



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD ANTIHELMÍNTICA DE UNA SOLUCIÓN ACUOSA DE
TANINOS CONTRA *HAEMONCHUS CONTORTUS* EN OVINOS

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ISRAEL OMAR VILLEGAS PÉREZ

TUTOR
M EN C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
DRA. YAZMÍN ALCALÁ CANTO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

DRA. GUADALUPE PRADO OCHOA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, OCTUBRE 2019



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.



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 está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de video 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.

El trabajo se realizó con el equipo y las instalaciones del laboratorio de desarrollo de métodos analíticos y del laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, así como el módulo de corrales de posgrado, de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

El financiamiento se obtuvo del proyecto PAPIIT: 28-IN2262-17
Israel Omar Villegas Pérez es alumno becario del CONACYT (2015-2016).

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por ser mi alma máter.

Al programa de Maestría en ciencias de la Producción y de la Salud Animal por la formación académica.

Al proyecto PAPIIT: 28-IN2262-17 por el financiamiento de este proyecto de investigación.

Al Mtro. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz por ser guía, maestro, mentor y amigo, muchas gracias por todo, sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible, infinitas gracias.

A los integrantes de mi comité tutor: Dra. Guadalupe Prado Ochoa y la Dra. Yazmín Alcalá Canto, gracias por haberme guiado y apoyado durante este proceso, gracias por ser mujeres excelentes y sobre todo por su amistad.

A la Dra. Gabriela Vargas por su apoyo, asesoría y amistad, muchas gracias.

A los miembros del jurado de mi examen de grado por su valiosa contribución: Dra. María Eugenia López Arellano, Dra. Yazmín Alcalá Canto, Dra. Perla Acevedo y al Dr. Juan Antonio Figueroa Castillo.

Al Mtro. Héctor Alejandro de la Cruz Cruz, mi muy estimado y querido compadre, ya van casi 20 años de amistad ¿se dice fácil no?. Gracias por tu amistad y por ser mi asesor emergente.

A la Mtra., Rosa Isabel Higuera Piedrahita, gracias por tu asesoría y amistad.

A la empresa UNITAN SAICA por las muestras otorgadas de quebracho.

Agradecimientos

A Dios por todo lo recibido.

A mis amigos que directa e indirectamente ayudaron en mi proceso de formación: la MVZ. María Esther Ramírez Portilla, gracias por ser mi partner, mi cómplice, mi confidente, simplemente mi mejor amiga.

Al Dr. Víctor Díaz por su apoyo, consejos y amistad.

A Carlos Cuevas y Fernanda Torres, gracias por haberse interesado en este tema y por permitirme ser su coasesor, toda una miniaventura este experimento, gracias porque sin su ayuda esto no hubiera resultado.

Gracias a mis padres María Teresa Pérez Navarro y Raúl Villegas Orozco, no hay palabras suficientes para agradecer el amor y comprensión que me han dado, sin su guía simplemente no sería la persona que soy ahora y que quiero ser en el futuro, ¡LOS AMO!

A mis hermanos, Yani, Iván, Bere, Diana y Emmanuel, ustedes forman parte fundamental en mi formación, los amo y respeto mucho.

Por último, pero no menos importante, le agradezco a mi esposa María del Rocío Martínez de Anda por ser mi brújula y mi cimiento, con tu amor, fortaleza y guía que siempre me ayudan y motivan a seguir adelante y ser una mejor persona.

¡Te amo con todo lo que soy Pancito!.

P.D. eres mi heroína...<3

Gracias a los animales que se utilizaron en este proyecto de investigación, ya que es por ellos y para ellos que pretendo mejorar como médico veterinario.

“Es importante ser inteligente, tener talento, títulos y ser un buen líder, pero aún más importante es ser una buena persona”

Índice

	Página
Índice de figuras.....	1
Índice de cuadros.....	2
Índice de anexos.....	3
Resumen.....	4
Abstract	5
Introducción.....	6
Justificación.....	16
Hipótesis de investigación.....	17
Objetivos de investigación.....	18
Materiales y métodos.....	19
Experimento I.....	21
Materiales y métodos.....	21
Materiales y métodos para la determinación de taninos condensados.	23
Resultados y discusión.....	27
Experimento II: Evaluación de la eficacia de la solución acuosa de taninos en la inhibición de la eclosión de huevos y evaluación de la motilidad de L ₃ de <i>Haemonchus. contortus</i>	28
Materiales y métodos.....	28
Resultados y discusión del ensayo inhibición de la eclosión.....	30
Resultados y discusión del ensayo motilidad de L ₃	33
Experimento III y IV: Evaluación de la eficacia de la solución acuosa de taninos en una infección controlada por <i>Haemonchus. contortus</i>	35
Materiales y métodos.....	35
Modelos experimentales.....	36
Preparación y administración de la solución acuosa de taninos condensados.....	38
Resultados modelo experimental I.....	44
Discusión.....	49

Resultados modelo experimental II.....	50
Discusión.....	56
Discusión general.....	58
Conclusiones generales.....	61
Bibliografía.....	62
Anexo 1.....	75
Anexo 2.....	77

Índice de figuras.

	Página
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Haemonchus contortus</i>	10
Figura 2. Esquema de la asociación de la vainillina con proantocianidinas.....	22
Figura 3. Tubos con la solución final, a los cuales se les midió la absorbancia.....	24
Figura 4. Curva de calibración.....	25
Figura 5. Inhibición de la eclosión de L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución de taninos condensados (ATO) o albendazol.....	30
Figura 6. Inhibición de la eclosión de L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución de taninos condensados (MGM) o albendazol.....	31
Figura 7. Estructuras encontradas en el ensayo de la inhibición de la eclosión.....	32
Figura 8. Motilidad de las L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución de taninos condensados o albendazol a diferentes horas de exposición.....	34
Figura 9. Metodología llevada a cabo de la infección experimental controlada.....	37
Figura 10. Sistema FAMACHA.....	41
Figura 11. Eliminación de huevos en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución de taninos condensados y levamisol.....	44
Figura 12. Volumen del paquete celular (%) en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución de taninos condensados y levamisol.....	45
Figura 13. Índice del sistema FAMACHA en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución acuosa de taninos condensados y levamisol.....	47
Figura 14. Cantidad de fases adultas de <i>Haemonchus contortus</i> colectadas del abomaso de ovinos tratados con una solución acuosa de taninos condensados o levamisol.....	48

Figura 15. Eliminación de huevos en ovinos infectados con <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución de taninos condensados y levamisol.....	50
Figura 16. Volumen del paquete celular (%) en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución de taninos condensados y levamisol.....	51
Figura 17. Índice del sistema FAMACHA en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> tratados con una solución acuosa de taninos o levamisol.....	54
Figura 18. Cantidad de fases adultas de <i>Haemonchus contortus</i> colectadas del abomaso de ovinos tratados con una solución acuosa de taninos condensados o levamisol.....	55

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Diluciones ordenadas.....	24
Cuadro 2. Datos de la absorbancia para curva de calibración.....	25
Cuadro 3. Procedimiento aplicado para cada una de las muestras que a las que se les midió la absorbancia.....	26
Cuadro 4. Porcentaje contenido de taninos condensados en cada muestra.....	27
Cuadro 5. Ensayo de la motilidad de L ₃	29
Cuadro 6. Índice de movilidad de las L ₃ de <i>Haemonchus contortus</i>	29
Cuadro 7. Peso corporal (kg) en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> , tratados con una solución de taninos condensados o levamisol.....	46
Cuadro 8. Índice de la condición corporal en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> , tratados con una solución de taninos condensados o levamisol.....	47
Cuadro 9. Peso corporal en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> , tratados con una solución de taninos condensados o levamisol.....	52

Cuadro 10. Índice de la condición corporal en ovinos infectados artificialmente con <i>Haemonchus contortus</i> , tratados con una solución acuosa de taninos o levamisol.....	53
--	----

Índice de anexos.

Anexo 1. Ensayo de eclosión de.....	75
Anexo 2 Ensayo de la motilidad de L ₃	77

Resumen.

El objetivo del presente trabajo de investigación fue evaluar el efecto antihelmíntico de una solución acuosa de taninos condensados (SATC) contra *Haemonchus contortus*. La investigación se llevó a cabo en cuatro etapas: 1. Determinación de taninos condensados (polifenoles), contenidos en un extracto de quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*). En promedio se obtuvo 113.2 g de taninos condensados/kg del extracto. 2. Pruebas *in vitro*, ensayo de eclosión de huevos (EHA) y motilidad de las larvas, se obtuvo que el uso de la SATC, la cual inhibió 55.2% de la EHA en comparación con el 100% que mostró el albendazol. En el ensayo de la motilidad se observó efecto a las tres horas de exposición con la SATC, pero entre mayor tiempo de exposición de las larvas a la solución, la motilidad de estas se reduce considerablemente.

La infección controlada y el tratamiento se analizó con base en el efecto nematicida en la solución acuosa de taninos contra el establecimiento de L₃ y en las fases adultas de fue dividida en dos experimentos; la evaluación del efecto antiparasitario de la solución acuosa de taninos contra el establecimiento de L₃ y también sobre el efecto de esta misma en las fases adultas de *H. contortus*. En ambos casos se colectaron las fases adultas del parásito, y se observó una disminución en la cantidad (2,290 y 5,090), en comparación con el grupo testigo (8,685), observándose una diferencia significativa ($P < 0.05$).

Abstract.

The objective of this research was to evaluate the anthelmintic effect of an aqueous solution of condensed tannins (ASCT) against *Haemonchus contortus*. The investigation was carried out in four stages: 1. Determination of condensed tannins (polyphenols), contained in a quebracho extract (*Schinopsis balansae / lorentzii*). On average, 113.2 g of condensed tannins / kg of the extract were obtained. 2. *In vitro* tests, egg hatching test (EHA) and larval motility test, it was obtained that the use of ASCT, which inhibited 55.2% of EHA compared to 100% that showed albendazole. In the motility test, an effect was observed at three hours of exposure with the ASCT, but the longer the exposure of the larvae to the solution, the motility of these is considerably reduced.

Controlled infection and treatment was analyzed based on the nematicidal effect in the aqueous solution of tannins against the establishment of L₃ and in the adult phases it was divided into two experiments; the evaluation of the antiparasitic effect of the aqueous solution of tannins against the establishment of L₃ and also on the effect of the same solution in the adult phases of *H. contortus*. In both cases the adult phases of the parasite were collected, and a decrease in the amount (2,290 and 5,090) was observed, compared to the control group (8,685), with a significant difference ($P < 0.05$).

Introducción.

Los nematodos (gusanos redondos), de humanos y otros animales son de gran importancia como patógenos (Anderson, 2000). Particularmente los nematodos del ganado, incluidas especies de *Haemonchus*, *Ostertagia* y *Trichostrongylus*, causan pérdidas económicas sustanciales debido a un crecimiento reducido, pobre productividad y muerte (Wolstenholme y col., 2004; Kaplan y Vidyashankar, 2012). A nivel mundial, *Haemonchus contortus* es uno de los representantes más importantes de la orden *Strongylida*, que infecta a pequeños rumiantes principalmente a los ovinos por el hecho de ser una de las especies que por tradición se cría en condiciones rústicas en áreas tropicales y subtropicales como México (Besier y col., 2016).

Uno de los principales problemas sanitarios que enfrenta la producción ovina nacional es causada por los nematodos gastrointestinales (NGI) (Cuéllar, 2007). Esta parasitosis se adquiere en los sistemas productivos donde se practica el pastoreo y resulta un problema sanitario frecuente en los sistemas donde existen praderas irrigadas (Cuéllar, 1992). La infección por NGE es una de las parasitosis más comunes en México, afecta principalmente a los ovinos por el hecho de ser una de las especies que por tradición se cría en condiciones rústicas. La nematodiasis gastrointestinal se caracteriza por alteraciones digestivas, retraso del crecimiento, disminución de la producción, edema submandibular, anemias y muerte. La intensidad de la parasitosis varía con la edad y con el sistema de producción (Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003).

Esta enfermedad es producida por nematodos de varios géneros que interaccionan en el tracto digestivo de los rumiantes y traen como consecuencia importantes trastornos metabólicos (Cuéllar, 1986). Los nematodos gastroentéricos (NGE) más frecuentes en los ovinos de México, son: *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta*, *Trichostrongylus* sp., *Cooperia* sp., *Strongyloides papillosus*, *Chabertia ovina*, *Nematodirus* sp., *Oesophagostomum* sp. y *Trichuris ovis* (Quiroz, 2003).

De la amplia gama de NGE que afectan a los ovinos sobresale *Haemonchus contortus*, que por sus hábitos hematófagos se convierte en uno de los que tiene mayor grado de virulencia (Quiroz, 2003). Debido a su patogenia y distribución geográfica se considera que *H. contortus* es el nematodo más importante en los ovinos de México (Cuéllar, 1986).

1.1 Características de *Haemonchus contortus*

El *H. contortus* también es conocido como gran gusano del estómago, gusano del cuajar (Soulsby, 1987), gusano en poste de barbero (Lapage, 1976). Los adultos de *H. contortus* se localizan en el abomaso del hospedador. Las hembras pueden producir de 5,000 a 10,000 huevos al día, los cuales son eliminados en la materia fecal, si las condiciones ambientales son adecuadas, se desarrolla la larva 1 (L₁) que eclosiona en la materia fecal en 1 o 2 días (Quiroz, 2003).

El ciclo evolutivo es directo, dividiéndose en una fase no parásita que se desarrolla fuera del hospedero y otra fase parásita, que se desarrolla dentro del rumiante (Lapage, 1983).

El nematodo más virulento de las regiones tropicales y subtropicales es *H. contortus*, el cual además de ser endémico de estas regiones geográficas, se ve favorecido por las lluvias continuas que permiten la presencia de estados larvarios en las pasturas durante casi todo el año. Así puede causar la muerte a ovejas y cabras de todas las edades en cualquier época (Waller, 2002).

Fase no parásita o de vida libre.

Los huevos de NGE son expulsados del organismo del animal parasitado en las heces y liberados sobre las praderas (Mehlhorn, 2004). En este momento se encuentran en estado de embriogénesis, salvo los de *Strongyloides papillosus* que ya contienen larvas (L₁) formadas. En condiciones adecuadas de humedad y temperatura, en 1 o 2 días se desarrolla el embrión dentro del huevo y eclosiona una larva de primer estado (L₁) (Niec, 1968).

Los huevos de *H. contortus* miden de 70 a 85 µm de ancho, contienen un embrión de 16 a 32 células. Si las condiciones de temperatura son de entre 20 y 35 °C y la

humedad relativa es del 100%, el desarrollo del huevo al primer estadio evolutivo se inicia entre las primeras 24 y 30 horas de incubación, debido a la secreción de enzimas como la quitinasa y la proteasa las cuales rompen la pared del huevo permitiendo la ecdisis o desenvaine de la larva (L₁), la que tiene en promedio 369 µm de longitud total, su estructura es muy simple posee cavidad bucal y esófago bulboso (rabbitiforme), también está provista de un aparato bulbar característico en forma de “Y” al que sigue un intestino simple de luz bien visible que termina en el ano (Quiroz, 2003).

Esta se alimenta de bacterias del medio donde se encuentra. Al completar su crecimiento, muda de epidermis y se transforma en larva 2 (L₂), que también se alimenta de bacterias y crece hasta que madura, muda su epidermis, pero esta no se desecha, permanece como una envoltura suelta alrededor de la L₃ que se ve separada por ella del ambiente, por lo tanto, no puede alimentarse. La L₃ se mantiene de los gránulos de material alimenticio que han sido almacenados dentro de las células que recubren su intestino (Lapage, 1976).

La tercera larva es en realidad la fase infectante de este nematodo. La primera y segunda larva no puede infectar a un nuevo hospedero y si son ingeridas por algún animal son destruidas por acción de los jugos gástricos (Niec, 1968; Smith 1974; Lapage, 1983). La L₃ es activa y capaz de subir a los tallos y hojas que sirven de alimento a los hospederos, de esta manera se favorece su ingestión por vía oral constituyendo la última etapa del ciclo biológico fuera del hospedero definitivo. La duración de la etapa no parásita de *H. contortus* es de siete a 90 días dependiendo esto de las condiciones climatológicas de la región (Quiroz, 1984).

Fase parásita

Las larvas infectantes constituyen la última etapa del ciclo biológico fuera del huésped definitivo. Ingeridas con el forraje penetran en la mucosa del abomaso o del intestino, donde sufren dos mudas más, convirtiéndose en larvas de cuarto y quinto estado y finalmente en los nematodos maduros, formas sexuales. El ciclo

biológico completo varía según la especie desde más o menos 17 días (*Cooperia* sp.), hasta 25 a 45 días (*Nematodirus* sp.) (Niec, 1968).

El *H. contortus* es uno de los principales nematodos que afecta a ovinos y caprinos (Burke, 2005). Su ciclo de vida es de tres semanas aproximadamente. La larva infectiva es consumida por los animales con el forraje y una vez en el rumen, ésta continua su desarrollo, viaja hasta el abomaso y allí llega a su estado adulto (fig. 1). Una hembra adulta de nematodo puede producir miles de huevos y consumir cerca de 200 μ l de sangre diariamente. La gran capacidad de excretar huevos de las hembras es la principal causa de las epidemias que se generan al inicio de las épocas lluviosas cuando las condiciones climáticas son favorables para el desarrollo de las larvas (Burke, 2005).

En el rumen de un nuevo hospedero la muda de larva L₃ se inicia al detectarse un incremento de pH ruminal causado por la secreción de leucina-amino-peptidasa a través de las células neurosecretoras localizadas entre la base del esófago y los orificios excretores de la larva, hay un desprendimiento del casquete de la larva, que es precedido por la aparición de un tenue anillo refringente en el punto donde el casquete se va a desprender (Olsen, 1974; Dakkak, 1981; Soulsby, 1982). La entrada de la fase infectante al orificio omaso-abomasal ocurre de 10 a 20 minutos después de haber sido ingerida la L₃. Una vez que la larva se ha liberado pasa hacia el abomaso y entra a una fase del ciclo biológico denominada fase tisular o histotrópica, momento durante el cual se transforma en larva cuatro (L₄), ésta penetra a las criptas de las glándulas gástricas donde se alimenta y crece, posteriormente pasa a la mucosa abomasal y después abandona ésta para alojarse en el lumen del abomaso mudando una vez más para transformarse en la larva cinco (L₅), la cual se desarrolla directamente sin mudas posteriores hasta madurar y transformarse en verme adulto, macho o hembra (Hsu, 1977; Sommerville, 1977).

