glutamato (GluCl), permitiendo la entrada de iones cloruro al interior de las células nerviosas, ocasionando una parálisis flácida del parásito.	Posible implicación de mutaciones en el gen de la glicoproteína-P, lo que produce una eliminación más rápida del fármaco del parásito. Alteraciones en la estructura de los canales GluCl.
<b>Derivados amino-acetronílicos</b>	Inhibe los receptores nicotínicos de acetilcolina (Hco-MPTL-1) presentes únicamente en nematodos, ocasionando una parálisis irreversible y la expulsión de los mismos.	Pérdida total o parcial del gen que codifica el tipo particular de receptor de acetilcolina (Hco-MPTL-1).

Tomado de Roeber *et al.*, 2013

## **2.5 Resistencia antihelmíntica**

El uso de compuestos químicos como única herramienta para el control parasitario revolucionó inicialmente el combate contra estos patógenos. No obstante, se ha convertido en un método ambiental, económico y técnicamente insostenible para las unidades de producción animal, debido a: i) la posible presencia de residuos tóxicos en los alimentos de origen animal y en el medio ambiente, y ii) por la pronta aparición de resistencia antihelmíntica. La resistencia antihelmíntica se define como “*la capacidad que tiene una población de parásitos para tolerar dosis tóxicas de sustancias químicas que son letales para otras poblaciones susceptibles de la misma especie*” (Márquez-Lara, 2007). El surgimiento de la resistencia antihelmíntica es inevitable, puesto que es una respuesta evolutiva. No obstante, y a pesar que el desarrollo de la resistencia antihelmíntica está determinado por principios genéticos, existen otros factores de manejo zootécnico que aceleran su aparición, como son: i) elevada frecuencia de tratamientos, ii) sub-dosificación, iii) mal manejo de los antihelmínticos, y iv) tratamiento de animales clínicamente sanos (Márquez-Lara, 2007).

En las últimas décadas los informes de resistencia antihelmíntica en los NGI del ganado han aumentado de manera alarmante, lo que pone en peligro las actuales medidas de control parasitario (Demeler, *et al.*, 2013).

## **2.6 Uso de plantas bioactivas para el control de las nematodosis gastrointestinales en rumiantes**

Las plantas o sus extractos han sido usadas durante siglos en medicina veterinaria para el tratamiento de diversas patologías. Su uso se basó en prácticas anecdóticas y conocimiento

empírico; por ejemplo, el ajo, la cebolla y la menta se han empleado para combatir el parasitismo gastrointestinal. Por otro lado, extractos de la planta de tabaco se han utilizado para tratar la piel de ganado afectado por ectoparásitos., El epazote se ha utilizado como antihelmíntico desde principios del siglo XX (Guarrera, 1999). Pero en un intento de utilizar de manera más eficiente la información disponible en los informes etnoveterinarios sobre la actividad antihelmíntica de las plantas, existe una tendencia a validarlas bajo condiciones experimentales controladas (Athanasiadou *et. al.*, 2007). Los extractos de *A. marítima* mostraron una fuerte actividad antihelmíntica contra nematodos del ganado (Athanasiadou *et. al.*, 2007); así mismo pellets de *Onobrychis viciifolia* mostraron un efecto inhibitor del establecimiento larvario en becerros infectados artificialmente con *Ostertagia ostertagi* (Desrues *et. al.*, 2016b). Extractos obtenidos de la raíz de *Cucumis sativus* han mostrado efectos nematicidas eficaces (Sepúlveda-Jiménez *et. al.*, 2003). Al tratar cabras con infecciones mixtas de NGI con los extractos de *Aloe ferox*, *Elephantorrhiza elephantina* y *Leonotis leonurus* se obtuvo disminución en la eliminación de huevos por gramo de heces (hpgh) (Moreno-Gonzalo *et. al.*, 2014). Marie Magdeleine *et. al.* (2009) reportó la actividad antihelmíntica de las semillas de *Cucurbita moschata* contra diversas fases de *Haemonchus contortus* (Marie-Magdeleine *et. al.*, 2009).

La actividad biológica de las plantas ha sido relacionada a la presencia de metabolitos secundarios, entre los que destacan: lectinas, compuestos polifenólicos (taninos, flavonoides), saponinas y terpenoides. Los metabolitos secundarios no cumplen funciones primarias dentro de las plantas, no obstante, cumplen con una función principalmente alelopática que incluye mecanismos como: i) defensa contra la herbivoría, ii) defensa contra

agentes patógenos (bacterias, hongos y virus), iii) protección de los rayos ultravioleta, iv) reproducción, entre otros (Sepúlveda-Jiménez *et al.*, 2003).

## **2.7 *Gliricidia sepium***

*Gliricidia sepium* es un árbol multipropósito de rápido crecimiento, fácil establecimiento y con tolerancia a las podas regulares (Hernández *et al.*, 2014). De acuerdo con García y Medina (2006), esta especie destaca por su capacidad de fijar nitrógeno, lo cual es muy significativo para la recuperación de suelos degradados (García y Medina, 2006). Esta planta forrajera tiene un alto valor nutritivo en términos de proteína cruda (20 – 33 %) y una digestibilidad de la materia seca *in vitro* (60 – 64 %). *Gliricidia sepium* es una leguminosa arbórea, caducifolia y nativa desde México hasta el norte de América del Sur, que se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales del mundo. Es una especie con alto potencial de producción de biomasa y elevado valor nutritivo, lo cual la presenta como una alternativa práctica y económica para incrementar la productividad animal y contribuir, de esta manera, a disminuir los costos de producción en los trópicos (Cardozo, 2013). Crece bien en suelos de secos a húmedos, resiste períodos prolongados de sequía y tiene capacidad de prosperar en suelos relativamente pobres, por lo cual es una de las plantas más recomendadas y utilizadas en los sistemas agroforestales tanto en América Latina como en África (Cardozo, 2013; García y Medina, 2006). *G. sepium* es una leguminosa con alto valor nutritivo (Cuadro 2), buena digestibilidad (Suárez *et al.*, 2008), y que posee una amplia gama de metabolitos secundarios (García y Medina, 2006) (Cuadro 3).

**Cuadro 2.** Composición proximal de *G. sepium*.

MS (%)	PC (%)	EB (Mcal kg <sup>-1</sup> )	EE (%)	FC (%)	ELN (%)	Cen (%)
35.9	20.4	4.11	1.89	10.80	43.2	14.10

MS: materia seca; PC: proteína cruda; EB: energía bruta; EE: extracto etéreo; FC: fibra cruda; ELN: elementos libres de nitrógeno; Cen: cenizas.

Tomado de Foroughbakhch *et al.*, 2012

**Cuadro 3.** Metabolitos secundarios presentes en *G. sepium* (%).

FT	TT	TPP	TC	TH	Sap	AlcT
2.22	0.46	0.41	0.40	ND	1.73	0.04

FT: polifenoles totales; TT: taninos totales; TPP: taninos que precipitan proteínas, como equivalentes del ácido tánico; TC: taninos condensados, como equivalente de leucocianidina; TH: taninos hidrolizables, como equivalentes del ácido gálico; Sap: saponinas, como equivalente dediosgenina; AlcT: alcaloides totales; ND: no detectado.

Tomado de García y Medina, 2006

### 2.7.1 Propiedades antihelmínticas de *G. sepium*

Estudios *in vitro* e *in vivo* reportaron el potencial antihelmíntico de *G. sepium*. Los extractos orgánicos de las hojas jóvenes de *G. sepium* tienen la capacidad de afectar el desenvaine y la motilidad (71.3 % y 35.9 %, respectivamente) de larvas infectantes de *H. contortus* (von Son-de Fernex, *et. al.*, 2012). Los extractos acuosos de *G. sepium* mostraron efectos inhibitorios sobre la migración de larvas infectantes de NGI de ovinos superiores al 50 %, y de obtener un porcentaje de inhibición de la eclosión de huevos del 41.4 % (Puerto-Abreu, 2013). En otro estudio, se incubaron huevos de NGI de ovinos (*Haemonchus contortus*, *Cooperia curticei*, *Trichostongylus colubriformis*) en extractos metanólicos de hojas de *G. sepium*, el cuál mostró una inhibición en la eclosión de huevos a la concentraciones de 500 µg/mL del 49.7 % (Pérez, *et. al.*, 2014). Por otro lado, von Son-de Fernex *et al.* (2016), reportaron que el extracto acetónico de *G. sepium* tienen la capacidad de inhibir el desarrollo

embrionario y la eclosión de *C. punctata* en su totalidad, con una concentración letal media de  $1.03 \pm 0.17$  mg mL<sup>-1</sup>. Así mismo, el fraccionamiento biodirigido de extractos acetónicos de *G. sepium* permitieron la identificación de una cumarina como la posible molécula responsable de su efecto antihelmíntico (von Son-de Fernex *et al.*, 2017). Las evaluaciones *in vivo* reportaron un efecto inhibitorio del 76.9 % del establecimiento parasitario de *C. punctata* en becerros (von Son-de Fernex, 2016).

### **3 JUSTIFICACIÓN**

El crecimiento demográfico exponencial a nivel mundial, demanda una mejora en la producción de alimentos que permita mantener la seguridad alimentaria de un modo sustentable.

Las infecciones por NGI son uno de los principales problemas de salud que enfrenta la producción de rumiantes en el mundo y que tienen un impacto directo sobre los parámetros productivos, lo cual, aunado al rápido desarrollo de resistencia antihelmíntica y a la demanda de productos libres de residuos químicos por parte de los consumidores, hace necesaria la búsqueda de alternativas sustentables para el control parasitario en rumiantes.

#### **4 HIPÓTESIS**

El consumo de hojas frescas de *G. sepium* por bovinos disminuirá la eliminación de huevos por gramo de heces. Así mismo, reducirá la fertilidad y el tamaño de las hembras de *C. punctata*. Se observarán alteraciones morfométricas en los parásitos adultos recuperados del contenido intestinal de los animales que consumieron hojas de *G. sepium*.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo General

Evaluar el efecto antihelmíntico *in vivo* del consumo de *G. sepium* sobre parásitos adultos de *C. punctata*, en bovinos infectados artificialmente.

### 5.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto *in vivo* del consumo de follaje de *G. sepium* por bovinos sobre la eliminación de huevos por gramo de heces.
- 2) Evaluar el efecto *in vivo* del consumo de follaje de *G. sepium* por bovinos sobre la fertilidad y el tamaño de las hembras de *C. punctata*.
- 3) Evaluar características morfométricas de los parásitos adultos de *C. punctata*, recuperados del contenido intestinal de los animales tratados y no tratados con *G. sepium*.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Área de estudio**

El trabajo se desarrolló en el Módulo de Producción de vaquillas F1 “La Soledad” perteneciente al Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad Nacional Autónoma de México (CEIEGT-FMVZ-UNAM), localizado en el km. 3.5 de la carretera Martínez de la Torre-Novara, Municipio de Atzalán, Veracruz, México (19°50'N, 97°1'W), a una altitud de 110.9 msnm. El clima predominante es cálido húmedo Af (m) “W” (e) con una temperatura media anual de 24.4 °C, 85 % de humedad relativa y precipitación pluvial de 1990 mm (García, 1981).

### **6.2 *Gliricidia sepium***

Se ofertaron hojas frescas de *G. sepium* (dos meses de edad aproximadamente) diariamente, mediante el método de corte y acarreo.

### **6.3 Larvas infectantes y donadores monoespecíficos**

Las larvas infectantes se obtuvieron de donadores mono-específicos de *C. punctata* (cepa CEIEGT-FMVZ-UNAM México) aislada del CEIEGT-FMVZ-UNAM. Los donadores fueron alojados y criados en corraletas de cemento, alimentados con heno de *Digitaria decumbens* (6.27 % PC), concentrado comercial (23 % PC) y agua a libre acceso. Diariamente se colectaron heces directamente del recto de cada animal donador en bolsas de poliuretano, las muestras se procesaron a temperatura ambiente (23.4° C y 90 % HR) y se realizaron coprocultivos mediante la técnica de Corticelli y Lai (1963). Posteriormente, los cultivos se colocaron en un aparato Baermann para su colección y posterior filtrado. Una

vez recuperadas las larvas, se almacenaron en cajas de cultivo a 4° C hasta su utilización. Los animales experimentales que se utilizaron en este estudio, se manejaron cumpliendo con los requisitos del Comité Interno para Cuidado y Uso de los Animales (CICUA) de la UNAM.

#### **6.4 Animales y diseño experimental**

Se utilizaron 12 becerros F1 (Holstein x Cebú) de aproximadamente 6 meses de edad y un peso promedio de 133 kg, estabulados en corraletas individuales con piso de cemento y libres de infección por NGI. El estatus libre de NGI se monitoreó mediante análisis diario de las heces utilizando la técnica de McMaster (Raynaud, 1970). El periodo experimental se dividió en tres periodos:

i) adaptación de los animales a las corraletas y a la dieta experimental, y desparasitación de los animales experimentales (día -14 al 0), con la finalidad de estar libre de NGI al inicio del experimento. Cada animal se desparasitó el día -14 con levamisol a una dosis de 8 mg/kg; y el día -5 con albendazol a razón de 10 mg/kg de peso vivo (PV).

ii) periodo pre-patente (día 0 al 14), tiempo transcurrido desde la infección artificial de los animales hasta la aparición de los huevos en las heces. Al inicio de este periodo, se corroboró que todos los animales estuviesen libres de NGI. El día cero (0), los 12 animales se infectaron artificialmente con una dosis oral de 400 larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *C. punctata*/kg PV/VO, y se distribuyeron en dos grupos experimentales, balanceados de acuerdo al peso (n=6): T1 o Control (grupo que no recibió ningún tratamiento) y T2: Tratamiento (grupo suplementado con *G. sepium*).

iii) periodo experimental (día 15 al 26). Durante éste periodo se ofertó una dieta isoprotéica

del día 15 al día 26 post-infección (pi). La dieta para el grupo control (T1) consistió de concentrado comercial (12 % PC) La ración se calculó diariamente, con base en el consumo de PC promedio del grupo T2, esto con la finalidad de lograr obtener dietas isoproteicas, y henificado de la gramínea *Digitaria decumbens* (6.72 % PC) *ad libitum*.

Al T2, se les ofertó hojas frescas de *G. sepium* durante un periodo de seis horas (08:00 a 14:00 h); después se les ofertó 500 g de concentrado comercial (12% PC) y henificado de la gramínea *D. decumbens* (6.72 % PC) *ad libitum*. Los animales de ambos tratamientos tuvieron acceso libre al agua.

El día 27 del experimento se realizó la matanza humanitaria de dos becerros (uno de cada grupo experimental) elegidos al azar para llevar a cabo la recuperación, cuantificación y evaluación morfológica de los parásitos adultos recuperados del contenido intestinal. El sacrificio se realizó bajo el cumplimiento estricto de las normas establecidas por el Comité Interno para Cuidado y Uso de los Animales de la UNAM (CICUA).

## **6.5 Mediciones y técnicas de laboratorio**

### **6.5.1 Determinación del consumo voluntario**

La determinación del consumo voluntario de los componentes de la dieta (*D. decumbens*, *G. sepium* y concentrado comercial) se realizó de modo individual, mediante el pesaje diario del material ofrecido y rechazado.