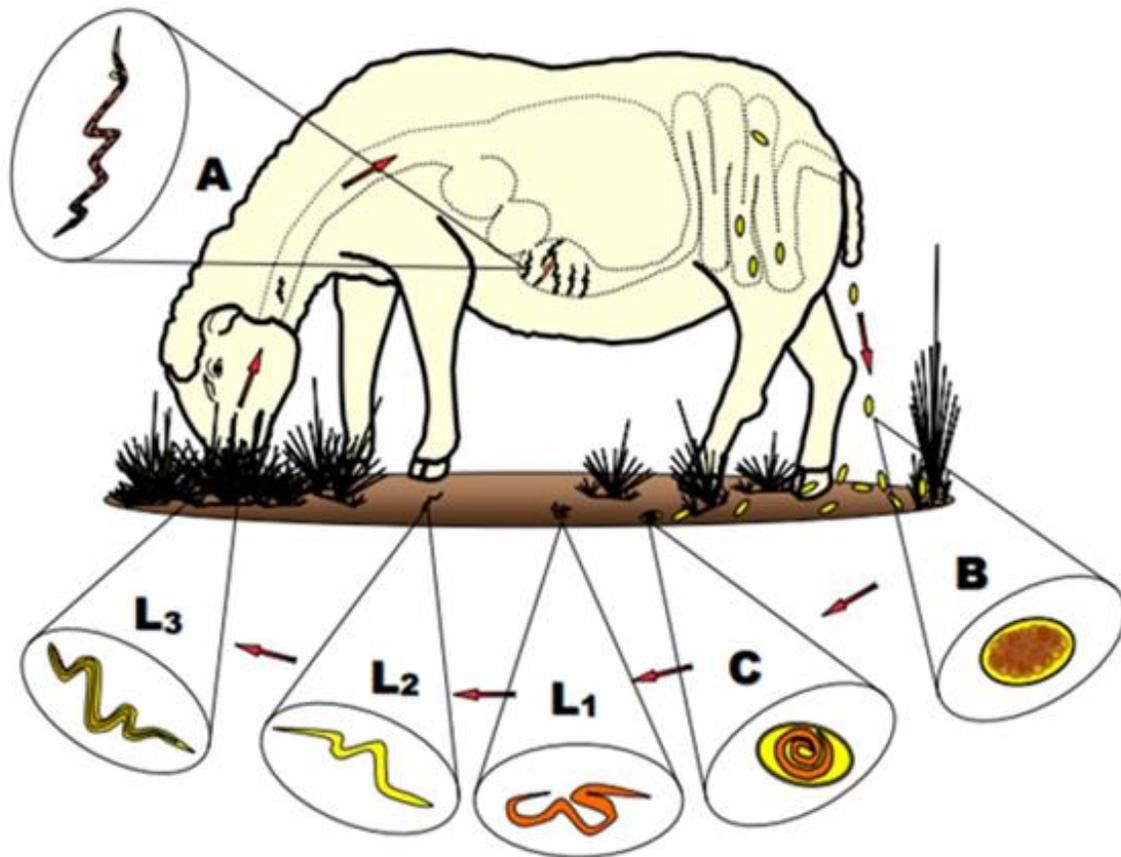


Figura 1. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*. A) Adultos en el lumen abomasal. B) Huevo eliminado en heces. C) Huevo larvado. L₁) Larva 1 libre en suelo. L₂) Larva 2. L₃) Larva 3 (fase infectante).

Resistencia.

La alta incidencia de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes, especialmente *H. contortus* y en menor escala otros, como *Cooperia* sp., *Trichostrongylus colubriformis*, *Oesophagostomum* sp. y *Strongyloides papillosus* y la resistencia que los mismos han generado a gran parte de los fármacos antiparasitarios, hacen necesaria la búsqueda de nuevas soluciones a este problema (Álvarez y col., 2004).

El control de *H. contortus* y otros nematodos ha recaído fuertemente sobre el uso de los fármacos antihelmínticos (Holden-Dye y Walker, 2014). Tales fármacos

incluyen derivados del aminoacetonitrilo (Ej. monepantel), aminofenilaminidas (Ej. tribendimidinas), bencimidazoles (Ej. albendazol), imidasotiazoles (Ej. levamisol), lactonas macrocíclicas (Ej. ivermectina y moxidectina), espiroindoles (Ej. derquantel) y tetrahidropirimidinas (Ej. morantel, oxantel y pirantel). El levamisol y pirantel actúan ligándose a un subgrupo de canales iónicos receptores de acetilcolina de los nervios y músculos de los nematodos, resultando en una contracción espástica del músculo (Robertson y col., 2010) o parálisis de los gusanos; los parásitos son incapaces de moverse dentro del tracto, por lo tanto, son removidos mediante el peristaltismo. Los bencimidazoles tienen actividad en contra de diversas especies de nematodos (Keizer y Utzinger, 2008); ligándose a la tubulina (proteína del citoesqueleto), bloqueando la formación de matriz micro tubular, la cual es esencial para varios procesos biológicos en la célula, incluyendo movimiento cromosomal y división celular (Stepek y col., 2006; Holden-Dye y Walker, 2014). Las lactonas macrocíclicas actúan abriendo los canales de cloruro controlados por glutamato, aumentando el flujo de iones de cloruro, lo que conduce a defectos en la neurotransmisión y parálisis flácida (Stepek y col., 2006). Recientemente nuevas clases de antihelmínticos, por ejemplo: cicloocta depsipéptidos (Ej. emodepside), los derivados de aminoacetonitrilo (Ej. monepantel) y los espiroindoles (Ej. derquantel), están disponibles comercialmente (Epe y Kaminsky, 2013). Estos químicos se ligan a la proteína G y a los canales de potasio dependientes de voltaje/calcio (emodepsida), algunos receptores de acetilcolina (monepantel) o receptores de acetilcolina nicotínica (derquantel) del subtipo B, que conducen a parálisis espástica (monepantel) o flácida (emodepside y derquantel) de algunos parásitos nematodos y su posterior muerte (Krücken y col., 2012; Epe y Kaminsky, 2013).

Hasta ahora, el control de estos parásitos ha recaído esencialmente en el uso repetido de productos antihelmínticos comerciales, ahora bien, la resistencia a los fármacos antihelmínticos es generalizada en las poblaciones de nematodos y la aparición de cepas resistentes se ha convertido en un problema serio en algunas regiones del mundo (Kaplan, 2004). Aunado al costo relativamente bajo y la fácil administración de los fármacos antihelmínticos en contra de los NGE de los

animales, ha llevado a su uso extensivo y consecuentemente, a una resistencia por parte de los parásitos (Gilleard, 2006). En efecto, la resistencia de los nematodos hacia bencimidazoles, imidazotiazoles/tetrahidropirimidinas y lactonas macrocíclicas, ha sido reportado en muchas partes del mundo en todos los continentes (Hughes y col., 2007; Demeler y col., 2009; Papadopoulos y col., 2012; Verissimo y col., 2012; Byaruhanga y Okwee-Acai, 2013; Falzon y col., 2013; Rialch y col., 2013; Tsoetsi y col., 2013; Chagas y col., 2013; Becerra-Nava y col., 2014; Keane y col., 2014; Nabukenya y col., 2014; Gasbarre, 2014; Kudo y col., 2014; Mahieu y col., 2014; Playford y col., 2014; Bourguinat y col., 2015; Muñoz-Lagunes y col., 2015).

Además de esto, la resistencia a los nuevos fármacos antihelmínticos se desarrolla rápidamente en los parásitos (Waller, 2005). Por lo anterior, el manejo para el control de los parásitos busca alcanzar un control mejor integrado y más sustentable, por medio de la combinación de tres principios; manejo de los sistemas de pastoreo, estimular la respuesta del hospedador y mediante la modulación de la biología del parásito (Hoste y Torres-Acosta, 2011).

Entre estos enfoques novedosos se encuentra la larga tradición en el uso de plantas bioactivas que, por sus propiedades antiparasitarias, han sido un campo re-explorado. Esto es ahora considerado como una opción más para mejorar el control sobre los NGE (Rochfort y col., 2008).

Existe evidencia de que los taninos presentes en las leguminosas en niveles medianos contribuyen al control de parásitos gastrointestinales en pequeños rumiantes, lo cual se traduce en un mejor desempeño productivo. Paolini y col. (2003a), suministraron a cabras una suspensión de extracto de quebracho (*Schinopsis* sp.), para observar el efecto de sus taninos sobre el recuento fecal de huevos de *H. contortus*, la cantidad de gusanos presentes y los cambios en la densidad de la mucosa del abomaso. Hubo disminución en la cantidad de huevos en las heces fecales, pero no en los otros dos indicadores estudiados. Los

resultados sugieren que los taninos tienen un efecto sobre la fecundidad de las hembras de *H. contortus*, reduciéndose así la excreción de huevos.

Molan y col. (2000) evaluaron el efecto de extractos de taninos de diferentes leguminosas sobre la migración larval de *Trichostrongylus colubriformis*, encontraron un efecto positivo de los taninos extraídos de todas las especies estudiadas sobre la inhibición de la migración larval, la cual fue mayor con una concentración de 1000 µg/ml. La respuesta en la migración larval fue mayor después de siete meses de exposición. Estas observaciones sobre la importancia del tiempo de exposición de los parásitos a los taninos para el resultante efecto sobre la población de gusanos en el abomaso coinciden con lo encontrado por Pomroy y Adlington (2006), quienes evaluaron el efecto de la suplementación con la planta sulla (*Hedysarum coronarium*) con niveles de taninos de 2.6% por un período de 10 días. Después de este tiempo, sacrificaron los animales y contaron los gusanos de nematodos, pero no encontraron diferencias respecto al grupo testigo, lo cual sugiere que se necesitan mayores períodos de exposición a los taninos para facilitar su eficacia.

Lange y col. (2006) evaluaron el efecto de los taninos condensados (TC) presentes en el heno de *Lespedeza cuneata* sobre el parasitismo de *H. contortus* en corderos. Utilizaron un grupo de animales infectados naturalmente y otro de corderos infectados experimentalmente. Las dietas basales de heno de *L. cuneata* y heno de pasto bermuda (grupo testigo) fueron ofrecidas por 49 días. Posteriormente alimentaron ambos grupos solo con heno de pasto bermuda durante 14 días adicionales. El conteo fecal de huevos se redujo entre un 67 y 98%, mientras recibieron el heno de *L. cuneata*, pero se incrementó nuevamente al suspender su uso, lo cual indica un efecto de los TC sobre la fecundidad de las hembras de *H. contortus*. Estos resultados sugieren que el heno de *L. cuneata* puede ser utilizado para disminuir la carga parasitaria en las pasturas por su efecto sobre la excreción de huevos al medio.

Recientemente se ha encontrado evidencia del efecto antihelmíntico que pueden tener las sustancias bioactivas provenientes de las plantas. Estos efectos están asociados con el consumo de plantas ricas en taninos (Martínez y col., 2013).

Los taninos son un grupo complejo de compuestos polifenólicos, desarrollados por las plantas como un mecanismo de defensa para evitar ser ingeridas por los herbívoros. Los taninos son clasificados en dos grupos mayores, los hidrolizables y los condensados, siendo estos últimos los que han demostrado ser menos tóxicos. Los TC se caracterizan por una unión estable a proteínas, han demostrado tener una importante bioactividad con agentes antioxidantes, foto protectores, cicatrizantes, reafirmantes, antiulcerosos, astringentes y antivirales (Dearing, 2005). En los últimos 20 años se ha obtenido suficiente experiencia que respalda el uso de plantas para el control de NGE. La primera evidencia se originó en una investigación en Nueva Zelanda, basada en resultados empíricos y que reportaron una reducción significativa en la cuenta de huevos de NGE en heces de ovinos cuando tenían un pastoreo con diferentes legumbres, las cuales contenían TC. Es necesario continuar con el desarrollo de sistemas de manejo en las granjas, los cuales puedan mantener altos niveles en la producción de los animales con una menor dependencia en el uso de antihelmínticos. Una opción puede ser incluir plantas que contengan una alta cantidad de taninos TC en la rotación de praderas. Los TC también pueden beneficiar la nutrición de los rumiantes al reducir la degradación de la proteína vegetal por los microorganismos del rumen con la producción de amoníaco, aumentando el flujo de esa proteína hacia el intestino (Waghorn y col., 1987, 1994), traduciéndose en una mejora en la eficiencia productivo del animal (Terrill y col., 1992; Douglas y col., 1995; Niezen y col., 1995; Niezen y col., 1995; Wang y col., 1996; Leathwick y Atkinson, 1996; Niezen y col., 1998).

La actividad nematocida de los extractos de taninos en contra de L₃ de NGE (*H. contortus* y *T. colubriformis*), ha sido evaluada *in vitro* utilizando forrajes leguminosos o plantas leñosas cultivadas bajo climas templados (Molan y col., 2003, Paolini y col., 2004) y en condiciones tropicales (Alonso-Díaz y col., 2008a, 2008b).

Mientras que en las pruebas *in vivo*, los efectos antihelmínticos reportados por Brunet y col., 2008, quienes encontraron un establecimiento reducido de *H. contortus* en el abomaso de cabras y (Martínez-Ortiz-de-Montellano y col., 2010) reportó una reducción de conteo de huevos en las heces, fecundidad de las hembras y tamaño de los gusanos.

Se sospecha de una propiedad antihelmíntica por parte de los taninos. Recientemente se han descrito cambios funcionales y estructurales para la L₃ con *Onobrychis viciifolia* (Brunet y Hoste, 2006; Brunet y col., 2007, 2008a, b, 2011). Estos cambios se han relacionado, ya sea a una reducción en la cantidad de gusanos (Paolini y col., 2003a, b, 2005; Heckendorn y col., 2006, 2007; Terrill y col., 2007, 2009) y/o en la reducción de la fertilidad por hembras (Lange y col., 2006; Heckendorn y col., 2007; Manolaraki y col., 2010; Martínez Ortiz-de Montellano y col., 2010). Si bien, una serie de informes han descrito la acción de los taninos y polifenoles en contra la L₃ (Brunet y col., 2011), hay menos información disponible sobre el posible mecanismo de acción. En condiciones *in vitro*, el contacto con extracto de *sainfoin* (*O. viciifolia*) ha sido asociado con una viabilidad reducida de los adultos de *H. contortus* (Paolini y col., 2004). Se han detectado lesiones cuticulares por microscopia electrónica de barrido en nematodos expuestos al látex de papaya y ficina (proteinasas vegetales) (Behnke y col., 2008).

Sin embargo, los mecanismos de acción de estos compuestos polifenólicos en contra de los nematodos aún se desconocen (Hoste y col., 2006; Mueller-Harvey, 2006).

Justificación.

La búsqueda de nuevas moléculas que tengan capacidad antihelmíntica no es sencilla, la investigación requerida para generar una nueva fórmula que sea eficaz requiere mucho tiempo y a su vez los costos son demasiado elevados.

Teniendo esto en cuenta, se hace necesaria la implementación de nuevas técnicas, la búsqueda de nuevas moléculas y/o métodos de control parasitario, tanto dentro de los animales, como en las praderas, (fase parásita y de vida libre), de esta forma nacen nuevas líneas de investigación como el control biológico, la herbolaria y la homeopatía, las cuales pueden ser una herramienta más para combatir la infección por NGE, el cual es un problema muy importante en los sistemas de producción de rumiantes en pastoreo. Recientemente se ha encontrado evidencia del efecto antihelmíntico que pueden tener las sustancias bioactivas provenientes de las plantas. Estos efectos están asociados con el consumo de plantas ricas en taninos.

Tanto en experimentos *in vitro* como en pruebas de campo se ha corroborado la capacidad antihelmíntica por parte de los taninos contra las fases adultas de NGE, pero estas pruebas se han llevado a cabo empleando plantas o partes de ellas dificultando definir su dosis exacta, mecanismos de acción y efectos nocivos o tóxicos sobre el hospedador.

A través del presente trabajo, se pretende a partir del uso de una solución acuosa de extracto de quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*) rica en taninos condensados, conocer el contenido real de estos taninos y evaluar la eficacia sobre las fases larvarias de NGE a través de pruebas *in vitro* y contra las fases adultas de NGE en la evaluación de una prueba controlada empleando una cepa de *H. contortus*.

Hipótesis

Los taninos condensados derivados del quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*) presentan efecto antihelmíntico *in vitro* e *in vivo* contra *Haemonchus contortus* en ovinos.

1. Los taninos condensados presentes en una solución acuosa de extracto de quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*) tiene un efecto nematicida contra NGE, especialmente contra *H. contortus*.
2. El extracto de taninos condensados en una solución acuosa tiene eficacia antihelmíntica *in vitro* que afecta el desarrollo de huevos y estadios larvarios de *H. contortus*.
3. La solución acusa del extracto de quebracho tiene efecto antiparasitario en ovinos infectados en forma artificial con *H. contortus*.
4. Conocer el efecto antihelmíntico de la solución acuosa con taninos condensados contra una infección controlada por *H. contortus* en ovinos, para conocer la dinámica de eliminación de huevos, cambios en el peso corporal, volumen del paquete celular, coloración de la mucosa conjuntival (sistema FAMACHA) y número de nematodos contenidos en el abomaso.

Objetivo general.

- Determinar el efecto antiparasitario de una solución acuosa de taninos condensados a partir de un extracto de quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*), contra la infección controlada de *Haemonchus contortus* en ovinos.

Objetivos particulares.