### **6.5.2 Análisis químico proximal (AQP)**

Diariamente se tomaron muestras (100 g) de heno de *D. decumbens* y de follaje de *G. sepium* tanto ofrecido como rechazado por los animales. Estas muestras se almacenaron en bolsas de

papel kraft y se transportaron al laboratorio bromatológico para su secado a 70° C y su posterior determinación de materia seca MS y del valor nutricional.

Se determinó el porcentaje de MS, el porcentaje de elementos libres de Nitrógeno (ELN) y el porcentaje de cenizas de acuerdo a lo sugerido por la AOAC (1980). El porcentaje de proteína Cruda presente en las muestras se determinó mediante la técnica de Kjeldhal; mientras que el extracto etéreo se obtuvo por el método de Soxhlet (AOAC, 1980).

## **6.6 Técnicas parasitológicas**

### **6.6.1 Eliminación de huevos por gramo de heces (hpgh)**

Diariamente se tomaron muestras de heces a todos los animales para monitorear la eliminación de huevos de *Cooperia punctata* mediante la técnica de McMaster modificada (Raynaud, 1970).

### **6.6.2 Recuperación de los parásitos adultos presentes en intestino delgado**

Después de la matanza humanitaria de los bovinos, se localizó el TGI de cada animal. La recuperación de los parásitos se realizó de acuerdo a lo descrito por Torres-Acosta *et al.* (2015).

Para obtener el intestino se realizó una doble ligadura con hilo cáñamo a una distancia de dos centímetros aproximadamente de la unión abomaso-duodenal tomando los primeros seis metros del intestino delgado. Cada ID se colocó en un recipiente individual identificado con el número correspondiente a cada animal, para su traslado inmediato al laboratorio.

El intestino de cada animal se abrió y lavó para recuperar el contenido luminal. Los contenidos se lavaron con agua precalentada a través de tamices de diferentes tamaños para

colectar finalmente a los parásitos adultos en un tamiz con una apertura de poro de 44  $\mu\text{m}$ . Los parásitos colectados fueron colocados en un recipiente hermético con formol al 10%, previamente identificado con el número del animal y el grupo experimental.

### **6.6.3. Cuantificación y evaluación morfométrica de los parásitos adultos presentes en intestino delgado**

El conteo de parásitos adultos se realizó mediante la técnica de alícuota al 10 % (Paolini *et al.*, 2003; Valderrábano *et al.*, 2010), y la evaluación morfométrica, con base en lo descrito por Torres Acosta *et al.*, 2015.

### **6.6.4. Evaluación de la fertilidad per cápita y fecundidad *in utero* de las hembras parásitas**

La fertilidad de las hembras se determinó, dividiendo el número de huevos por gramo de heces eliminados por cada animal previo a la matanza humanitaria, entre el número total de hembras recuperadas (Paolini *et al.*, 2003; Valderrábano *et al.*, 2010). La fecundidad *in utero* se realizó con base en la técnica descrita por (Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.*, 2010).

## **7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El efecto del consumo de *G. sepium* se evaluó mediante la estimación en la reducción en la eliminación de huevos y la reducción en la población de parásitos adultos. El porcentaje de reducción de huevos por gramo de heces y de los parásitos adultos, se obtuvo mediante la utilización de la siguiente fórmula (Coles *et al.*, 1992):

$$PR = 100 \left(1 - \frac{\bar{x}_T}{\bar{x}_C}\right)$$

Donde:

PR= Porcentaje de reducción

XT= Media aritmética del grupo tratado con *Gliricidia sepium*

XC= Media aritmética del grupo control negativo.

El valor obtenido de eliminación de huevos por gramo de heces de cada animal dentro de los tratamientos fue transformado ( $\log_{10}(\text{EHPGH}+1)$ ), para posteriormente realizar un análisis de regresión lineal.

Se realizó un análisis de correlación de Pearson entre la eliminación de huevos por gramo de heces y el consumo de *G. sepium*.

El consumo de materia seca y proteína de cada grupo experimental se determinó mediante un análisis de varianza.

La tasa de fertilidad per cápita de las hembras parasitas se calculó con la siguiente fórmula (Paolini *et al.*, 2003; Valderrábano *et al.*, 2010):

$$FPC = \frac{\text{HPGH obtenido el ultimo día del experimento}}{\text{Total de hembras adultas recuperadas}}$$

Donde:

FPC: Fertilidad per cápita

HPGH: Huevos por gramo de heces

Las características morfométricas de los parásitos adultos recuperados y fecundidad *in utero* de las hembras recuperadas del T1 y T2, fueron analizadas mediante un análisis de varianza (ANOVA).

La tasa de establecimiento de adultos (TEA) fue calculada de acuerdo a la siguiente fórmula:  $100 * (1 - A_r / L_i)$ , donde  $A_r$  representa el número total de adultos recuperados y  $L_i$  representa el número total de  $L_3$  usadas para la infección. (von Son-de Fernex, 2016).

La tasa de reducción de adultos fue calculada usando la fórmula  $100 * (1 - E_s / E_c)$  donde  $E_t$  representa el establecimiento obtenido en el grupo suplementado (T2) y  $E_c$  el establecimiento obtenido en el grupo control (T1) (von Son-de Fernex, 2016).

## 8 RESULTADOS

### 8.1 Análisis químico proximal (AQP) de la dieta

La composición química de *G. sepium* y *D. decumbens* ofrecido a los animales experimentales se presenta en el Cuadro 4.

**Cuadro 4.** Composición química de *G. sepium* y *D. decumbens* ofrecidos durante el periodo experimental (g/100 g MS).

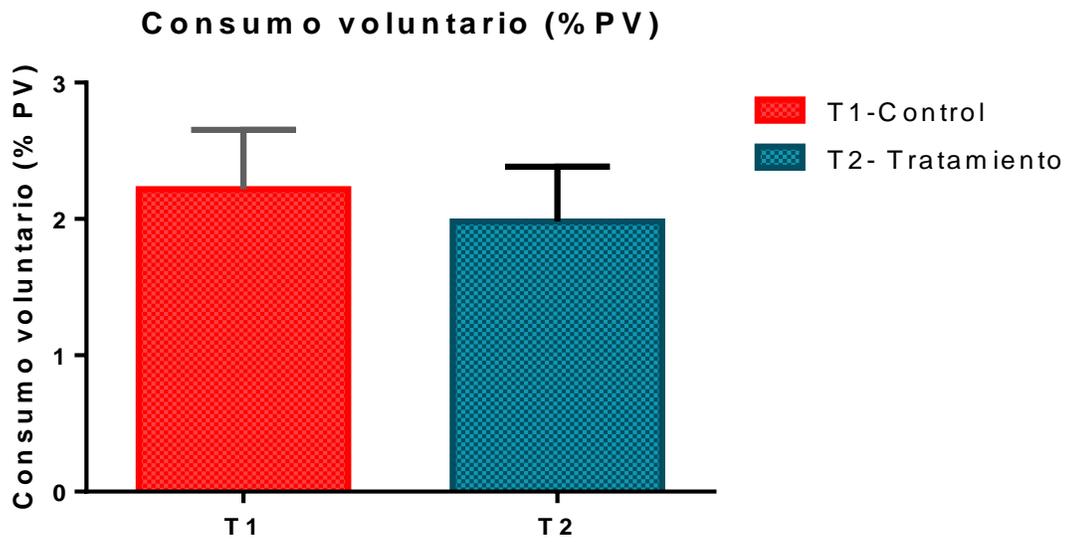
Material	O/R	MS	PC	EE	Cen	FC	ELN
Dd	O	88.73	7.63	5.16	8.53	18.66	60.66
	R	86.75	7.03	4.44	7.65	19.60	61.27
Gs	O	25.25	23.98	5.58	6.91	8.04	55.47
	R	25.25	23.86	5.01	7.42	8.00	55.71

\*Dd: *Digitaria decumbens*; Gs: *Gliricidia sepium*; O: Alimento ofrecido; R: Alimento rechazado; MS: Materia seca; PC: Proteína cruda; EE: Extracto etéreo; Cen: Cenizas; FC: Fibra cruda; ELN: Elementos libres de nitrógeno.

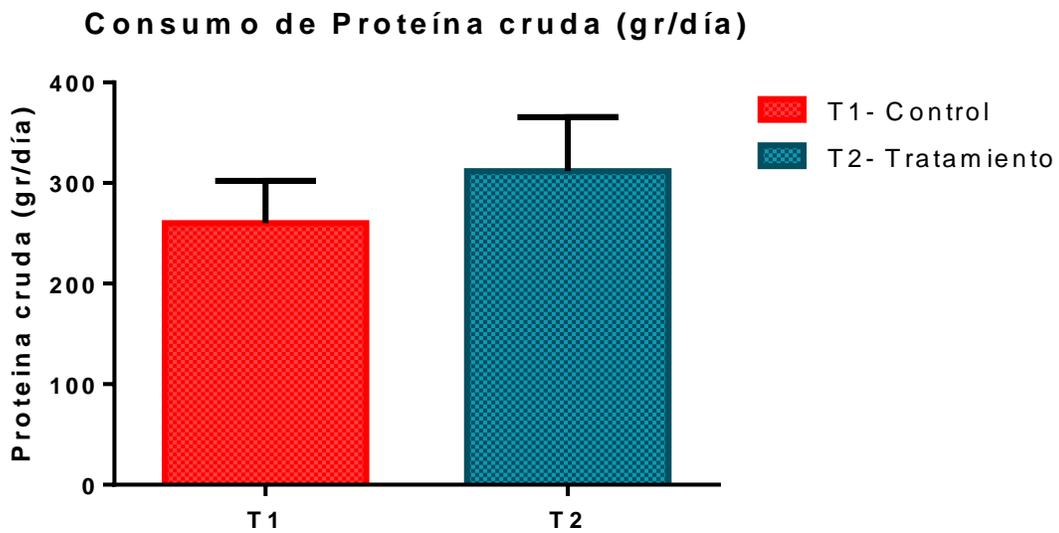
### 8.2 Determinación del Consumo Voluntario

El consumo de materia seca (MS) total fue diferente entre grupos experimentales ( $P < 0.5$ ) (Figura 1). Los animales del grupo tratado (T2) consumieron menos MS (MS por % PV) en comparación al grupo control ( $1.98 \pm 0.32$  % y  $2.22 \pm 0.25$ , respectivamente) ( $P < 0.05$ ). El consumo de PC (media  $\pm$  D.E.) fue de  $260.01 \pm 12.67$  g/día y  $311.93 \pm 16.17$  g PC/día para el grupo T1 y T2, respectivamente (Figura 2;  $P < 0.05$ ).

El porcentaje de inclusión de *G. sepium* con respecto al total de la dieta ofrecida para el tratamiento fue de  $25.75 \pm 1.7$  %, con un consumo voluntario promedio de  $675.8 \pm 43.4$  g MS/animal/día.



**Figura 1.** Consumo voluntario de MS representado en porcentaje de peso vivo (%PV) (Media±DE).



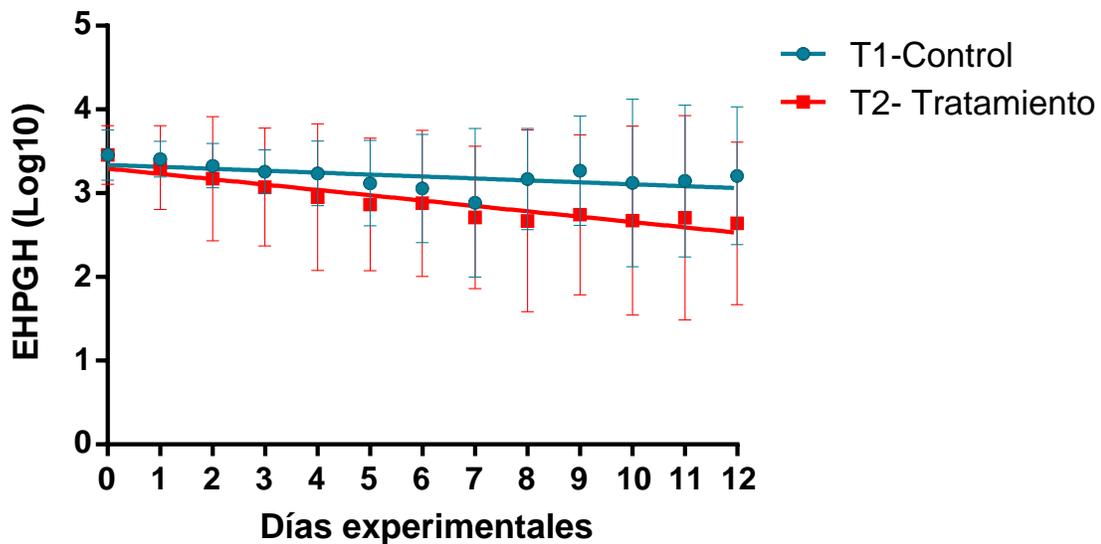
**Figura 2.** Consumo de proteína cruda (PC) total entre tratamientos, representada como gramos de PC por día (g/día) (Media ± DE).

### 8.3 Técnicas parasitológicas

#### 8.3.1 Eliminación de huevos por gramo de heces (hpgh)

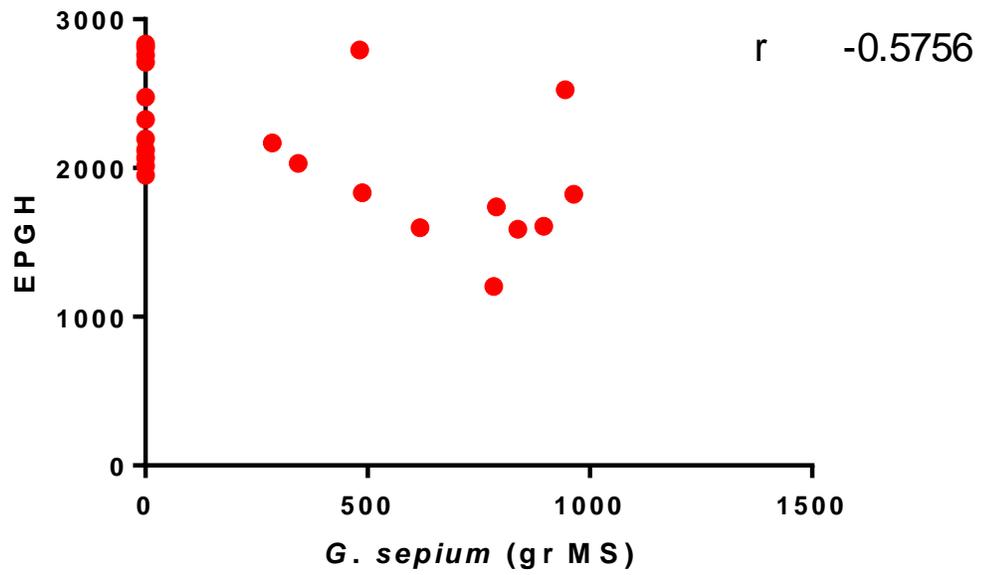
La cinética de eliminación de huevos por gramo de heces entre los grupos experimentales se muestra en la Figura 3. No hubo diferencia en la eliminación de huevos por gramos de heces entre tratamientos (Figura 2;  $P > 0.05$ ). No obstante, se observó una tendencia de reducción en la eliminación de huevos alcanzando al día 12 post-tratamiento fue de 43.54 % (Cuadro 5). Se observó una correlación negativa (-0.58) entre el consumo *Gliricidia sepium* y la eliminación de hpgh, donde por cada 10 gramos extras de consumo de hoja fresca de *G. sepium* se eliminan 5.8 huevos menos por gramo de heces ( $P < 0.05$ ).