- Conocer la concentración de taninos condensados de un extracto comercial de quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*).
- Evaluar la eficacia de esa solución acuosa contra los huevos y larvas de *H. contortus* mediante pruebas *in vitro* (ensayo de inhibición de la eclosión de huevos y evaluación de la motilidad de L₃) y establecer la dosis eficaz en contra del *H. contortus*.
- Conocer el efecto antihelmíntico de la solución acuosa con taninos condensados contra una infección controlada por *H. contortus* en ovinos, para conocer la dinámica de eliminación de huevos, cambios en el peso corporal, volumen del paquete celular, coloración de la mucosa conjuntival (sistema FAMACHA) y cantidad de nematodos presentes en el abomaso.

Materiales y métodos.

Localización.

El presente estudio se realizó en las instalaciones de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. Las pruebas analíticas se llevaron a cabo en el *Laboratorio de Desarrollo de Métodos Analíticos* con el apoyo de la Dra. Gabriela Vargas, ubicado en Campo uno. Los ensayos *in vitro* se llevaron a cabo en el Laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM); la prueba controlada se llevó a cabo en el módulo de Posgrado perteneciente al Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA), ambos en Campo Cuatro.

Animales.

Los corderos de la prueba controlada provinieron de una unidad de producción que garantizaron estar libres de NGE. Se mantuvieron en confinamiento en condiciones que evitaron la adquisición de parásitos. Recibieron alimento balanceado para cubrir sus necesidades nutricionales y agua *ad libitum*.

Diseño experimental.

El trabajo consistió en cuatro experimentos:

1. Pruebas analíticas para determinar la concentración de taninos condensados contenidos en un extracto comercial de quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*).
2. Determinación de la eficacia de una solución acuosa de taninos condensados (SATC), contra las huevos y larvas de *H. contortus* mediante las pruebas *in vitro* de ensayo de eclosión de huevos (EHA) y evaluación de la motilidad de L₃.
3. Evaluación de la eficacia antihelmíntica de una SATC, a las 24 horas post inoculación sobre la evaluación de la dinámica en la eliminación de huevos, cambios en el peso corporal, condición corporal, volumen del paquete celular, coloración de la mucosa conjuntival (sistema FAMACHA) y carga parasitaria en corderos infectados artificialmente con *H. contortus*.

4. Evaluación de la eficacia antihelmíntica de una SATC, al día 36 post inoculación sobre la evaluación de la dinámica en la eliminación de huevos, cambios en el peso corporal, condición corporal, volumen del paquete celular, coloración de la mucosa conjuntival (sistema FAMACHA) y carga parasitaria en corderos infectados artificialmente con *H. contortus*.

Experimento 1.

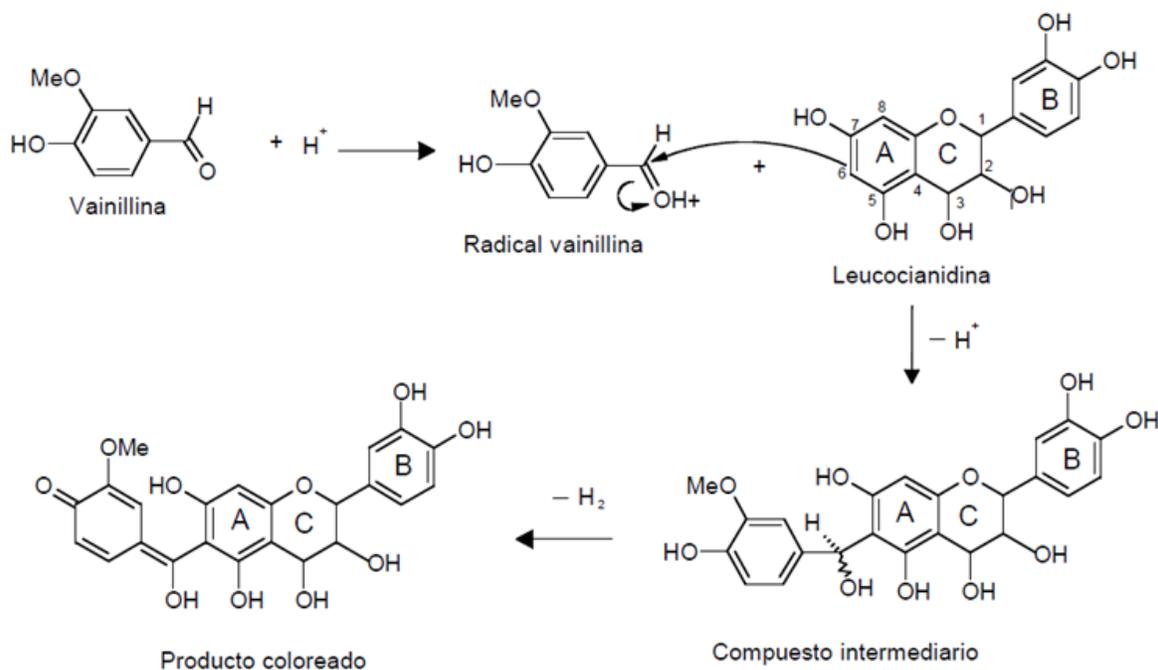
Materiales y métodos.

El método de la vainillina se usa ampliamente para la cuantificación de proantocianidinas (taninos condensados) en frutas y granos. El ensayo de la vainillina es específico para flavan-3-ol, dihidrochalconas y proantocianinas, las cuales tienen un enlace simple en la posición 2,3 y poseen grupos hidroxilos en la posición meta del anillo B. La catequina es un flavan-3-ol monomérico frecuentemente usado como un estándar en el ensayo de la vainillina. El etanol, disolvente usado para el ensayo de la vainillina, puede afectar la cinética de reacción de la catequina y taninos con vainillina diferencialmente. El ensayo de la vainillina en etanol es más sensible para los taninos poliméricos que para los flavan-3-oles monoméricos. Este ensayo es generalmente reconocido como un método útil para la detección y cuantificación de taninos condensados en plantas debido a su sensibilidad, especificidad y simplicidad. Sin embargo, debe ser considerada la posibilidad de interferencias con dihidrochalconas y antocianinas. El método se puede usar para cuantificar taninos condensados en un intervalo de 5-500 μg con precisión y exactitud mayores a 1 μg cuando la concentración óptima de reactantes y disolventes son elegidos (Shahidi y Naczki, 1995).

Este método se basa en la condensación de la vainillina con proantocianinas en una solución acidificada. La vainillina protonada, un electrofílo débil, reacciona con el anillo del flavonoide en la posición 6 u 8. El producto de esta reacción se deshidrata fácilmente para dar un color rosa ligero a un intenso rojo cereza.

La estabilidad del color del aducto vainillinatanino puede incrementarse cuando la luz es excluida y la temperatura de reacción es controlada y entonces se obtienen resultados exactos y reproducibles (Shahidi y Naczki, 1995).

Figura 2. Esquema de la asociación de la vainillina con proantocianidinas.



Extracto de quebracho (*Schinopsis balansae/lorentzii*).

Se utilizó el producto comercial MSD-S, un extracto de madera de quebracho colorado (*Schinopsis balansae/lorentzii*), comercializado como aditivo para la alimentación en rumiantes por la empresa Unitán SAICA de Buenos Aires, Argentina.

Determinación de taninos condensados (Shahidi y Naczk, 1995, modificado Martínez-Vásquez, 2007).

Se realizó la prueba de espectrofotómetro de doble haz, para determinar la absorbancia de las muestras del polvo de taninos condensados contenidos en el extracto comercial de quebracho.

Materiales y métodos para la determinación de taninos condensados

Equipo

- Espectrofotómetro de doble haz, Perkin Elmer.

Reactivos

- Vainillina (Vanillin), pureza 99%, Aldrich.
- (+)-Catequina hidratada, pureza 98%, Sigma.
- Etanol, grado reactivo.
- Ácido clorhídrico, pureza 36.5-38%, J.T. Baker.

Soluciones

Stock de Catequina: Se pesó lo equivalente a 10 mg del estándar de (+)-catequina hidratada (98% de pureza, Sigma), se disolvió y aforó con etanol (grado reactivo), para así tener una solución stock de 1.0 mg/ml de catequina.

Solución de Vainillina-ácida:

Para la preparación de la solución de vainillina al 1% en etanol se realizaron los siguientes pasos; Se pesó 0.5 g de vainillina (99% de pureza, Aldrich), y se llevan a 50 ml con etanol, después se guardó la solución en un recipiente oscuro a 0°C.

Al mismo tiempo se preparó una solución de HCl al 10% en etanol siguiendo los siguientes pasos; se tomó 5 ml de ácido clorhídrico concentrado (pureza 36.5-38%, J.T. Baker), y se completó con metanol hasta 50 ml.

Al momento de la determinación, se mezcló:

5 ml de la solución vainillina) + 5 ml de la solución HCL) = Solución vainillina ácida.

Curva de Calibración:

Se prepararon las diluciones para la curva de calibración en el orden numérico que a continuación se describen:

Cuadro No.1 Diluciones ordenadas.

V Stock Catequina (ml)	V MeOH (ml)	Sumergir en Baño a 30 oC	V vainillina-acida (ml)	Tiempo en Baño a 30 oC
0	1	atemperar	1	20 min
0.2	0.8			
0.4	0.6			
0.6	0.4			
0.8	0.2			
1	0			

A cada uno de los 6 tubos se agregó el stock de catequina y el etanol, se sumergieron en un baño de agua a 30°C, para atemperarlos y cubrirlos de la luz, posteriormente se les adicionó 1 ml de la solución de vainillina ácida, se agitó y los tubos se dejaron en el baño maría a 30°C, por 20 minutos, cubriéndolos de la luz.



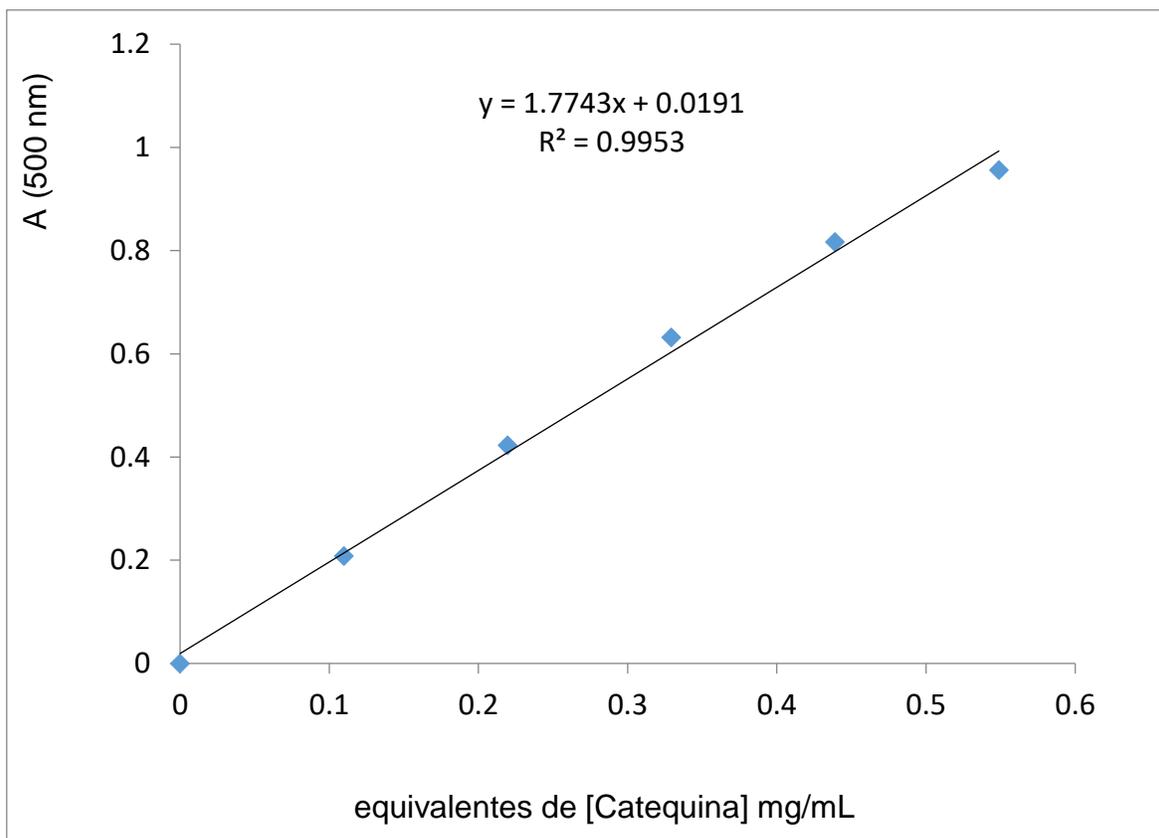
Figura 3. Tubos con la solución final, a los cuales se les midió la absorbancia.

Finalmente, se midió la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro de doble haz de luz (Perkin Elmer ®), de cada uno de los tubos y se realizó el cuadro 2, obteniendo la gráfica de la curva de calibración (Fig. 1).

Cuadro No.2 Datos de la absorbancia para la curva de calibración.

[Catequina] mg/ml	A (500 nm)
0	0
0.10976	0.208
0.21952	0.423
0.32928	0.632
0.43904	0.817
0.5488	0.956

Figura 4. Curva de calibración.



Preparación de la muestra (se realizó por triplicado).

A 0.1 ml del extracto de planta se agregó 0.9 ml de etanol y atemperó en el baño a 30°C, se agregó 1 ml de reactivo de vainillina-ácida y se agitó, después los tubos se dejaron en el baño maría a 30°C, por 20 minutos, cubriéndolos de la luz y finalmente se midió la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro de doble haz de luz.

Cuadro No. 3. Procedimiento aplicado para cada una de las muestras que a las que se les medirá la absorbancia.

V extracto vegetal (ml)	V MeOH (ml)	Sumergir en Baño a 30°C	V vainillina-ácida (ml)	Tiempo en Baño a 30°C
0.1	0.9	atemperar	1	20 min
0.1	0.9		1	20 min
0.1	0.9		1	20 min
0.1 agua (Blanco)	0.9		1	20 min

La concentración del extracto problema, se calculó con base en la interpolación en la curva de calibración y se expresó como mg equivalentes de (+)-catequina/ml de extracto.

Preparación del extracto de planta

En tubos de polisulfona con tapa, se pesó 1 mg de muestra vegetal (extracto de taninos) y se agregó 5 ml de disolvente (agua con 1% de etanol). Se colocó en el sonicador por 15 minutos y se calentó a 90°C por 2 horas, se agitaron las soluciones cada 30 minutos y posteriormente se enfriaron las muestras con hielo y se centrifugaron a 10,000 rpm. Se realizaron tres repeticiones para cada uno de los métodos de extracción Se midió la absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro de doble haz de luz (Perkin Elmer ®), de cada uno de los tubos que contenían el extracto de quebracho.

Resultados.

Cuadro 4. Porcentaje contenido de taninos condensados en cada muestra.

Muestra	Disolvente	g TC/Kg	DSM
ATO	100% agua	215.6 a	6.8
ATO	1% etanol	250.6 a	47.5
MGM	100% agua	104.4 ab	9.9
MGM	1% etanol	113.2 ab	4.4

En promedio se observó mayor concentración de TC en la muestra ATO que la muestra MGM (ATO 233.11 gTC/Kg y MGM 108.79 gTC/Kg respectivamente).

Existió diferencia significativa ($P < 0.05$) entre las muestras de ATO y de MGM, pero entre ellas no se observó diferencia significativa ($P > 0.05$).

Discusión

A pesar de que la muestra ATO resultó tener mayor cantidad de TC, se decidió utilizar la muestra MGM para la prueba *in vivo*, ya que de acuerdo con la compañía que lo produce, este es el específico para rumiantes y no se utilizó ATO por si llegase a contener algún metabolito que nos pudiera afectar de alguna manera en las pruebas y el MGM es solamente extracto de quebracho. Dicho esto, se utilizó la muestra MGM en el experimento de la infección controlada.

Se decidió utilizar la muestra MGM usando como diluyente agua al 1% de etanol, ya que, en comparación, este presentó una mayor cantidad de TC.

Experimento II: Evaluación de la eficacia de la solución acuosa de taninos en la inhibición de la eclosión de huevos y evaluación de la motilidad de L₃ de *Haemonchus contortus*.

Material y métodos.

Pruebas *in vitro*.

Se realizaron las pruebas descritas por Coles y col. (1992) para los ensayos de eclosión de huevos y migración larvaria (anexos 1 y 2).

Larvas y huevos de *Haemonchus contortus*.

Se utilizó la cepa de *H. contortus* perteneciente a la FES Cuautitlán, UNAM. (Valdez 2006) Los huevos del parásito fueron obtenidos por vía rectal de dos corderos infectados experimentalmente, las larvas se obtuvieron por cultivo larvario según la técnica descrita por Niec (1968).

Ensayo de inhibición de la eclosión de huevos.

Se realizó este ensayo de acuerdo con la técnica descrita por Coles y col. (1992).

Se utilizó una placa de 96 pozos con tres repeticiones cada una, en los cuales se agregó 100 µl de la solución concentrada de huevos con 100 µl del tratamiento con la solución acuosa de taninos condensados (SATC), tanto de la muestra de ATO, como de MGM, los tratamientos con solución de taninos a 125 µg, 250 µg, 500 µg y 750 µg, albendazol 300 µg, agua al 1% de etanol y sólo huevos.

La metodología utilizada se puede apreciar a detalle en el anexo 1.

Ensayo de Motilidad de L₃.

Se utilizó la técnica descrita por Fumiyuki (1987) y Chávez-Güitron (2016), la cual fue modificada.

Se utilizaron placas de ELISA con 96 pozos, en los cuales se les agregó una cantidad conocida de larvas (alrededor de 200 L₃ por pozo); en placas separadas se administraron diferentes dosis de la SATC (125 µg, 250 µg, 500 µg y 750 µg), albendazol 300 µg y un grupo testigo (sin tratamiento), cada una con tres repeticiones, se incubaron a 28°C, resultando de la siguiente forma:

Cuadro 5. Ensayo de la motilidad de L₃.

Placa	Grupo	Dosis
1	Testigo	Ninguna
2	Albendazol	50 µg/100 µl
3	SATC	125 µg/100 µl
4		250 µg/100 µl
5		500 µg/100 µl
6		750 µg/100 µl

Se realizaron observaciones a las tres, seis, 24 y 48 horas, en las cuales se tomó una muestra de larvas (alrededor de 20) y se filmaron por un minuto, se les asignó una calificación dependiendo su motilidad.