#### Eliminación de huevos por gramo de heces entre tratamientos



**Figura 3.** Cinética de eliminación de huevos por gramo de heces (EHPGH) entre los tratamientos ( $\text{Log}_{10}(\text{HPGH}+1)$ ).

**Correlación entre el consumo de *G. sepium* y EHPGH**



**Figura 4.** Correlación entre el consumo de *G. sepium* (g MS) y la eliminación de huevos por gramo de heces (EHPGH).

**Cuadro 5.** Eliminación promedio de huevos por gramo de heces entre tratamientos (Media±EE).

Eliminación promedio de huevos por gramo de heces			
Día de experimentación	T1 (Prom. ± e.e.)	T2 (Prom. ± e.e.)	Reducción en eliminación (%)
1	2800 ± 509	2827 ± 692	0
2	2475 ± 581	2794 ± 893	0
3	2069 ± 454	2168 ± 729	0
4	2326 ± 718	2031 ± 692	12.68
5	2197 ± 882	1598 ± 565	27.24
6	2122 ± 730	1834 ± 682	13.55
7	2014 ± 791	1203 ± 465	40.26
8	1952 ± 701	1608 ± 691	17.59
9	2758 ± 1102	1739 ± 729	36.93
10	2833 ± 1198	1824 ± 815	35.62
11	2710 ± 1142	2525 ± 1089	6.83
12	2812 ± 1141	1588 ± 675	43.54

### 8.3.2 Recuperación, cuantificación y evaluación de los parásitos adultos

#### presentes en intestino delgado

El número total de parásitos adultos recuperados del intestino de los animales en ambos grupos fue de 3280 y 1890 para el grupo control y tratamiento, respectivamente. Se observó una reducción del 39.43 % de la población de *C. punctata* entre grupos experimentales con respecto a sus tasas de establecimiento (%) (Cuadro 6). La proporción de machos y hembras entre grupos fue de 29.1 % de machos y 70.89 % hembras para el grupo tratamiento; mientras que en el grupo control se observó una proporción del 50.3 % de machos y 49.69 % de hembras (Cuadro 7).

**Cuadro 6.** Tasa de Reducción de Adultos entre grupos experimentales T1 y T2.

	<b>Inóculo (No. L3)</b>	<b>Adultos Recuperados</b>	<b>Tasa de establecimiento de adultos (TEA)</b>	<b>Tasa de Reducción de adultos</b>
<b>Control (T1)</b>	54767	3280	5.99 %	<b>39.43 %</b>
<b>Tratamiento (T2)</b>	52100	1890	3.63 %	

**Cuadro 7.** Proporción de machos y hembras recuperados entre grupos experimentales.

	<b>Total machos</b>	<b>Total hembras</b>	<b>Total adultos</b>
<b>Control (T1)</b>	1650	1630	3280
<b>Tratamiento (T2)</b>	550	1340	1890

Las características morfométricas de las hembras de *C. punctata* recuperadas de la mucosa intestinal tuvieron una longitud total de  $6.76 \pm 0.12$  mm y  $8.06 \pm 0.14$  mm en T1 y T2, respectivamente ( $P < 0.05$ ; Cuadro 5). Para los machos adultos, la longitud fue similar entre tratamientos ( $P > 0.05$ ; Cuadro 8).

**Cuadro 8.** Longitud total (mm) de los parásitos adultos de *Cooperia punctata* recuperados de ambos grupos experimentales.

	<b>Longitud total (mm)</b>	
	<b>Hembras</b>	<b>Machos</b>
<b>Control (T1)</b>	$6.76 \pm 0.12^a$	$5.48 \pm 0.08^a$
<b>Tratamiento (T2)</b>	$8.06 \pm 0.14^b$	$5.52 \pm 0.09^a$

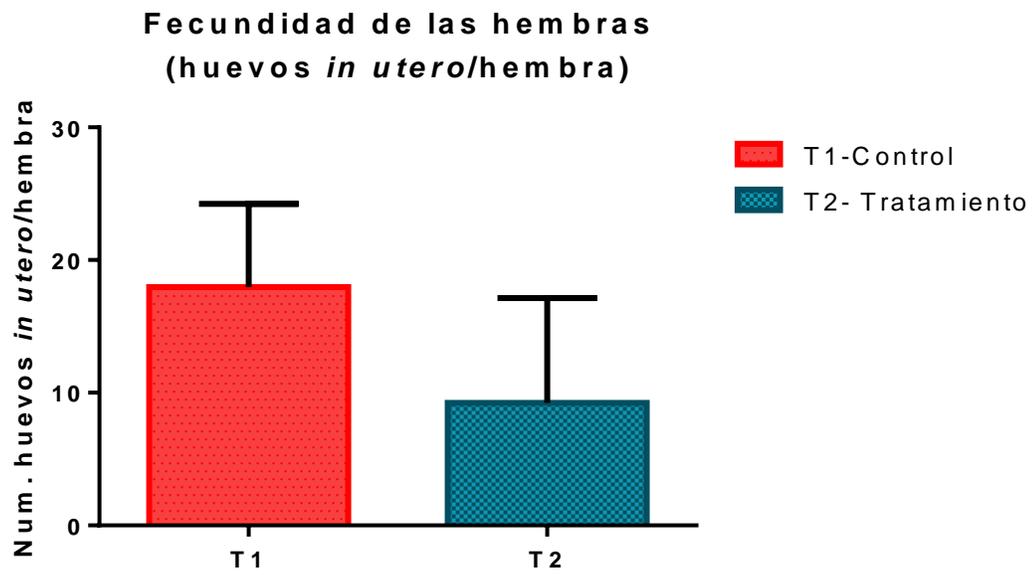
Literales diferentes en la misma columna representan diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ )

### 8.3.3 Evaluación de la fertilidad *per cápita* y fecundidad de las hembras adultas recuperadas

En el grupo tratado, la reducción en la fertilidad *per cápita* de las hembras de *C. punctata* fue del 96.63 % ( $P < 0.05$ ). El número de huevos producidos por hembras en los animales que consumieron *G. sepium* fue menor en comparación a los animales del grupo control (0.04 y 1.33 huevos/hembra, respectivamente) (Cuadro 9). Así mismo, se observó que las hembras parásitas recuperadas de los animales que consumieron *G. sepium* tenían una menor cantidad de huevos *in utero* en comparación a las recuperadas del grupo control ( $9.42 \pm 1.6$  y  $17.96 \pm 1.3$  huevos *in utero*/hembra, respectivamente); con una reducción del 48.55 % en la fecundidad *in utero* ( $P < 0.05$ ; Figura 5).

**Cuadro 9.** Tasa de reducción en la fertilidad del grupo T2 con respecto al T1.

	EPGH	♀ Recuperadas	Fertilidad	% Reducción en la fertilidad
<b>Control (T1)</b>	2165	1630	1.328220859	<b>96.63</b>
<b>Tratamiento (T2)</b>	60	1340	0.044776119	



**Figura 5.** Comparación de la fecundidad de las hembras de *Cooperia punctata* de ambos grupos experimentales; obtenida mediante el conteo de huevos *in utero*.

## 9 DISCUSIÓN

A nivel mundial, la ganadería tropical se enfrenta a múltiples factores que impactan negativamente su desempeño productivo. Se considera que dos de los problemas principales son la baja calidad de la dieta asociado al uso de gramas nativas y las parasitosis que afectan tanto la salud como el desempeño animal (Köler, 2001). Dentro de las principales alternativas que buscan mitigar el impacto negativo de ambos factores, se ha propuesto la inclusión de leguminosas tropicales (González-Arcia *et. al.*, 2012). *Gliricidia sepium* es una leguminosa tropical ampliamente distribuida a nivel mundial que ha sido seleccionada debido a su calidad nutritiva en términos de concentraciones de fibra menores a 40 % y de proteína cruda mayores al 20 %, con una digestibilidad promedio del 76 % (Tesorero y Combellas, 2003). Así mismo, estudios recientes tanto *in vitro* como *in vivo* reportan el potencial antihelmíntico de *G. sepium* como un método preventivo de control de las nematodosis gastrointestinales, inhibiendo el establecimiento larvario de *C. punctata* en bovinos (von Son-de Fernex, 2016). No obstante, se desconoce el efecto que pueda tener sobre poblaciones adultas de *C. punctata*. Motivo por el cual, el objetivo de éste trabajo de investigación fue evaluar el efecto antihelmíntico *in vivo* del consumo de *G. sepium* sobre parásitos adultos de *C. punctata*, en bovinos infectados artificialmente.

El consumo de hojas frescas de *G. sepium* mostró una reducción en la población adulta del 32.07 %, así como una marcada tendencia de reducción en la eliminación de huevos por gramo de heces, alcanzando una reducción del 43.53 % al día 12 post-tratamiento ( $P > 0.05$ ). Dichos resultados son similares a los reportados por Desrues *et al.* (2016), quienes reportan que la utilización de Sainfoin en bovinos infectados artificialmente con *O. ostertagi* y *C. oncophora* redujo la población total de *O. ostertagi* en un 50 %, no obstante no se encontró

una reducción estadísticamente significativa en la EHPGH entre tratamientos. El consumo de *G. sepium* en éste trabajo de investigación puede considerarse como moderado ( $675.8 \pm 43.4$  g MS/día) al compararlo con otros trabajos nutricionales donde se reporta un consumo de 1.3 kg MS/día en becerros (Abdulrazak *et. al.*, 1997), así como con evaluaciones del efecto AH de la leguminosa *in vivo* donde se reportó un consumo promedio de  $1.04 \pm 0.84$  kg MS/becerro/día (von Son-de Fernex, 2016). En éste trabajo de investigación se observó una correlación negativa entre el consumo de hojas frescas de *G. sepium* y la EHPGH ( $P < 0.005$ ), así como un efecto directo sobre la fertilidad, fecundidad *in utero* y la proporción de machos y hembras de *C. punctata* recuperados de la mucosa intestinal. Hasta nuestro conocimiento éste es el primer reporte del efecto antihelmíntico de una planta no taninífera sobre poblaciones adultas de *C. punctata* en bovinos. Nuestros resultados son similares a lo reportado por Heckendorn *et al.* (2006), quienes reportaron que la complementación de ovinos con Sanfoin en una infección mixta de *H. contortus* y *C. curticei* mostró un efecto AH reduciendo la población total de *H. contortus*, sin que la población total de *C. curticei* se viera afectada; y reportan que el consumo de Sainfoin sí mostró un efecto AH directo sobre la fecundidad per cápita de las hembras. De igual manera, Martínez-Ortiz de Montellano *et al.* (2010), reportan que las poblaciones de *H. contortus* no se vieron afectadas por el consumo de plantas ricas en taninos, pero asocian la reducción de la eliminación de huevos entre grupos a la capacidad de los taninos para afectar la fecundidad de las hembras. Las diferencias entre los hallazgos en éste trabajo pueden estar asociados en primer instancia a la composición fitoquímica de la planta; ya que *G. sepium* contiene trazas de taninos (Akharaiyi *et. al.*, 2012; García y Medina, 2006); así mismo se ha reportado que la actividad biológica de la planta puede variar según el género de NGI y su sitio de establecimiento en el TGI de los rumiantes (Athanasiadou *et. al.*, 2007). En éste caso se puede asociar la tendencia de

reducción en la EHPGH entre grupos al efecto sobre la población adulta; así mismo, la reducción en fertilidad y fecundidad de las hembras de *C. punctata* pudiese estar relacionada directamente a la proporción de machos y hembras encontrados en cada tratamiento. Estudios reportan que el consumo de pellets de Sainfoin redujo la proporción de machos de *C. oncophora* a un  $29 \pm 23$  % (Desrues *et al.*, 2016b), valor muy similar al que se encontró en éste trabajo (29.1 %). La reducción de la población masculina parasitaria ha sido relacionada a que en los géneros de *Cooperia* spp, los machos son expulsados primero que las hembras (Desrues *et al.*, 2016b). Es importante mencionar que la mayoría de los estudios existentes sobre el género *Cooperia* spp, se han realizado utilizando como modelo a *C. oncophora* y aunque son el mismo género, existen diferencias morfológicas y genéticas entre especies, y con ello la posibilidad de que el efecto del uso de plantas bioactivas sea diferente. Las características morfométricas de los adultos recuperados indican que las hembras del grupo suplementado con *G. sepium* tuvieron mayor longitud con respecto a las hembras del grupo control ( $8.06 \pm 0.14$  mm y  $6.76 \pm 0.12$  mm respectivamente); cuestión que difiere de lo reportado por Martínez-Ortíz-de-Montellano *et al.* (2010) al probar extractos de *Lysiloma latisiliquum* sobre la fase adulta de *Haemonchus contortus* en ovejas, quienes obtuvieron un menor tamaño en las hembras del grupo tratado. No obstante, nuestros resultados son concordantes con lo observado por Moreno-Gonzalo *et al.* (2014), cuyos reportes indican mayor longitud de las hembras de *Teladorsagia circumcincta* recuperadas de los corderos suplementados con brezo; cuestión que se relacionó con la menor densidad en la población de parásitos adultos y con diferencias en la respuesta inmune individual del huésped (Moreno-Gonzalo *et al.*, 2014). Hasta nuestro conocimiento, no existen datos sobre el efecto de plantas no taniníferas sobre poblaciones adultas de NGI.

## 10 CONCLUSIÓN

El consumo de hojas frescas de *G. sepium* redujo la población adulta, fertilidad y fecundidad de *C. punctata*. Por lo cual, se concluye que la leguminosa tropical *G. sepium* tiene un efecto AH *in vivo* contra poblaciones adultas de *C. punctata*; por lo cual podría considerarse como un método preventivo en el control de la cooperiosis en bovinos.

## 11 LITERATURA CITADA

1. Abdulrazak SA, Muinga RW, Thorpe W, Orskov ER. Supplementation with *Gliricidia sepium* and *Leucaena leucocephala* on voluntary food intake, digestibility, rumen fermentation and live-weight gain of crossbred steers offered *Zea mays* stover. *Livestock Prod Sci.* 1997;49:53-62.
2. Adekunle OK, Akinlua A. Nematicidal effects of *Leucaena leucocephala* and *Gliricidia sepium* extracts on *Meloidogyne incognita* infecting okra. *J Agric Sci.* 2007;52:53-63.
3. Akharaiyi FC, Boboye B, Adetuyi FC. Antibacterial, phytochemical and antioxidant activities of the leaf extracts of *Gliricidia sepium* and *Spathodea campanulata*. *World Applied Sciences Journal.* 2012;16:523-30.
4. Almeida GD, Feliz DC, Heckler RP, Borges DGL, Onizuka MKV, Tavares LER, Paiva F, Borges FA. Ivermectin and moxidectin resistance characterization by larval migration inhibition test in field isolates of *Cooperia spp.* in beef cattle, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Vet parasitol.* 2013;191:59-65.
5. AOAC. Official Methods of Analysis. 13<sup>th</sup> ed. AOAC, Washington DC, USA:1980.
6. Arece J, Roche Y, López Y, Molina M. *In vitro* effect of aqueous extract of *Dichrostachys cinérea* (L.) Wight & Arn. on the developed of exogenous stages of gastrointestinal strongyles in sheep. *Pastos y Forrajes,* 2012;35:301-10.
7. Athanasiadou S, Githiori J, Kyriazakis I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. *Anim.* 2007;1:1392-1400.
8. Basabe J, Eiras DF, Romero JR. Nutrition and gastrointestinal parasitism in ruminant production. *Arch Zootec.* 2009;58:131-44.