Cuadro 6. Índice de movilidad de las L₃.

0	<i>Muertas</i>
1	<i>No se mueven, pero están vivas</i>
2	<i>Movimiento bajo</i>
3	<i>Movimiento medio</i>
4	<i>Movimiento alto</i>

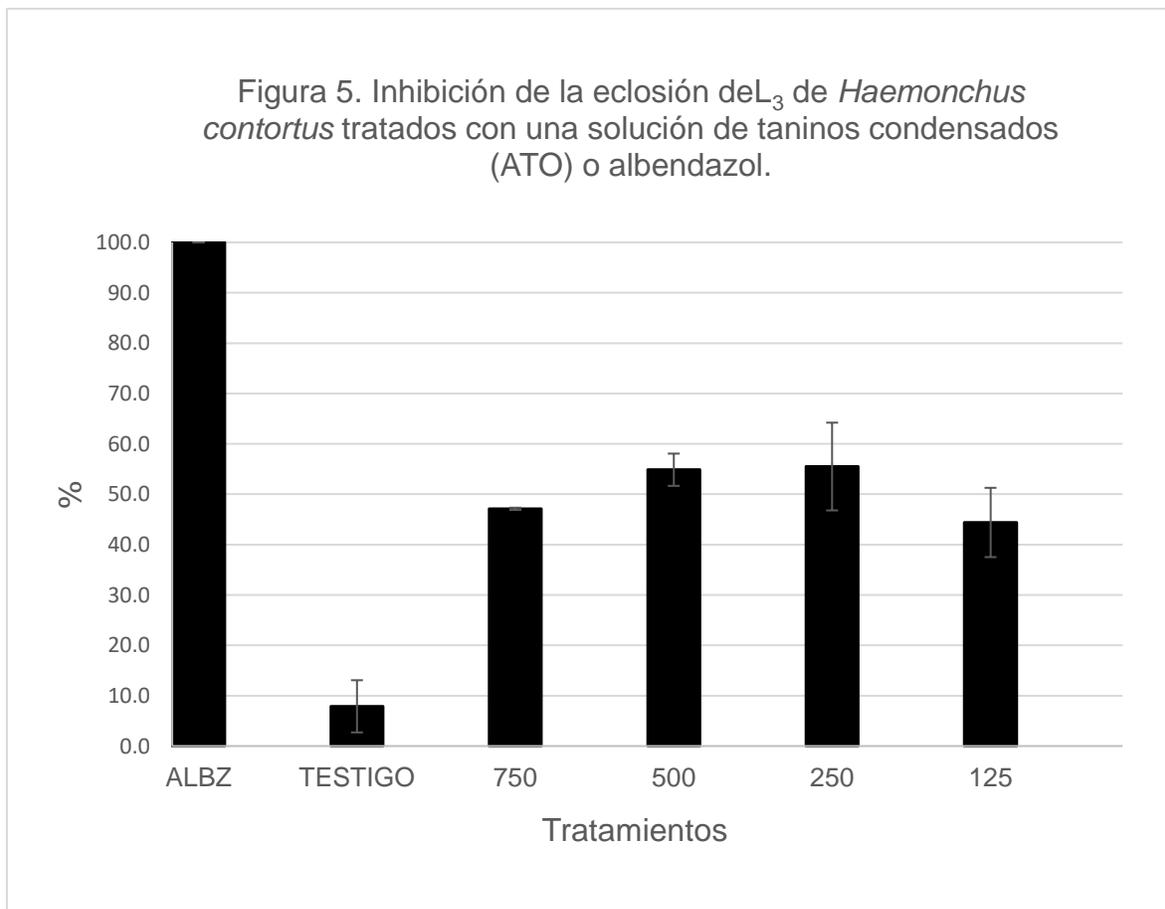
Resultados.

Ensayo de inhibición de la eclosión

A través del ensayo, el albendazol tuvo un efecto letal del 100%, mientras que para los grupos tratados con diferentes dosis de la SATC fue en promedio de 50.48%.

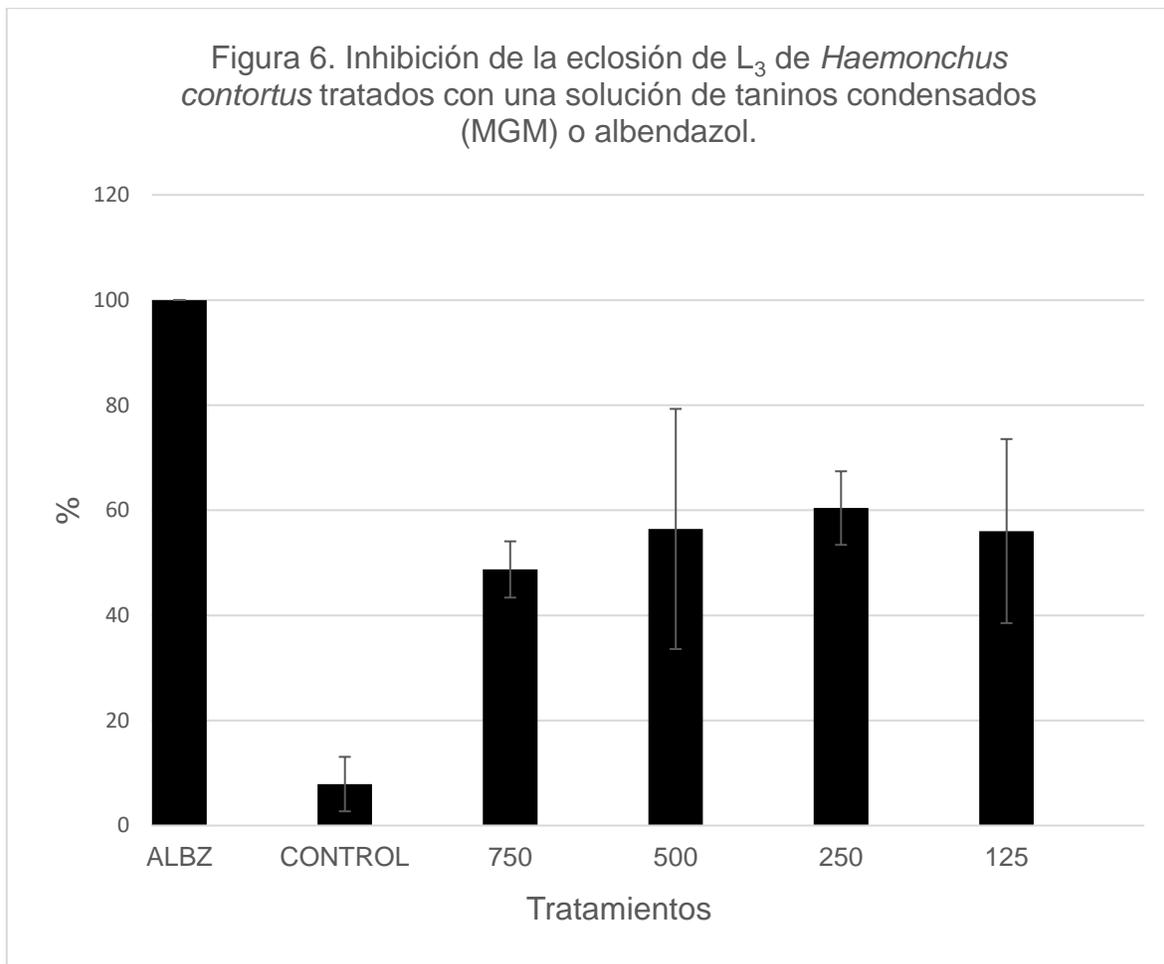
El porcentaje de inhibición de la eclosión para el albendazol fue de 100%, para el grupo testigo fue de 7.9% y se obtuvo una inhibición de la eclosión de 47.1%, 54.9%, 55.5% y de 44.4% para las diferentes dosis de 750 µg, 500 µg, 250 µg y 125 µg respectivamente de la SATC.

No existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las dosis de 750 µg 500 µg y 250 µg, así como entre las dosis de 125 µg con 750 µg.



El porcentaje de inhibición de la eclosión para el albendazol fue de 100%, para el grupo testigo fue de 7.9% y se obtuvo una inhibición de la eclosión de 48.7%, 56.4%, 60.4% y de 56% para las diferentes dosis de 750 µg, 500 µg, 250 µg y 125 µg respectivamente de la SATC.

No existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre las dosis de 750 µg, 500 µg, 250 µg y 125 µg,



Cabe mencionar que se observó un tipo de estructura muy peculiar, la cual estuvo presente en todos los pozos tratados con tanino, la cual no fue observada en el grupo testigo ni en el grupo tratado con albendazol.

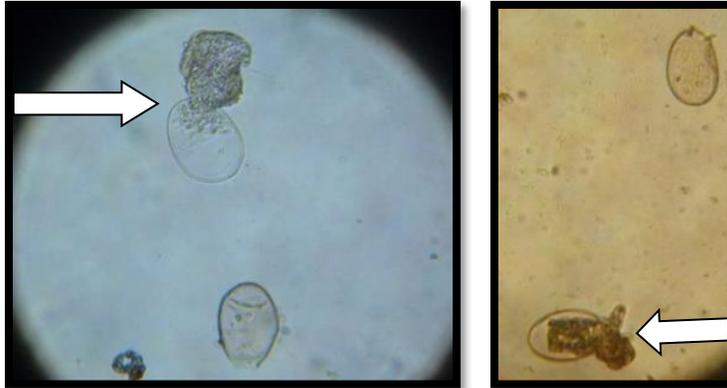


Figura 7 Estructuras encontradas en el ensayo de la inhibición de la eclosión.

Discusión.

Tanto para la muestra de ATO y MGM, se puede observar que no hay diferencia significativa ($P > 0.05$), entre los promedios de estos (ATO del 50.5% y de 55.4% para MGM), pero si la hay con el grupo de albendazol y el grupo testigo. Lo cual nos sugiere que en cualquiera de estas dosis se tiene una inhibición en la eclosión.

Los resultados presentados aquí pueden indicar que la SATC tiene la capacidad de interrumpir el ciclo de vida de los nematodos al prevenir el desarrollo de huevos en la etapa infectiva (L_3) y esto, a su vez, podría prevenir o reducir la contaminación de las granjas con los huevos viables. Aunque no se conocen los mecanismos por los cuales la SATC a diferentes concentraciones inactivan los huevos, se sospecha que los TC puedan inhibir las enzimas responsables del proceso de incubación de estos. La eclosión de los huevos de nematodos se inicia con estímulos ambientales que conducen a la liberación de las llamadas "enzimas de incubación" (Sommerville y Rogers 1987), que incluyen proteasas, lipasas, quitinasas, beta-glicosidasas y aminopeptidasas de leucina. Se ha demostrado que la inhibición de algunas de estas enzimas reduce la tasa de eclosión de los huevos o incluso detiene el proceso por completo (Rogers y Brooks, 1977). Se ha demostrado que los taninos condensados inhiben la actividad de las enzimas endógenas (Oh y Hoff 1986, Horigome y col., 1988).

La mayoría de los fármacos antihelmínticos pueden causar parálisis de la faringe en los nematodos (Grzywacz 1983, Avery y Horvitz 1990, Gill y col., 1995) y prevenir el bombeo faríngeo, lo que resulta en un esófago cerrado. Aunque es difícil de comparar entre los TC y los fármacos antihelmínticos, los TC pueden imitar esta acción.

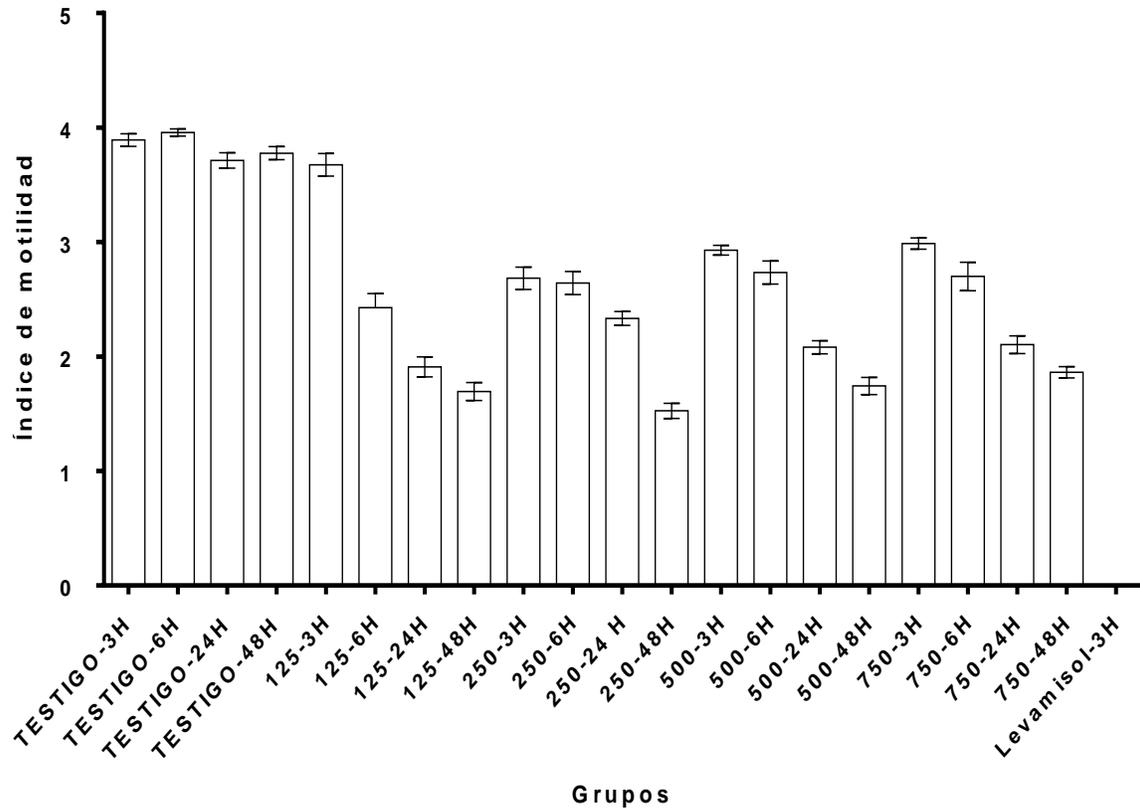
Estas posibilidades sugieren que los TC pueden potencialmente afectar a las larvas tanto externa como internamente Molan y col., (2000), verificaron la viabilidad de las larvas atrapadas (expuestas a TC extraídas de siete forrajes) de *T. colubriformis* que no podían pasar a través de los tamices y encontraron que 83-93% de las larvas estaban vivas pero sus movimientos eran lentos, sugiriendo cambios parciales de parálisis. Si los TC pueden causar parálisis en la musculatura del cuerpo (Molan y col., 2000), también podrían paralizar los músculos faríngeos.

Esto puede explicar la inhibición del desarrollo de larvas L₁ a L₃ y también el alto porcentaje de muerte entre las larvas L₁ nacidas de huevos tratados con TC.

Resultados de la evaluación de la motilidad de las L₃.

En el grupo de levamisol, desde la primera observación realizada a las tres horas, se encontraron las larvas muertas en su totalidad, en el grupo testigo se observó mayor motilidad de las L₃ a través del experimento (desde las tres hasta las 48 horas), en la dosis de la SATC más baja (125 µg/100 µl), se observó que a las tres horas no hubo diferencia significativa ($P > 0.05$), en comparación con el grupo testigo. En los demás grupos (250 µg/100 µl, 500 µg/100 µl y 750 µg/100 µl), a los cuales se les administró la SATC, hubo una diferencia significativa ($P < 0.05$), desde la primera observación a las tres horas en comparación con el grupo testigo, a partir de esta lectura, se observó similitudes entre todos los grupos que recibieron la SATC, ya que su disminución en la motilidad fue parecida conforme transcurría el tiempo del experimento (Fig. 8)

Figura No. 8. Motilidad de las L3 de *Haemonchus contortus* tratados con una solución de taninos condensados o albendazol a diferentes horas de exposición.



Discusión

La disminución en el movimiento de las L3 va en aumento conforme avanza el tiempo de exposición a la SATC, resultando en un aletargamiento de las L3, el cual se presume es inducido por la acción de los taninos, ya que los polifenoles tienen la capacidad de ligarse a la proteína y en este caso, la cutícula de las larvas es rica en glicoproteína (Athanasiadou y col., 2001).

Con base a los resultados obtenidos, se decidió utilizar la dosis de 250 µg/100 µl en la infección controlada, ya que no existió diferencia significativa ($P > 0.05$), a las 48 horas entre las dosis de 500 µg/100 µl y 750 µg/100 µl.

Experimento III y IV: Evaluación de la eficacia de la solución acuosa de taninos en una infección controlada por *Haemonchus contortus*.

Materiales y métodos.

Ubicación.

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Investigación Multidisciplinaria (UIM), así como en el Centro de Enseñanza Agropecuaria (CEA), ambos de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán Campo cuatro, UNAM y fue financiado con fondos del proyecto PAPIIT: 28-IN2262-17.

Animales.

Se utilizaron 20 corderos machos cruza Hampshire con Dorset entre seis y ocho meses de edad, identificados con arete metálico, los cuales procedían de una unidad de producción pecuaria dedicada a la engorda de animales, lo cual garantizó su homogeneidad, uno de estos corderos sirvió para mantener la cepa de *H. contortus* con la cual se trabajó.

Todos los corderos se mantuvieron en confinamiento total, se alojaron en cinco corrales de 9 m² (c/u), con piso de cemento y cerca de malla ciclónica. La alimentación consistió en alimento balanceado comercial para ovinos con 15% de proteína cruda, así como alfalfa achicalada y zacate de maíz, en una proporción 20% de alimento comercial, 70% de alfalfa achicalada y 10% de zacate de maíz.

El alimento se ofreció diariamente en cantidad del 4% del peso de cada grupo de corderos, el agua se ofreció *ad libitum* con bebederos tipo tina, los cuales se lavaban diario y se rellenaban con agua fresca.

Los corderos a su llegada se encontraban clínicamente sanos, no recibieron tratamiento previo ya que fueron negativos a NGE cabe mencionar que los corderos tuvieron un periodo de adaptación de tres semanas.