9. Becerra-Nava R, Alonso-Díaz MA, Fernández-Salas , Quiroz RH. First report of cattle farms with gastrointestinal nematodes resistant to levamisole in Mexico. *Vet Parasitol.* 2014;204:285–90.
10. Biblioteca digital de la medicina tradicional Mexicana: Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana; [citado 2017 Mayo 20] Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7035>).
11. Brunet S, Hoste H. Monomers of Condensed Tannins Affect the Larval Exsheathment of Parasitic Nematodes of Ruminants. *J Agric Food Chem.* 2006;54:7481-87.
12. Cardozo VJV. El matarratón (*Gliricidia sepium*) en la alimentación de rumiantes (tesis de especialización). Bogotá, Colombia: Univ. Abierta y a Distancia, 2013.
13. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FH, Geerts S, Klei TR, Taylor MA, WallerPJ. World Association for Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.). Methods for detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet Parasitol.* 1992;44:35-43.
14. Corticelli B, Lai M. Ricerche sulla tecnica di coltura delle larve infestive degli strongili gastro-intestinali del bovino. *Acta Medica Veterinaria.* 1963;9:347-357.
15. Demeler J, Krücken J, AlGusbi S, Ramünke S, De Graef J, Kerboeuf D, Geldhof P, Pomroy WE, von Samson HG. Potential contribution of P-glycoproteins to macrocyclic lactone resistance in the cattle parasitic nematode *Cooperia oncophora*. *Mol Biochem Parasitol.* 2013;188(1):19.
16. Desrues O, Peña-Espinoza M, Hansen TV, Heidi L, Enemark HL, Thamsborg SM. Anti-parasitic activity of pelleted sainfoin (*Onobrychis vicifolia*) against *Ostertagia ostertagi* and *Cooperia oncophora* in calves. *Parasit vectors.* 2016b;9:329.

17. Fiel CA, Fernandez AS, Rodriguez EM, Fuse LA, Steffan PE. Observations on the free-living stages of cattle gastrointestinal nematodes. *Vet. Parasitol.* 2012;187:217-226.
18. Foroughbakhch PR, Carrillo PA, Rocha EA, Alvarado VM, Cárdenas AM. Nutrient Content and *in vitro* Dry Matter Digestibility of *Gliricidia sepium* (Jacq.) Walp. and *Leucaena leucocephala* (Lam. De Wit.). *Journal of Animal and Veterinary Advances.* 2012;11:1708-12.
19. García DE, Medina MG. Composición química, metabolitos secundarios, valor nutritivo y aceptabilidad relativa de diez árboles forrajeros. *Zoo Trop.* 2006;24:233-50.
20. García E. Modificaciones del sistema de clasificación climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la República Mexicana). 2ª Reimp. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México, México, DF, 1981.
21. González-Arcia MN, Valles de la Mora B, Alonso-Díaz MA, Castillo-Gallegos E, Ocaña Zavaleta E, Jarillo Rodríguez J. Effect of grazing *Cratylia argentea* associated with *Brachiaria brizantha*-Toledo on quality pasture and weight gain in Holstein x Zebu Heifers. *Trop Subtrop Agroeco.* 2012;15:S1-S11.
22. Guarrera PM. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. *J Ethnopharmacol.* 1999;68:183-92.
23. Heckendorn F, Häring DA, Maurer V, Zinsstag J, Langhans W, Hetzberg H. Effect of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) silage and hay on established populations of *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei* in lambs. *Vet Parasitol.* 2006;142:293-300.

24. Hernández MM, Pérez C, Bolio GI, De la Cruz P, Pérez M, Hernández GI. Phytotherapeutic alternatives to parasites control in animals in smallholder production systems. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal*. 2014;4:292-3.
25. Hoste H, Jackson F, Athanasiadou S, Thamsborg SM, Hoskin SO. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends parasitol*. 2006;22:253-61.
26. Hoste H, Torres-Acosta JFJ, Sandoval-Castro CA, Mueller-Harvey I, Sotiraki S, Louvardini H, Thamsborg SM, Terrill TH. Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Vet Parasitol*. 2015;212:5-17.
27. Hounzangbe-Adote MS, Zinsou FE, Hounpke V, Moutairou K and Hoste H. *In vivo* effects of Fagara leaves on sheep infected with gastrointestinal nematodes. *Trop Anim Health Prod*. 2005;37:205–14.
28. Iqbal Z, Lateef M, Ashraf M, Jabbar A. Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. *J of Ethnopharmacol*. 2004;93:265–68.
29. Kaplan RM. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol*. 2004;20:477-81.
30. Kenyon F, Jackson F. Targeted flock/herd and individual ruminant treatment approaches. *Vet. Parasitol*. 2012;186:10-17.
31. Köler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. *Int J Parasitol*. 2001;3:336-45.
32. Kozan E, Küpeli- Akkol E, Süntarb I. Potential anthelmintic activity of *Pelargonium endlicherianum* Fenzl. *J Ethnopharmacol*. 2016;187:183–6.
33. Kyriazakis, I, Athanasiadou S, Giannenas I. Nutritional strategies to control gastrointestinal parasitism in small ruminants. *Adv. Anim. Biosci*. 2010;1:390-91.

34. Leathwick DM. Managing anthelmintic resistance parasite fitness, drug use strategy and the potencial for revision towards susceptibility. *Vet Parasitol.* 2013;198:145-53.
35. Lesage MC, Mallet S. *Trichostrongylus colubriformis* and *Heligmosomoides polygyrus*: Relationship between infectivity and exsheathment during ageing of infective larvae. *Annales Res Vet.* 1987;18:297-283.
36. Li RW, Gasbarre LC. A temporal shift in regulatory networks and pathways in the bovine small intestine during *Cooperia punctata* infection. *Int J Parasitol.* 2009;39:813.
37. Liébano HE, López AME, Mendoza-de-Gives P, Aguilar ML. Manual de diagnóstico para la identificación de larvas de nematodos gastrointestinales en rumiantes. (Manual técnico). Jiutepec (Morelos) México: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, 2011.
38. Marie-Magdeleine C, Hoste H, Mahieu M, Varo H, Archimede H. *In vitro* effects of *Cucurbita moschata* seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2009;161:99-105.
39. Márquez-Lara D. Origen de la resistencia. In: Resistencia a los antihelmínticos en nematodos de rumiantes y estrategias para su control. Bogotá, Colombia:Corpoica, 2007:45-8.
40. Martínez-Ortíz-de Montellano C, Vargas MJJ, Canul-Ku L, Miranda-Soberanis R, Capetillo LC, Sandoval CA, Hoste H, Torres-Acosta JFJ. Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol.* 2010;172:283-90.
41. Martínez-Ortíz-de Montellano MC, Arroyo LC, Fourquaux I, Torres Acosta JFJ, Sandoval CCA, Hoste H. 2013. Scanning electron microscopy of *Haemonchus*