El cordero que contenía la cepa se mantuvo en un corral individual aislado de otros animales, la alimentación que recibió fue la misma que los demás corderos, el agua se ofreció *ad libitum* en bebedero automático de pivote.

Preparación y administración de la solución acuosa de taninos condensados.

Se utilizó el producto comercial MSD-S, un extracto de madera de quebracho colorado (*Schinopsis balansae/lorentzii*), comercializado como aditivo para la alimentación en rumiantes por la empresa Unitán SAICA de Buenos Aires, Argentina.

Para la preparación de la solución acuosa de taninos condensados (SATC) se siguieron las recomendaciones de Shahidi y Naczk (1995), modificado por Martínez-Vásquez (2007):

- ✓ Se pesaron 22.1 g de polvo de quebracho por cada uno de los corderos a tratar.
- ✓ Posteriormente cada dosis se disolvió con 495 ml de agua destilada con 1% de etanol (5 ml), y se homogenizó.
- ✓ La solución se colocó en baño María a 90° C durante dos horas.
- ✓ Cada 30 minutos se monitoreó la temperatura y se homogenizó la solución.
- ✓ Una vez transcurrido el tiempo se dejó enfriar a temperatura ambiente.

Modelos experimentales

Se realizaron dos modelos:

1. En el primer modelo se evaluó el efecto de una solución acuosa de taninos condensados contra el establecimiento de la infección de L₃ de *H. contortus* en ovinos.
2. En el segundo modelo se evaluó la eficacia de una solución acuosa de taninos condensados contra la infección ya establecida (adultos), de *H. contortus* en ovinos.

Se dividieron aleatoriamente en cuatro grupos con cuatro corderos cada uno, y el grupo testigo con tres corderos, quedando de la siguiente forma:

Modelo 1.

- Grupo 1 (GTC): Administración de la SATC por cinco días (iniciándose 24 horas post inoculación).
- Grupo 2 (GL): Administración de levamisol, 7.5 mg/kg (dosis única).

Modelo 2.

- Grupo 1 (GTC): Administración de la SATC por cinco días (a partir del día 36 post inoculación).
- Grupo 2 (GL): Administración de levamisol, 7.5mg /kg (dosis única).

El quinto grupo sirvió como el testigo (GT), para ambos modelos.

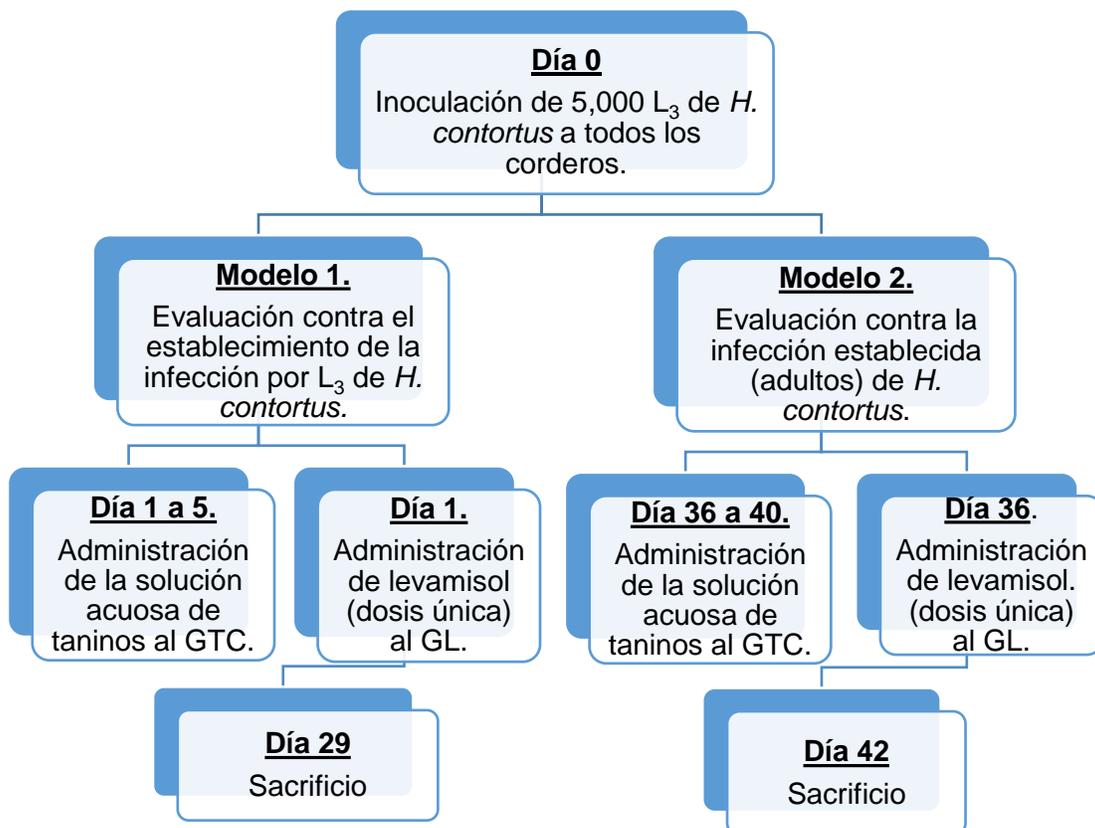


Figura No.9 Metodología llevada a cabo de la infección experimental controlada.

Inoculación de L₃ de *Haemonchus contortus*.

Se utilizaron L₃ de una cepa monoespecífica de *H. contortus* que fue aislada a partir de un rebaño ovino comercial del municipio de Jilotepec, Estado de México, la cual ha sido mantenida por pases sucesivos en corderos criados en estabulación total en la FES Cuautitlán.

Para la obtención de las L₃ se inoculó a un cordero libre de NGE, se le administraron 5,000 L₃ mediante sondeo esofágico-ruminal. Se realizó un seguimiento mediante exámenes coproparasitológicos, y una vez que el cordero eliminó elevadas cantidades de huevos (alrededor de 4,000 hgh), se le colocó un calzón colector para recuperación de las heces, con las cuales se realizaron cultivos larvarios mediante la técnica modificada de Corticelli Lai, la cual consiste en colocar una muestra positiva a *H. contortus* del cordero donador, dentro de una caja Petri de 10 cm de diámetro, a su vez fue colocada dentro de otra caja Petri de 15 cm de diámetro con un poco de agua, a ésta última se le colocó su tapa y se colocó en la incubadora a 28 °C durante siete días, las cajas se revisaron diariamente para monitorear el nivel de agua y evitar la deshidratación.

Después de los siete días se revisó con un microscopio estereoscópico el agua contenida en la caja de Petri grande para verificar la presencia de larvas, se homogeneizó y se obtuvo 100 µl de la muestra y se revisó al microscopio y se cuantificó el número de L₃ contenidas, este procedimiento se realizó por triplicado para sacar el promedio de larvas contenidas en 100 µl. Una vez obtenido este dato se multiplica por la cantidad de agua total obtenida (Cuenca y Cuenca 2005).

De esta forma se calculó la cantidad de muestra necesaria para elaborar inóculos individuales con 5000 L₃.

Solución acuosa de taninos condensados (SATC).

Fue administrado 500 ml de solución acuosa a una dosis de 250 µg/100 µl, dando como resultado utilizar 22.1 g del polvo de taninos.

Se decidió utilizar la dosis de 250 µg/100 µl, ya que en la infección controlada no existió diferencia significativa ($P > 0.05$), a las 48 horas entre las dosis de 500 µg/100

µl y 750 µg/100 µl en la prueba de movilidad de las L₃ de *H. contortus* tratadas con la SATC.

El día 1 se inició la administración de la SATC por sondeo esofágico-ruminal al GTC a razón de 22.1 g por animal; este procedimiento se llevó a cabo por cinco días consecutivos posteriores a la inoculación de las larvas.

Tratamiento antihelmíntico comercial.

En los corderos del grupo GL se utilizó levamisol comercial (Ripercol L® del laboratorio Zoetis), se administró por vía subcutánea en la axila a una dosis única de 7.5 mg/kg de peso corporal.

Administración de la SATC y levamisol.

Cada uno de los grupos recibió el siguiente tratamiento:

Modelo 1:

- Grupo tanino condensado (GTC): Se administró una solución acuosa de extracto de quebracho conteniendo taninos condensados a una dosis de 22.1 g en 500 ml, a partir del día 1 hasta el día 5.
- Grupo levamisol (GL): Se le administró levamisol a una dosis de 7.5mg/kg (dosis única), en el día 1.

Modelo 2:

- Grupo tanino condensado (GTC): Se administró una solución acuosa de extracto de quebracho conteniendo taninos condensados a una dosis de 22.1 g en 500 ml a partir del día 36 hasta el día 40.
- Grupo levamisol (GL): Se le administró levamisol a una dosis de 7.5mg/kg (dosis única), en el día 36.

Recolección de muestras.

Conteo de huevos.

El muestreo de la materia fecal se realizó semanalmente desde el día 0, hasta el día de la eutanasia. Las heces fueron colectadas directamente del recto utilizando bolsas de polietileno e identificadas individualmente con el número del cordero, se mantuvieron y transportaron en refrigeración, posteriormente fueron analizadas mediante la técnica de Mc Master modificada (Alba, 2007), para monitorear y cuantificar la eliminación de huevos en las heces. Los resultados fueron expresados como número de huevos por gramo de heces (hgh).

Sangre.

Semanalmente desde el día 0 hasta el día de la eutanasia. Se realizó en ayuno y se obtuvieron muestras de sangre (2 ml), por medio de venopunción yugular, se utilizaron tubos al vacío con EDTA como anticoagulante, los cuales se trasladaron al laboratorio el mismo día en refrigeración.

La sangre se procesó por medio de la técnica de micro hematocrito descrita por González y Villegas (2006), para cuantificar el volumen del paquete celular (VPC).

Registro del peso vivo.

El peso fue medido semanalmente desde el día 0 hasta el día de la eutanasia. Esto fue para evaluar la ganancia de peso durante el experimental, se realizó mediante el uso de una báscula (dinamómetro) de 150 kg de capacidad con un nivel de medición de un kg.

Condición corporal

La estimación de la condición corporal (C.C) de cada uno de los animales se efectuó semanalmente desde el día 0 hasta el día de la eutanasia. Se realizó por tacto directo en las vértebras sacras (apófisis transversa y apófisis espinosa), así como en el área muscular del ojo del lomo, basado en una escala que va de 0 a 5

dependiendo de la cantidad de grasa y músculo que contengan las estructuras mencionadas. (Russel, 1979).

Índice del sistema FAMACHA.

El grado de anemia de cada uno de los corderos fue evaluado a través de la asignación del índice correspondiente de acuerdo con la tarjeta del sistema FAMACHA, este fue medido semanalmente desde el día 0 hasta el día de eutanasia. Para este procedimiento fue tomado en cuenta el color de la mucosa conjuntival. La aplicación de este se realizó de acuerdo con las recomendaciones expuestas en el folleto informativo de la tarjeta FAMACHA, elaborada por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Pretoria, el Instituto Veterinario de Onderstepoort y la Asociación Veterinaria Sudafricana (Bath, 2004).

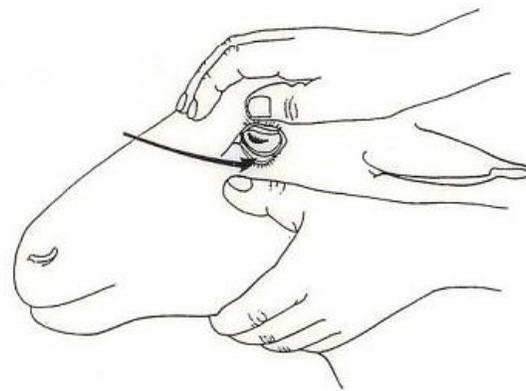
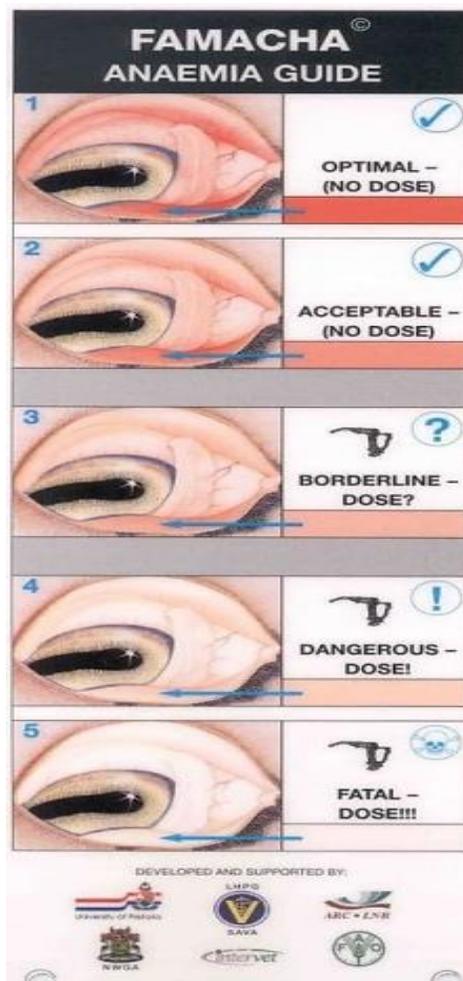


Figura 10. Sistema FAMACHA

Sacrificio

Se realizó el sacrificio de los corderos mediante la NOM-033-SAG/ZOO-2014, *Métodos para dar muerte a los animales domésticos y silvestres*, se obtuvo el abomaso de cada uno de los corderos y se ligó de ambos extremos y se separó (González et al., 2011), estos fueron identificados en el lugar de sacrificio y posteriormente se llevaron al Laboratorio 3 de la UIM de la FES Cuautitlán donde se realizaron los conteos posteriores.

Recolección y conteo de nematodos adultos.

De cada animal se obtuvo y aisló el abomaso, se extrajo después de colocar una ligadura en cardias y píloro. Posteriormente, se colocaron en una bolsa de plástico identificándola con el número del animal, se transportaron en una hielera para su revisión en el laboratorio de acuerdo con el siguiente procedimiento:

- ✓ Se retiró la ligadura en cardias y se vertió su contenido en un contenedor de plástico; posteriormente se lavó tres veces con agua corriente, vaciando el producto del lavado en el mismo contenedor.
- ✓ El abomaso se incidió por su curvatura menor y se colectaron los parásitos que continuaban adheridos a su mucosa, éstos eran colocados en el contenido previamente colectado.
- ✓ El contenido colectado se vertió en un recipiente de plástico y se aforó con agua corriente hasta completar dos litros y se adicionó formol al 10%.
- ✓ Se tomó el 20% del total de volumen de contenido abomasal para recolectar los parásitos.
- ✓ Se identificaron y contaron los parásitos adultos. Los parásitos cuantificados en ese volumen se multiplicaron por cinco para conocer el total de parásitos presentes en cada abomaso.

Análisis estadístico.

Se realizó la prueba de ANOVA de STATGRAPHICS® para las variables:

- Cantidad de huevos por gramos en heces.
- Peso de los animales.
- Condición corporal.
- Coloración de la mucosa conjuntival (FAMACHA).
- Porcentaje del volumen del paquete celular.
- Cantidad de nematodos adultos recolectados.

De esta manera:

$H_0 = \mu_1 = \mu_2 = \mu_3$ (No hay diferencia entre los tratamientos)

$H_1 = \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3$ (Al menos uno de los tratamientos es diferente)

Donde μ_1 es el grupo Taninos (GTC); μ_2 es el grupo Levamisol (GL); μ_3 es el grupo testigo (GT).

Nota ética.

El manejo de los corderos se realizó conforme a los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (CICUAE-FMVZ-UNAM) (Protocolo No. C 17_03).

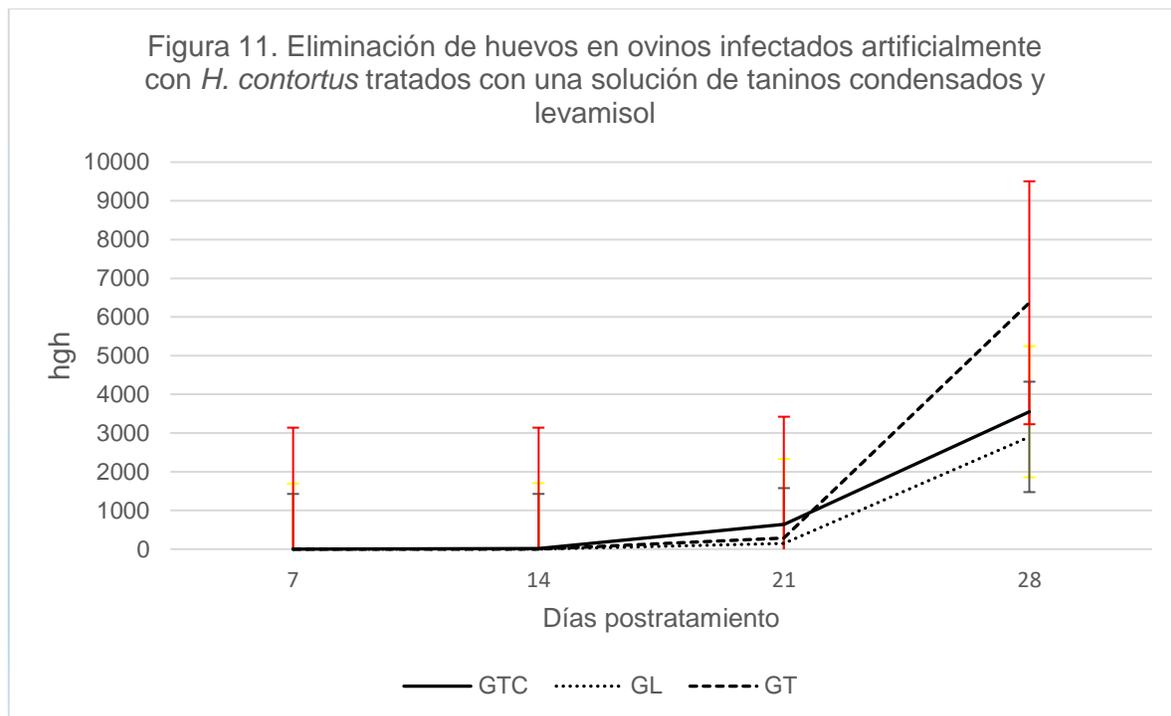
Resultados modelo experimental 1.

Eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* en las heces.

El inicio de la excreción de huevos de *H. contortus* inició en el día 14 días post inoculación para el grupo GTC, GL y GT inició la eliminación en el día 21.

A los 28 días la eliminación de huevos promedio se incrementó, llegando a 3,550 hgh en el GTC, 2,900 hgh en el GL y en el GT 6,366.7 hgh. Un animal del GL no excretó huevos durante todas las evaluaciones.

En la eliminación individual; un animal del GTC inició la excreción de huevos a los 14 días postratamiento con 50 hgh. Dos animales del mismo grupo y otro del GL iniciaron la eliminación hasta el día 28 y todos los corderos del GT eliminaron huevos de *H. contortus* a partir de los 21 días post infección.

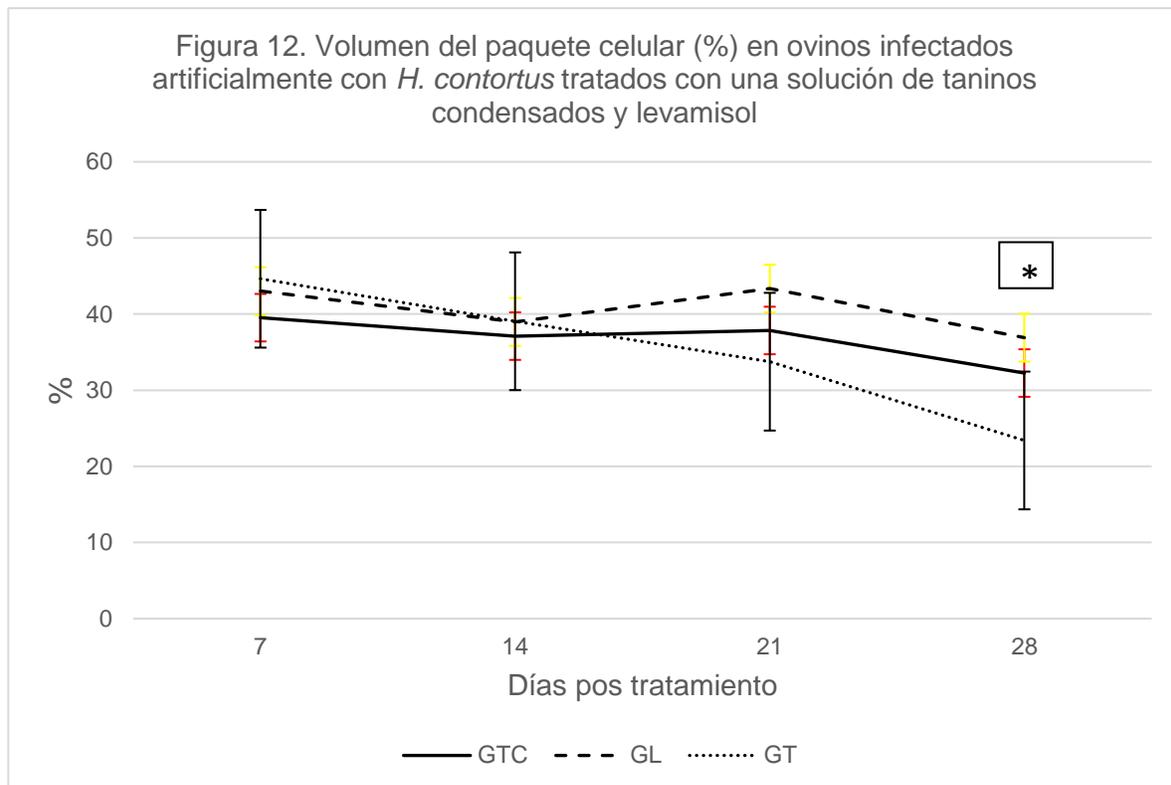


Cuando se transformaron logarítmicamente ($\log_{10} \text{hgh} + 10$) los datos de eliminación de huevos para estabilizar la varianza y analizarlos estadísticamente, no se detectaron diferencias significativas ($P > 0.05$) entre los tres grupos.

Volumen del Paquete Celular.

Al inicio de la prueba los tres grupos en promedio tenían 47.47% de VPC, al final de esta se obtuvo en promedio 30.85%, en comparación con los datos iniciales, hubo una baja en los grupos, pero aún dentro de los parámetros normales (27-45%) para los ovinos.

El en GT al final del experimento descendió hasta 23.40%, esto coincidió con la eliminación elevada de hgh que se presentó para el día 28, en donde se observó diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el GL y el GT.



Peso corporal.

Se inició el experimental con un peso en promedio de 26.1 kg, 27 kg y 22.2 kg respectivamente para cada grupo, para el día 28 los pesos fueron de 27.7 kg en el grupo GTC, 27.3 kg en el GL y 24.3 kg para el GT.

Las ganancias de peso fueron modestas, siendo de 1.5 kg, .2 kg y de 2.1 kg respectivamente para GTC, GL y GT, siendo estadísticamente similares GTC y GT ($P > 0.05$).

La mejor ganancia de peso se observó en los corderos del GT (75 g), siguiéndole el GTC (53.6 g); el peor desempeño fue para el GL con 7.1 g, en donde existió diferencia significativa ($P < 0.05$) con el GTC y GT.

Cuadro 7. Peso corporal (kg) en ovinos infectados artificialmente con *Haemonchus contortus*, tratados con una solución de taninos condensados o levamisol.

	Días postratamiento					GTP (kg)	GDP (g)
	0	7	14	21	28		
GTC	26.2	26.4	26.3	26.6	27.7	1.5 a	53.6
GL	27.1	27.7	27.2	27.0	27.3	0.2 b	7.1
GT	22.2	23.2	23.3	22.8	24.3	2.1 a	75.0

GTC: Tratamiento con solución acuosa de taninos condensados; GL: Tratamiento con levamisol; GT: Testigo, sin tratamiento. GTP: Ganancia total de peso; GDP: Ganancia diaria de peso.

Condición corporal.

A lo largo del experimento, la condición corporal de los tres grupos evaluados tuvo un comportamiento muy estable, los corderos del GTC iniciaron con un promedio de 1.8 y los grupos GL y GT de 2.0 (cuadro 11); posteriormente se presentaron pequeñas variaciones y se finalizó con un índice promedio de 1.8 para los GTC y GL y 1.7 para el GT. Cabe mencionar que no existieron diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) entre los tres grupos en ninguna de las evaluaciones realizadas.

Cuadro 8. Índice de la condición corporal en ovinos infectados artificialmente con *Haemonchus contortus*, tratados con una solución de taninos condensados o levamisol.

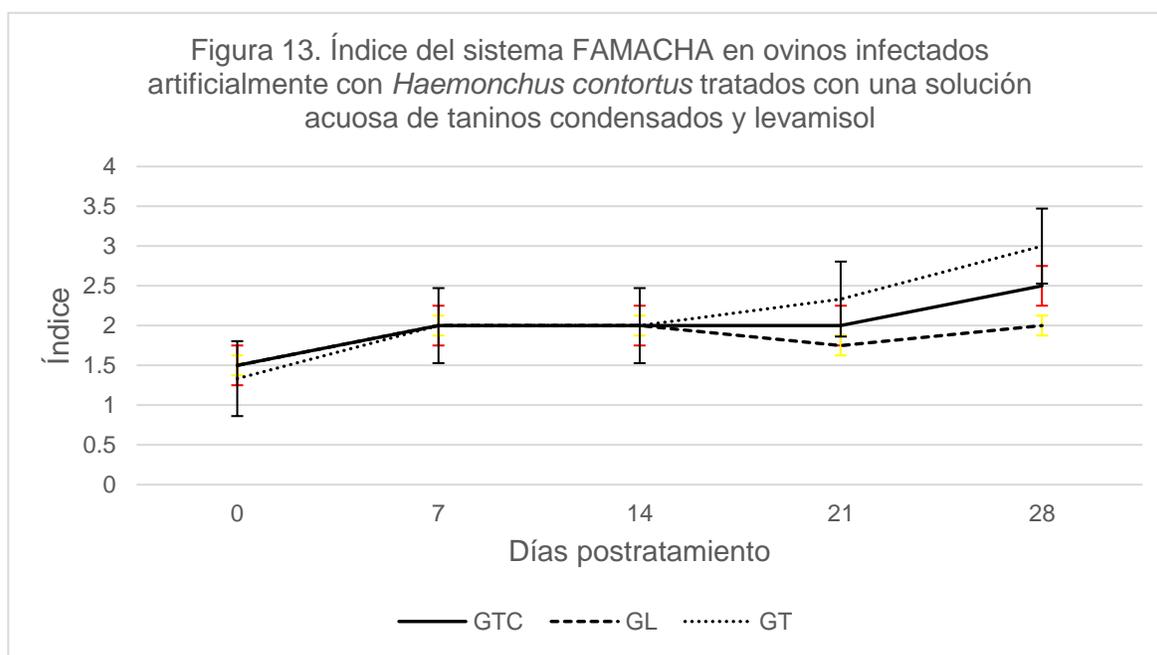
	Días postratamiento				
	0	7	14	21	28
GT	1.8	1.9	1.5	1.8	1.8
GL	2.0	1.8	1.6	1.8	1.8
GT	2.0	1.7	2.2	1.5	1.7

GTC: Tratamiento con solución acuosa de taninos condensados; GL Tratamiento con levamisol;
GT: Testigo, sin tratamiento.

FAMACHA.

Desde el día 0 hasta el día 14 no se observaron variaciones importantes entre los grupos, la diferencia se amplió para el día 28, el grupo que no recibió tratamiento fue el más afectado, ya que llegó a la escala de tres en el sistema FAMACHA, esto correlacionado con la gráfica de VPC y los resultados obtenidos para el GT, el cual fue de 23.40%.

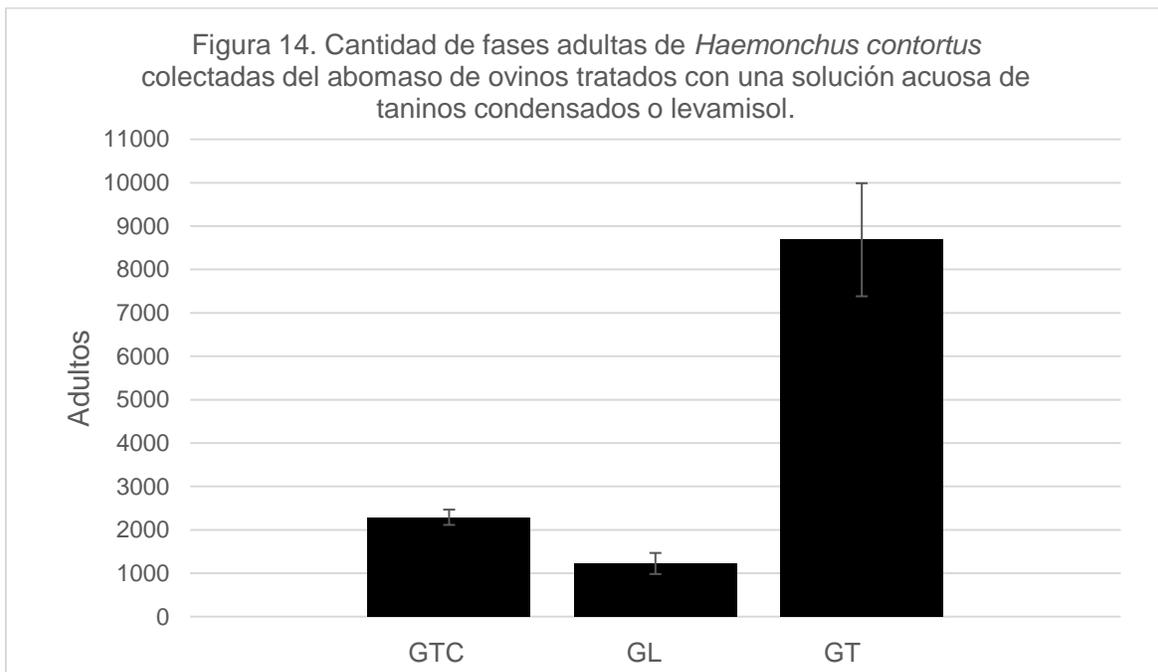
Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los grupos a lo largo del experimento ($P > 0.05$), solamente en el día 28 hubo diferencia ($P < 0.05$) de GT con el GL.



GTC: Tratamiento con solución acuosa de taninos condensados; GL: Tratamiento con levamisol;
GT: Testigo, sin tratamiento.

Número de parásitos adultos.

Tras haber realizado el sacrificio, se recolectaron las fases adultas de *H. contortus* y después de 27 días de administrados los tratamientos se obtuvo que en el grupo de levamisol se recuperó la menor cantidad de adultos, (1,225), siguiendo el grupo tratado con la SATC (2,290) y, por último, el grupo sin tratamiento, en el cual se obtuvo la mayor cantidad recuperada de fases adultas con 8,685 parásitos totales (fig14).



GTC: Tratamiento con solución acuosa de taninos condensados; GL: Tratamiento con levamisol;
GT: Testigo, sin tratamiento.

En el caso de los corderos del GTC, el rango del conteo de adultos fue de 355 a 765 parásitos. En el GL, un animal no tuvo al nematodo y de los positivos, el rango osciló entre los 225 y 475. Para el grupo GT, se colectaron entre 1,400 y 3,790 fases adultas. No existió diferencia significativa ($P > 0.05$) entre los grupos GTC y GL, pero si la hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) entre el GT y el GTC y GL.

Discusión

Los cambios observados en el VPC, puede ser debido a que los animales se encontraban en un franco estado de susceptibilidad, pues es muy probable que la parasitosis haya inducido el decremento de los niveles del VPC, ya que, como es conocido *el H. contortus* produce un estado de anemia por su efecto hematófago y por la pérdida de sangre en la lesión ocasionada en la mucosa abomasal (Coop y Kyriazakis, 1999; Meana y Rojo 1999).

Se observó una disminución de nematodos en el grupo tratado con la SATC, lo que nos sugiere que existió un efecto sobre la población establecida en el abomaso de los corderos. Este cambio se ha relacionado ya sea con una reducción en el número del gusano (Paolini y col., 2003a, b, 2005b; Heckendorn y col., 2006, 2007; Terrill y col., 2007, 2009) y/o a una fertilidad reducida por gusano hembra cuando este parámetro fue medido (Lange y col., 2006; Heckendorn y col., 2007; Manolaraki y col., 2010; Martínez-Ortíz-de-Montellano y col., 2010;). Una serie de informes han descrito la acción de los taninos. y polifenoles contra larvas infecciosas de la tercera etapa (Brunet y col., 2006, 2007, 2008a, b, 2011).

Cuando el forraje rico en taninos se consumió junto con la infección de los animales experimentales con larvas de tercer estadio (L₃), la tasa de establecimiento de estas fases infecciosas disminuyó significativamente (Paolini y col., 2003b, Paolini y col., 2003c, Paolini y col., 2005a, Brunet y col., 2008b). Esto dio como resultado un nivel reducido de infección del huésped en comparación con los controles. Además, un estudio realizado en ovejas canuladas en el rumen que consumen diferentes niveles de sainfoin, ha confirmado la aparición de tales alteraciones en la biología larvaria en condiciones in vivo y esto fue un fenómeno dependiente de la dosis (Brunet y col., 2007).

En general, estos resultados sugieren que los taninos condensados y algunos otros polifenoles en forrajes leguminosos, así como en una amplia variedad de plantas, pueden perturbar las primeras fases de invasión del huésped y por lo tanto disminuir el éxito de infección. El papel de los monómeros constitutivos de los taninos. (flavan-3-ols) se ha determinado directamente. además, el papel de los taninos es sugerido por los datos comparados obtenidos. (Bahuaud y col., 2006).

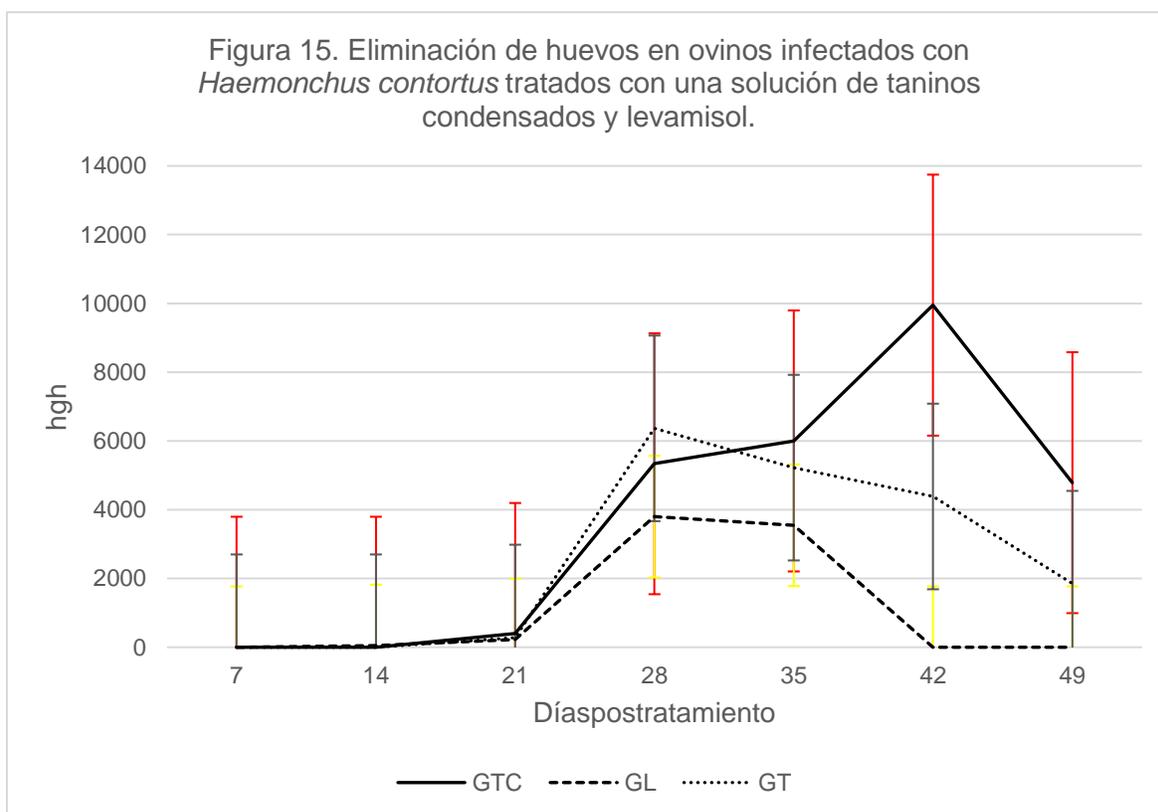
Resultados modelo experimental 2.