- contortus* exposed to tannin-rich plants under in vivo and in vitro conditions. *Experimental Parasitology*, 133(3): 281-86.
42. Mendoza-de-Gives P, Valero CO. Uso de hongos nematófagos: una herramienta biotecnológica para el control de nematodos parásitos del ganado. (Folleto técnico). Jiutepec (Morelos) México: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP, 2009.
  43. Min BR, Pomroy WE, Hart SP, Sahlou T. The effect of short-term consumption of a forage containing condensed tannins on gastro-intestinal nematode parasite infections in grazing wether goats. *Small Rumin. Res.* 2004;51:279–83.
  44. Moreno-Gonzalo J, Osoro K, García U, Frutos P, Celaya R, Ferreira LMM, Ortega-Mora LM, Ferre I. Anthelmintic effect of heather in goats experimentally infected with *Trichostrongylus colubriformis*. *Parasitol Res.* 2014;113:693-99.
  45. Niezen JH, Charleston WAG, Hodgson J, Miller CM, Waghorn TS, Robertson HA. Effect of plant species on the larvae of gastrointestinal nematodes which parasitise sheep. *Int. Journal Agric. Parasitol.* 1998;28:791-803.
  46. Paolini V, Bergeaud JP, Grizes C, Prevot F, Dorchies P, Hoste H. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. *Vet Parasitol.* 2003;113:253-61.
  47. Paolini V, Fouraste I, Hoste H. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on third-stage larvae and adult worms of three gastrointestinal nematodes. *Parasitol.* 2004;129:69-77.
  48. Pérez PC, Hernández VMM, de la Cruz BP, Hernández BGI, Bolio LGI. *In vitro* anthelmintic effect of methanolic leaf extract of *Gliricidia sepium* against gastrointestinal nematodes of sheep. *Trop. Subtrop Agroeco.* 2014;17:105-11.

49. Perri AF, Mejía ME, Licoff N, Lázaro 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;178:311-18.
50. Puerto-Abreu M. Efecto *in vitro* de extractos acuosos de diferentes plantas en el desarrollo de las fases exógenas de estrombilidos gastrointestinales de ovinos (tesis de licenciatura). Matanzas, Cuba: Univ. de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, 2013.
51. 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(3):321–342.
52. Ríos-de Álvarez L, Jackson LF, Greer A, Bartley Y, Bartley DJ, Grant G, Huntley JF. 2012. In vitro screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet Parasitol.* 2012;186:390–8.
53. Rodríguez-Vivas RI, Grisi L, Pérez-de León AA, Silva-Villela H, Torres-Acosta JF, Fragoso-Sánchez H, Romero-Salas D, Rosario-Cruz R, Saldierna F, García-Carraco D. Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. Revisión. *Rev Max Cienc Pecu.* 2017;8:61-74.
54. Rodríguez-Vivas RI, Torres-Acosta JF, Ramírez CG, Rosado AJA, Aguilar CAJ, Ojeda CMM, Bolio GME. Control de parásitos internos y externos que afectan al ganado bovino en Yucatán, México. (Manual Técnico). Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán, 2011.
55. Roeber F, Jex AR, Gaser RB. Impact of gastrointestinal parasitic nematodes of sheep, and the role of advanced molecular tools for exploring epidemiology and drug resistance - an Australian perspective. *Parasit Vectors.* May 2013; 6: 153.

56. Sepúlveda-Jiménez G, Porta-Ducoing E, Rocha SM. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. *Rev Mex Fitopatol.* 2003;21:355-63.
57. Simón VF, Simón MF. Nemátodos. En: Cordero-del Campillo M, Rojo VFA, Martínez FAR, Sánchez AMC, Hernández RS, Navarrete LCI, *et. al.* (ed.). *Parasitología Veterinaria.* Madrid España: McGraw-Hill-Interamericana de España, 1999:113-23.
58. Sokerya S and Preston TR. Effect of grass or cassava foliage on growth and nematode parasite infestation in goats fed low or high protein diets in confinement. *Livestock Res for Rural Dev.* 2003;15 (8). Retrieved January 15, 2007, from <http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd15/8/kery158.htm>.
59. Sutherland IA, Leathwick DM. Anthelmintic resistance in nematode parasites of cattle: a global issue?. *Trends Parasitol.* 2011;27:176–81.
60. Tesorero M, Combellas J. Suplementación de becerros de destete temprano con *Gliricidia sepium* y concentrado. *Zoo Trop.* 2003;21.
61. Torres-Acosta JFJ, Vargas-Magaña JJ, Chan-Pérez JI, Aguilar-Caballero A, Alonso-Díaz MA, de la Rosa-Aranda JL, Ojeda-Robertos NF. Recuperación de helmintos a la necropsia. En: Rodríguez-Vivas RI (ed). *Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria.* Mérida, Yucatán, Asociación Mexicana de Parasitólogos Veterinarios, 2015.
62. Valderrábano J, Calvete C, Uriarte J. Effect of feeding bioactive forages on infection and subsequent development of *Haemonchus contortus* in lamb faeces. *Vet Parasitol.* 2010;172:89-94.
63. Van Meulder F, Ratman D, Van Coppennolle S, Borloo J, Li RW, Chiers K, Van den Broeck W, De Bosscher, Claerebout E, Geldhof. Analysis of the protective immune

- response following intramuscular vaccination of calves against the intestinal parasite *Cooperia oncophora*. Int J Parasitol Parasites. 2015;45:637-46.
64. Vieira-Bressan MCR, Gennari SM, Abdalla AL, Pompeu J. Body composition, water and nitrogen balance in calves infected with *Cooperia punctata*. Rev Bras Parasitol Vet. 1996;5:75-9.
65. von Son-de Fernex E. Evaluación *in vitro* e *in vivo* de plantas bioactivas sobre el control de *Cooperia punctata* en bovinos [Tesis de doctorado]. CdMX (MX): Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
66. von Son-de-Fernex E, Alonso-Díaz MA, Mendoza-de Gives P, Valles-de la Mora B, Zamilpa A, González-Cortázar M. Ovicidal activity of extracts from four plants species against the cattle nematode *Cooperia punctata*. Vet. Mex. 2016;3(2):1-14.
67. von Son-de-Fernex E, Alonso-Díaz MA, Mendoza-de-Gives P, Valles-de la Mora B, González-Cortázar M, Zamilpa A, Castillo GE. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. Vet Parasitol. 2015; 214:89-95.
68. von Son-de-Fernex E, Alonso-Díaz MA, Valles-de la Mora B, Capetillo-Leal CM. *In vitro* anthelmintic activity of five tropical legumes on exsheathment and motility of *Haemonchus contortus* infective larvae. Exp Parasitol. 2012;131:413-18.
69. von Son-de-Fernex E, Alonso-Díaz MA, Valles-de la Mora B, Mendoza-de Gives P, González-Cortázar M, Zamilpa A. Anthelmintic effect of 2H-chromen-2-one isolated from *Gliricidia sepium* against *Cooperia punctata*. Exp Parasitol.2017;178:1-6.
70. Wolstenholme AJ, Martin RJ. Anthelmintics – from discovery to resistance. Int J Parasitol Drugs Drug Resist. 2014;4:218-19.

71. Yatsuda AP, Kooyman FNJ, Ploeger HW, Vieira-Bressan MCR, de Vries E, Eysker M. *Cooperia punctata* trickle infections: parasitological parameters and evaluation of a *Cooperia* recombinant 14.2 kDa protein ELISA for estimating cumulative exposure of calves. *Vet Parasitol.* 2002;105:131-8.
72. Yatsuda AP, Vieira-Bressan MCR. Dynamics of the humoral immune response of calves infected and re-infected with *Cooperia punctata*. *Vet Parasitol.* 2000;87:287-300.