Eliminación de huevos de *Haemonchus contortus* en las heces.

La excreción de huevos de *H. contortus* inició con un individuo del GL en el día 14, para el GTC y GT inició la eliminación en el día 21.

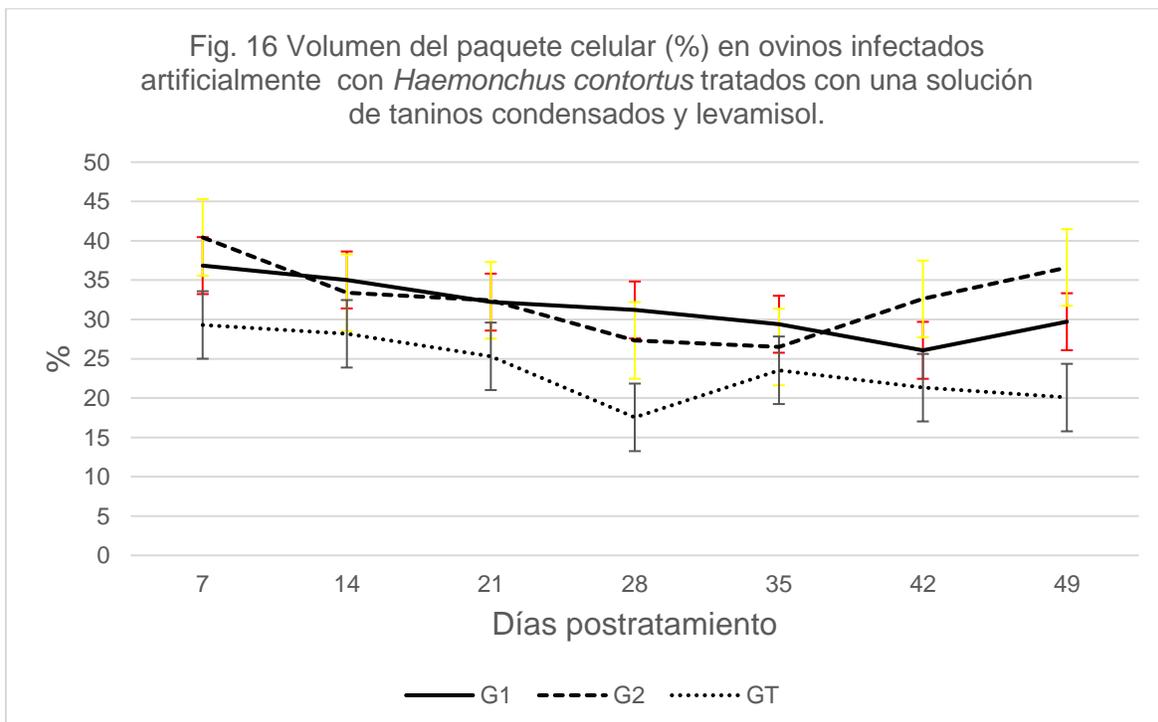
El GTC tuvo una eliminación de huevos ascendente, inició en promedio con 637 hgh al día 21 y terminó con un promedio de 3,550 hgh en el día 28. El grupo GL para el día 21 se obtuvo en promedio 150 hgh y para el día 28 se tuvo un conteo en promedio de 2,900 hgh; el GT el cual no recibió tratamiento alguno, presentó una eliminación de manera ascendente a través de la prueba, en el día 21 tuvo en promedio 250 hgh y para el día 28 hubo un conteo en promedio de 6,366 hgh.

Hubo diferencia significativa entre el grupo de levamisol y el grupo tanino a partir del día 42 y para el día 49, ya que la administración del levamisol resultó eficaz al 100%.



Volumen del Paquete Celular.

Se observó una tendencia decreciente en el porcentaje del volumen del paquete celular (VPC) a través de las evaluaciones (fig. 12). Se inició un porcentaje promedio del VPC de 47.9% para el GTC, de 49.1% para el GL y el GT tuvo 33.4%. En el día 35 los resultados fueron de 29.3%, 26.5% y de 23.5% respectivamente para GTC, GL y GT, teniendo una pérdida en comparación con el primer muestreo de 18.8 puntos porcentuales para GTC, en los GL y GT de 22.6 y 9.9 puntos porcentuales respectivamente, destacando la mayor pérdida para GL; 24 horas después se les administró la SATC al GTC y el levamisol al GL. Siete días postratamiento (día 42 post infección), el GTC y GT mostraron un descenso en comparación de 3.3 y 2.2 puntos porcentuales respectivamente y el GL obtuvo un aumento de 6.1 puntos porcentuales. Para el día 14 postratamiento (día 49 post infección), existió una diferencia significativa entre el grupo testigo (GT) con 20.0% con y el de levamisol (GL) con 36.6% en el VPC, mientras que el GTC obtuvo un aumento de 3.64 puntos porcentuales al igual que el GL con 3.9% y el GT continuó descendiendo, perdiendo 1.2 puntos porcentuales.



Peso corporal.

En el cuadro 12 se muestran los datos obtenidos del peso corporal de los corderos de los tres grupos experimentales. Al inicio del trabajo los animales del G1 tuvieron un peso corporal promedio de 23.4 kg, los del G2 25.4 kg y 22.2 en el GT.

Cuadro 9. Peso corporal en ovinos infectados artificialmente con *Haemonchus contortus*, tratados con una solución de taninos condensados o levamisol.

	Días postratamiento								GTP (kg)	GDP (g)
	0	7	14	21	28	35	42	49		
GTC	23.4	24.3	24.2	24.5	25.1	24.0	26.4	26.6	3.3	0.07
GL	25.4	25.7	25.6	25.3	26.4	26.2	27.4	28.2a	2.9	0.06
GT	22.2	23.2	23.3	22.8	24.3	23.6	22.9	25.1b	2.9	0.06

GTC: Tratamiento con solución acuosa de taninos condensados; GL: Tratamiento con levamisol; GT: Testigo, sin tratamiento. GTP: Ganancia total de peso; GDP: Ganancia diaria de peso.
a, b, Diferencias estadísticas con $P < 0.05$.

Después de 49 días los corderos tuvieron ganancias modestas de peso, siendo de 3.3 kg para el GTC, 2.9 kg para G2 y de 2.9 kg para el GT, existiendo diferencia significativa ($P < 0.05$), para el día 49 entre el GL y el GT.

La mejor ganancia de peso la obtuvieron los corderos del GTC (0.07 g), seguido por el GL y el GT con 0.06 g, sin embargo, en este rubro no existieron diferencias significativas ($p > 0.05$).

Condición corporal.

En el transcurso del experimento, la condición corporal de los animales en los tres grupos que fueron evaluados presentó un comportamiento muy estable, los

corderos del GTC iniciaron con un promedio de 1.6 y los grupos GL y GT de 2.0 (cuadro 13), posteriormente se presentaron pequeñas variaciones y finalmente se obtuvo un índice promedio de 1.6 para GTC, de 2 para GL y de 1.7 para el GT.

Para el día 35 los valores obtenidos fueron de 1.4, 1.9 y 1.7 para GTC, GL y GT respectivamente, 24 horas después se iniciaron los tratamientos con la SATC para el GTC y de levamisol para el GL.

Cuadro 10. Índice de la condición corporal en ovinos infectados artificialmente con *Haemonchus contortus*, tratados con una solución acuosa de taninos o levamisol.

	Días postratamiento							
	0	7	14	21	28	35	42	49
G1	1.6	1.5	1.4	1.6	1.6	1.4	1.5	1.6
G2	2.0	2.0	1.8	2.0	1.8	1.9	1.8	2.0
GT	2.0	1.7	2.2	1.5	1.7	1.7	1.7	1.7

GTC: Tratamiento con solución acuosa de taninos condensados; GL: Tratamiento con levamisol; GT: Testigo, sin tratamiento. GTP: Ganancia total de peso; GDP: Ganancia diaria de peso.

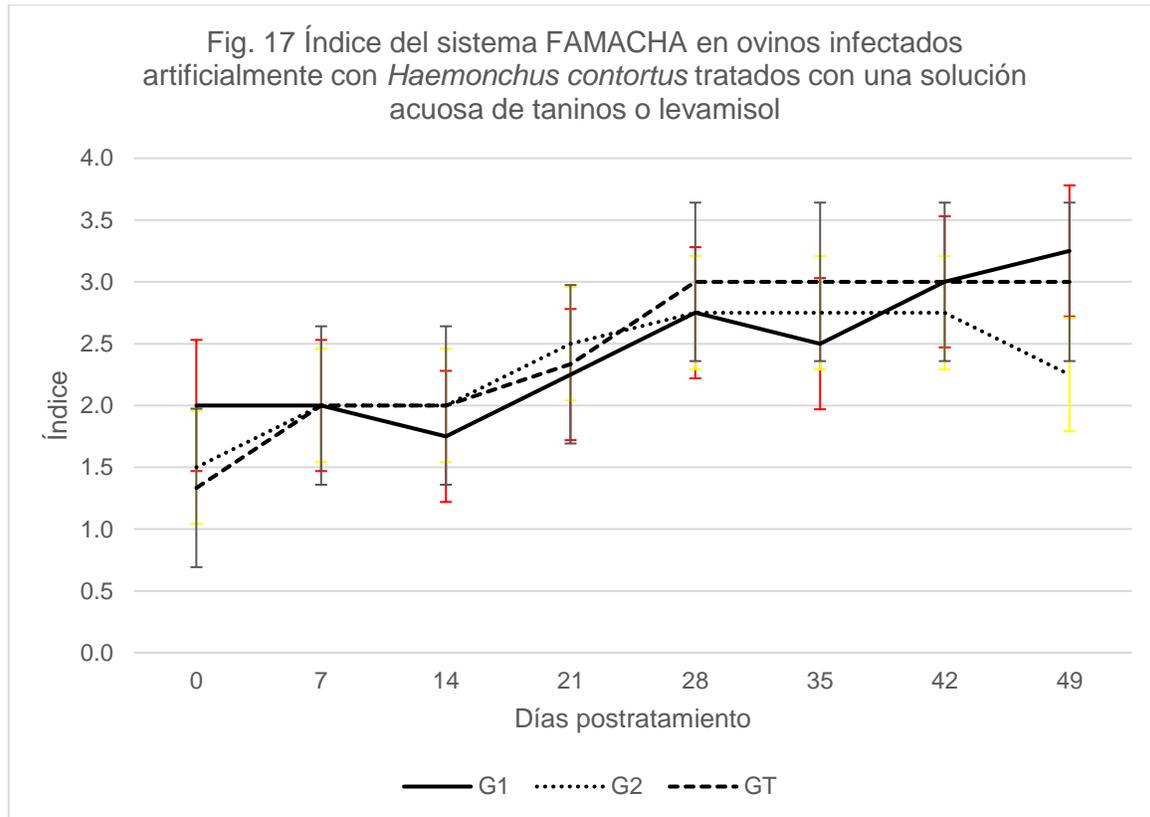
En el día 42 posinfección (día 7 postratamiento), el índice de C.C subió para el GTC a 1.5, disminuyó a 1.8 en el GL y por último el GT se mantuvo igual con 1.7. Para el día 49 posinfección (día 14 postratamiento), el GTC se incrementó de nuevo resultando con 1.6, el GL tuvo un ascenso quedando con 2.0 y el GT se mantuvo igual con 1.7.

Cabe mencionar que hubo diferencia significativa ($P < 0.05$) para el día 49 entre el GTC y GL.

FAMACHA.

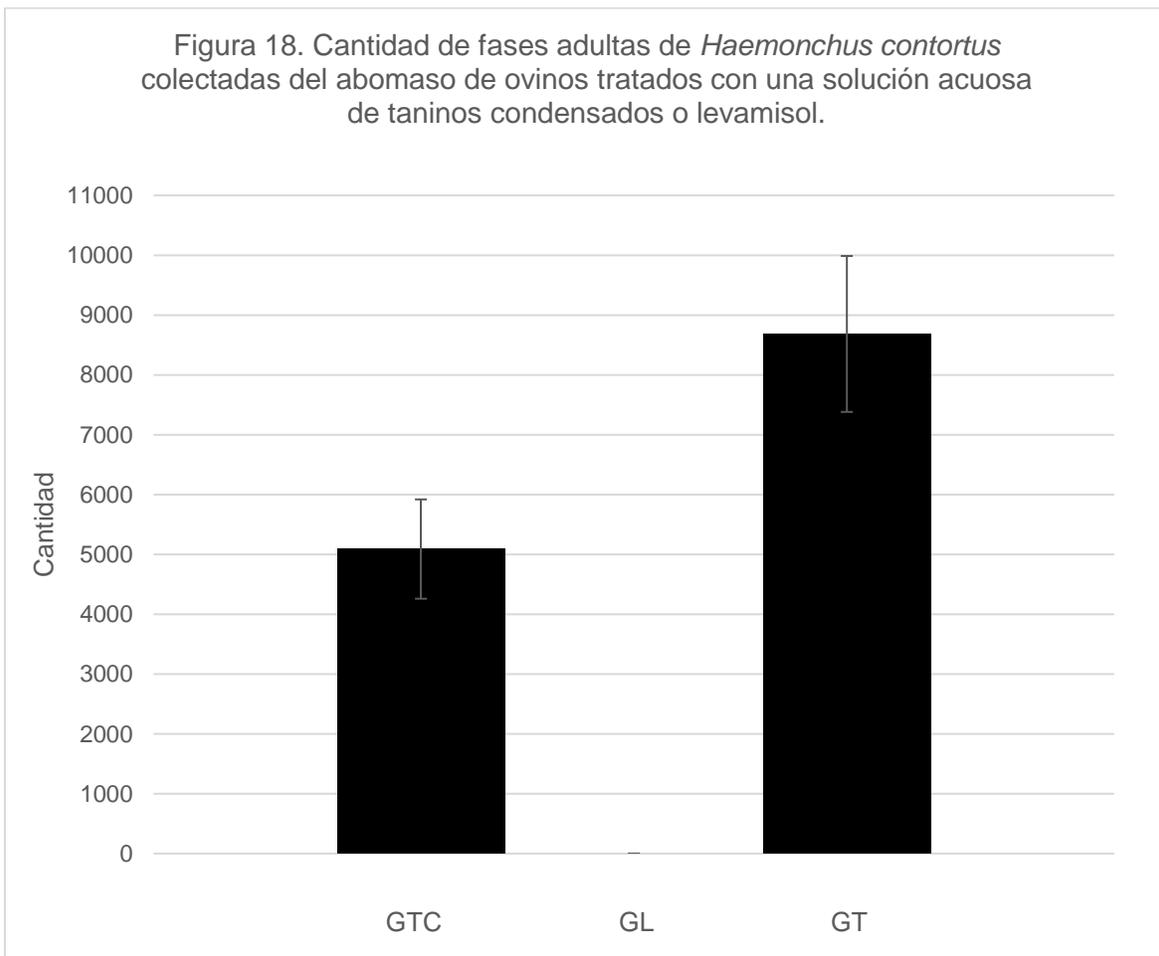
Desde el día siete no se observaron variaciones importantes entre los grupos, la diferencia se amplió para el día 49, el grupo que no recibió tratamiento y el grupo que recibió la SATC fueron los más afectados, ya que llegaron a la escala de tres en el sistema FAMACHA, esto correlacionado con la gráfica de VPC y los resultados obtenidos para los grupos GTC y GT, los cuales fueron de 29.71% y de 20.06% respectivamente.

Sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los grupos a lo largo del experimento ($P > 0.05$).



Número de parásitos adultos.

Después de 49 días post infección (14 días postratamiento), y tras haber realizado el sacrificio de los corderos, las fases adultas de *H. contortus* fueron colectadas del abomaso de los animales y se obtuvo que en el grupo de levamisol (GL), fueron eliminados en su totalidad los parásitos, ya que no se encontró ninguna fase adulta contenida en el abomaso, siguiendo el grupo tratado con la SATC (5,090) y por último, el grupo sin tratamiento con 8,685 parásitos totales (Fig. 18).



En el caso de los corderos pertenecientes al GTC, el rango del conteo de adultos fue de 660 a 2,440 parásitos. En el GL, los animales no tuvieron al nematodo, resultando negativo. Para el grupo GT, se colectaron entre 1,400 y 3,790 fases adultas. Existiendo una diferencia significativa ($P < 0.05$) entre los tres grupos analizados.

Discusión

En el grupo de levamisol (GL), se eliminó en su totalidad a los parásitos adultos, en el grupo de la SATC (GTC) y en el grupo testigo se recuperaron 5,090 y 8,685 respectivamente, lo cual indica una reducción de 41.4% con respecto al grupo sin tratamiento, aunque la SATC no eliminó por completo a los parásitos, hubo un efecto considerable en la reducción de las fases adultas.

Con lo anterior se confirma que existió una diferencia significativa entre los grupos de taninos-testigo, levamisol-testigo y taninos-levamisol ($P < 0.05$).

Dado que los taninos condensados no parecen ser absorbidos por el tracto gastrointestinal de las ovejas, se puede decir que están presentes en altas concentraciones en el lumen y de esta manera, podrían haber sido capaces de afectar más a los gusanos adultos (Reed, J.D 1995).

Se ha reportado una reducción en la carga total de gusanos de las especies intestinales y abomasales en ovejas que pastorean praderas que contienen taninos condensados (Niezen y col., 1998). Varios resultados sugieren que los taninos condensados presentes en los forrajes cuentan con propiedades antihelmínticas.

Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para examinar los efectos de diferentes fuentes de taninos en varios rasgos biológicos de los nematodos. Se encontraron variaciones en los resultados según la etapa parasitaria, en particular dependiendo de si las larvas infecciosas de la tercera etapa (L₃) o los gusanos adultos se sometieron a un ambiente rico en taninos (Paolini y col., 2003b).

Los resultados obtenidos en cabras que recibieron quebracho, un recurso rico en taninos, sugirieron que estos compuestos polifenólicos podrían afectar el establecimiento de las etapas iniciales de la infección por nematodos (Paolini y col., 2003c). Estos resultados *in vivo* fueron concordantes con los datos *in vitro*

adquiridos en varias especies de nematodos, mostrando una disminución en la motilidad L₃ después del contacto con extractos brutos o taninos condensados extraídos de un rango de plantas ricas en estos (Molan y col., 2000a, Paolini, Fouraste y Hoste, 2004).

Esta baja motilidad de las L₃ puede afectar en la asociación de estas a la mucosa del abomaso y esto a su vez disminuye la cantidad de larvas que puedan llegar a su etapa de adulto, lo cual se mostró en los resultados de este experimento, la cantidad de adultos encontrados fue menor en comparación con el grupo testigo, habiendo una diferencia significativa ($P > 0.05$) entre estos dos grupos.

Estos últimos resultados han fundamentado la hipótesis de un papel central para los taninos en los efectos sobre las L₃. Sin embargo, los mecanismos de acción de estos polifenoles en las larvas infecciosas permanecen aún sin conocerse, lo cual deja un campo amplio e interesante para la investigación.

Discusión general

La actividad antihelmíntica y el uso de diversos extractos de plantas en contra de *H. contortus*, ha sido bien documentada (Iqbal y col., 2007; Ahmed y col., 2013). Hoy en día, los compuestos bioactivos producidos por las plantas se han mostrado prometedores para el desarrollo como nuevos antihelmínticos (Araújo y col., 2017; Zabré y col., 2017). Cuando los animales infectados con poblaciones de parásitos adultos (infección patente), consumieron forrajes ricos en taninos, las principales consecuencias generales fueron que se redujeron significativamente la eliminación de huevos de nematodos. Esta disminución en la producción de huevos alcanzó hasta el 80% en comparación con los valores de control, con un posible impacto en una reducción severa de la contaminación de los pastos (Lange y col., 2006; Shaik y col., 2006; Manolaraki y col., 2010). Dependiendo de los forrajes explotados y de las especies de nematodos involucradas, estas reducciones en la excreción de nematodos en los huevos se han relacionado con disminuciones significativas en los números de gusanos (Heckendorn y col., 2006; Heckendorn y col., 2007) o con una fertilidad reducida de los gusanos hembra (Paolini y col., 2005b; Lange y col., 2006; Manolaraki y col., 2010; Martínez-Ortiz-De-Montellano y col., 2010). En el experimento uno, no se observó este efecto, ya que no hubo diferencia significativa en la eliminación de hgh en ambos modelos experimentales, Balic y col. (2000) indican que, a menor población de nematodos adultos, aumenta la prolificidad y viceversa, eso como consecuencia de la tasa de infección y resistencia adquirida por el hospedador; por lo cual este fenómeno indicaría que, a pesar de la cantidad de parásitos adultos en los grupos que recibieron tratamiento en comparación con el testigo, la dinámica de eliminación de huevos mostró una tendencia similar durante el experimento.

Hay poca información disponible en el posible modo de acción de los taninos y polifenoles contra las fases adultas. Sólo estudios *in vitro* han examinado el posible efecto de los extractos de plantas ricas en taninos en las funciones del gusano, tales como motilidad y/o mortalidad, incluyendo *H. contortus* (por ejemplo, Paolini y col.,

(2004). Las pruebas *in vitro* no mostraron evidencia de que la SATC afectara el desarrollo larvario per se, pero hay evidencia clara de que afectó la motilidad de las L₃ que se habían desarrollado bajo exposición a la SATC. En contraste con los estudios *in vivo*, que demostraron claramente diferencias interespecíficas en susceptibilidad a la SATC. La actividad antihelmíntica observada del extracto de quebracho *in vitro* podría ser atribuible a la capacidad del tanino que tiene para unirse a las proteínas y podría operar a través de varios mecanismos (Athanasiadou y col., 2001). Las larvas pueden ingerir taninos condensados, que se unen a la mucosa intestinal y causan autólisis (Schultz, 1989). Esto también podría aplicarse al desarrollo de larvas de nematodos. Los taninos condensados también pueden unirse a la cutícula de las larvas, que es alta en glicoproteínas (Thompson y Geary, 1995) y causan su muerte.

Según nuestro conocimiento, hay dos estudios que han examinado las posibles alteraciones inducidas en el proceso de penetración larvaria de los tejidos digestivos (Brunet y col., 2008a). El primero se basó en un método experimental utilizando explantes *ex vivo* de mucosas abomasales (Jackson y col., 2004). Los resultados mostraron que: (I) el contacto de las larvas con los extractos de *sanfoin* provocó una disminución significativa en la asociación con las mucosas; (II) el fenómeno fue dependiente de la dosis; (III) también ocurrió después del contacto con algunos flavan-3-ols y (IV) el proceso no fue específico para las especies de nematodos. Este resultado proporcionado apoya evidencia de la menor tasa de establecimiento de las L₃ *in vivo* cuando los animales se alimentan con forrajes ricos en taninos (Paolini y col., 2003b, c, 2005a; Brunet y col., 2008b). El segundo experimento fue el realizado por Montellano y col. el cual consistió en exponer adultos de *H. contortus* a un extracto de plantas ricas en taninos y después se capturaron imágenes con microscopio de barrido, en las cuales se aprecia claramente el daño realizado a la cutícula de los parásitos expuestos a ese extracto de taninos condensados.

Se ha obtenido evidencia sobre la importancia de los taninos condensados a partir de estudios *in vivo*, los cuales han examinado las consecuencias del uso de extracto

de corteza de quebracho (*Schinopsis sp.*) rico en taninos (Streit, W. y Fengel, D. 1994), administrado a pequeños rumiantes infectados con nematodos. En general, la adición de quebracho provocó una disminución en el establecimiento de larvas de nematodos de la tercera etapa (Paolini, V. y col., 2005 y 2005) o reducciones en la fertilidad de los gusanos y la producción de huevos (Paolini, V. y col., 2003 y Paolini, V. y col., 2003b).

Se debe considerar la capacidad de los taninos condensados para unirse a proteínas y cambiar sus propiedades físicas y químicas, especialmente porque se sabe que la cutícula del nematodo es una estructura rica en prolina e hidroxiprolina que cubre no solo el cuerpo del nematodo, pero también la cavidad bucal, el esófago, la cloaca y la vulva (Thompson, D.P. y Geary, T.G. 1995).

Butter y col., (2000), encontraron que en un modelo de alimentación usando TC, se reduce el recuento de huevos fecales en corderos infectados experimentalmente con *Trichostrongylus colubriformis*. Además, la administración de un extracto de quebracho comercialmente disponible rico en taninos condensados, resultó en una reducción del 50% en el número de huevos y gusanos adultos recuperados de las ovejas y en una menor fecundidad de los nematodos abomasales en cabras (Athanasiadou y col., 2000a, b, Athanasiadou y col., 2001, Paolini y col., 2003).

Conclusiones generales.

- Al utilizar la técnica de la vainillina ácida y usando como diluyente agua al 1% de etanol, se observó que el porcentaje de taninos condensados contenidos se expresaban de mejor manera (113.17 g/Kg)
- En la prueba de inhibición de la eclosión se inhibió el 55.4% la eclosión de los huevos de *H. contortus* utilizando la muestra MGM, lo cual nos indica que la SATC tiene un efecto directo sobre los huevos.
- Entre mayor sea el tiempo de exposición de las larvas con la SATC, las mismas van perdiendo la capacidad de moverse.
- Hubo una disminución en la cantidad de parásitos adultos encontrados en el abomaso de los corderos del modelo experimental uno, en el cual se utilizó la SATC (GTC), la cual fue de 73.6% en comparación con el grupo testigo (GT). Existiendo diferencia significativa $P > 0.05$.
- Hubo una disminución en la cantidad de parásitos adultos encontrados en el abomaso de los corderos del modelo experimental dos, en el cual se utilizó la SATC (GTC), la cual fue de 41.4% en comparación con el grupo testigo (GT). Existiendo diferencia significativa ($P > 0.05$).
- El uso de la SATC mostró tener una actividad antihelmíntica en contra de las fases larvarias de la primo infección y sobre la etapa de adultos del *H. contortus*, resultando en una alternativa natural en contra de este nematodo.
- Con base en los resultados obtenidos, se puede utilizar esta SATC tanto en las unidades pecuarias enfocadas a la producción orgánica, como en los sistemas de producción tradicionales con elevados índices de carga parasitaria, ya que es una sustancia de origen natural, la cual ha demostrado tener una capacidad antihelmíntica considerable. Aún falta por investigar el mecanismo de acción de los taninos condensados sobre los nematodos, así como en mejorar la forma de administración de esta.

Bibliografía.

- Alba, HF. 2007. Parasitología veterinaria: Manual de laboratorio, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM
- Alonso-Díaz, MA; Torres-Acosta, JFJ; Sandoval-Castro, CA; Capetillo-Leal, CM; Brunet, S; Hoste, H., 2008b. Effects of four tropical tanniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. *Vet Parasitol* 153, 187-192.
- Alonso-Díaz, MA; Torres-Acosta, JFJ; Sandoval-Castro, CA; Hoste, H; Aguilar-Caballero, J., 2008a. In vitro larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniferous plant extracts. *Vet Parasitol* 153, 313-319.
- Anderson, R.C., 2000. Nematode Parasites of Vertebrate. Their Development and Transmission, second ed. CABI Publishing, Wallingford, UK.
- Athanasiadou, S; Kyriazakis, I; Jackson, F; Coop, R.L., 2000. Effects of short-term exposure to condensed tannins on adult *trichostrongylus colubriformis*. *The Veterinary record* 2000 v.146 no.25 pp. 728-732.
- Athanasiadou, S; Kyriazakis, I; Jackson, F; Coop, R.L., 2001. Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: in vitro and in vivo studies. *Vet. Parasitol.* 99, 205–219.
- Avery L; Horvitz H.R., 1990: Effects of starvation and neuroactive drugs on feeding in *Caenorhabditis elegans*. *J. Exp. Zool.* 64: 263–270.
- Bath, G; Hansen, J; Krecek, R; Van Wyk, J; Vatta, A. 2001. Sustainable approaches for managing Haemonchosis in sheep and goats, final report of FAO. Technical cooperation project N° TCP/SAF/882 (A). (en línea). Disponible en: <http://cniia.inta.gov.ar/helminto/pdf%20alternativos/Sustainable%20approaches%20for%20managing%20haemonchosis%20in%20sheep%20and%20goats.pdf>
- Bahuaud, D; Martinez-Ortiz-de-Montellano, C; Chauveau, S; Prevot, F; Torres-Acosta, J.F.J; Fouraste, I; Hoste, H., 2006. Effects of four tanniferous

plant extracts on the in vitro exsheathment of third-stage larvae of parasitic nematodes. *Parasitology* 132, 545–554.

- Becerra-Nava, R; Alonso-Diaz, M.A; Fernandez-Salas, A; Quiroz, R.H., 2014. First report of cattle farms with gastrointestinal nematodes resistant to levamisole in Mexico. *Vet. Parasitol.* 204, 285e290.
- Behnke, J.M; Buttle, D.J; Stepek, G; Lowe, A; Duce, I.R., 2008. Developing novel anthelmintics from plant cysteine proteinases. *Parasit. Vectors* 1, 29.
- Besier, R.B; Kahn, L.P; Sargison, N.D; Van Wyk, J.A., 2016. The pathophysiology, ecology and epidemiology of *Haemonchus contortus* infection in small ruminants. In: Gasser, R., Samson-Himmelstjerna, G.V. (Eds.), *Haemonchus contortus* and Haemonchosis Past, Present and Future Trends. vol. 93, pp. 95e144.
- Bourguinat, C; Lee, A.C; Lizundia, R; Blagburn, B.L; Liotta, J.L; Kraus, M.S; Keller, K; Epe, C; Letourneau, L; Kleinman, C.L; Paterson, T; Gomez, E.C; Montoya-Alonso, J.A; Smith, H; Bhan, A; Peregrine, A.S; Carmichael, J; Drake, J; Schenker, R; Kaminsky, R; Bowman, D.D; Geary, T.G; Prichard, R.K., 2015. Macrocyclic lactone resistance in *Dirofilaria immitis*: failure of heartworm preventives and investigation of genetic markers for resistance. *Vet. Parasitol.* 210, 167e178.
- Brunet, S; Martínez-Ortiz-de-Montellano, C; Torres-Acosta, JFJ; Sandoval-Castro, CA; Aguilar-Caballero, AJ; Capetillo-Leal, CM; Hoste, H., 2008. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of parasitic gastrointestinal nematodes in goats. *Vet Parasitol* 157, 81-88.
- Brunet, S; Aufrere, J; El Babili, F; Fouraste, I; Hoste, H., 2007. The kinetics of exsheathment of infective nematode larvae is disturbed in the presence of a tannin-rich plant extract. *Parasitology* 135, 1–10.

- Brunet, S; Fourquaux, I; Hoste, H., 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with a sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol. Int.* 60, 419–424.
- Brunet, S; Fourquaux, I; Hoste, H., 2011. Ultrastructural changes in the third-stage, infective larvae of ruminant nematodes treated with a sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract. *Parasitol. Int.* 60, 419–424.
- Brunet, S; Hoste, H., 2006. Monomers of condensed tannins affect the larval exsheathment of parasitic nematodes of ruminants. *J. Agric. Food Chem.* 54, 7481–7487.
- Brunet, S; Jackson, F; Hoste, H., 2008b. Effects of sainfoin (*Onobrychis viciifolia*) extract and monomers of condensed tannins on the association of abomasal nematode larvae with fundic explants. *Int. J. Parasitol.* 38, 783–790.
- Brunet, S; Martínez-Ortíz-de-Montellano, C; Torres-Acosta, J.F.J; Sandoval-Castro, C.A; Aguilar-Caballero, A.J; Capetillo-Leal, C; Hoste, H., 2008a. Effect of the consumption of *Lysiloma latisiliquum* on the larval establishment of gastrointestinal nematodes in goats. *Vet. Parasitol.* 157, 81–88.
- Byaruhanga, C; Okwee-Acai, J., 2013. Efficacy of albendazole, levamisole and ivermectin against gastro-intestinal nematodes in naturally infected goats at the National Semiarid Resources Research Institute, Serere, Uganda. *Vet. Parasitol.* 195, 183e186.
- Chagas, A.C; Katiki, L.M; Silva, I.C; Giglioti, R; Esteves, S.N; Oliveira, M.C; Barioni Junior, W., 2013. *Haemonchus contortus*: a multiple-resistant Brazilian isolate and the costs for its characterization and maintenance for research use. *Parasitol. Int.* 62, 1e6.
- Coadwell, W.J; Ward, P.F.V., 1981. The development, composition and maintenance of experimental populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitol.* 82: 257-261.
- Coles, G; Borgsteede, F; Geerts, S; Klei, T; Taylor, M; Waller, P., World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A.A.V.P.) methods for the detection of antihelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* (1992). 44: 35-44.

- Corticelli, B; Lai, M., 1964. La diagnosi di tipo d'infestione nella strongilosi gastro-intestinale del bovino. Extr. de Bassegna Veterinaria, año XLI, fás. 3.
- Coyne, M.J; Smith, G; Johnstone, C., 1991. A study of the mortality and fecundity of *Haemonchus contortus* in parasite-native and parasite exposed sheep following single experimental infections. Int. J. Parasitol. 22: 315-325.
- Cuéllar, OJA., 1992. Epidemiología de las helmintiasis del aparato digestivo y respiratorio en ovinos y caprinos. Mem. Curso Principios de helmintología veterinaria en rumiantes y cerdos. Escuela de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Michoacán.
- Cuéllar, OJA; 2007., Control no farmacológico de parásitos en ovinos. Memorias del V Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeño Rumiantes y Camélidos Sudamericanos mayo 2-4; Mendoza Argentina. Asociación Latinoamericano de Especialistas en Pequeño Rumiantes y Camélidos Sudamericanos
- Cuéllar, O.J.A., 1986. Nematodiasis gastroentérica. En: Principales enfermedades de los ovinos y caprinos. Edit. P. Pijoan A. y J. Tórtora. México. 112-118.
- Cuenca, VC; Cuenca VNM., Comparación de la cantidad, tamaño y prolificidad de fases adultas de *Haemonchus contortus* en una infección experimental en ovinos Columbia y Blackbelly. Tesis de licenciatura, UNAM, México. 2005.
- Dakkak, A; Fioramonti, J; and Bueno, L.,1981. *Haemonchus contortus* third stage larvae in sheep: kinetics of arrival into the abomasums and transformation during rumino-omasal transit. Res. Vet. Sci., 31: 384-385.
- Dearing. D; Foley. W; McLean. S., The influence of plant secondary metabolites on the nutritional ecology of herbivorous terrestrial vertebrat. Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst. 2005. 36:169–89.
- Demeler, J; Van Zeveren, A.M; Kleinschmidt, N; Vercruyssen, J; H€oglund, J; Koopmann, R; Cabaret, J; Claerebout, E; Areskog, M; Von Samson-Himmelstjerna, G., 2009. Monitoring the efficacy of ivermectin and

albendazole against gastrointestinal nematodes of cattle in Northern Europe. *Vet. Parasitol.* 160, 109e115.

- Douglas, G.B; Wang, Y; Waghorn, G.C; Barry, T.N; Purchas, R.W; Foote, A.G; Wilson, G.F., 1995. Liveweight gain and wool production of sheep grazing *Lotus corniculatus* and lucerne (*Medicago sativa*). *N.Z. J. Agr. Res.* 38, 95±104.
- Epe, C; Kaminsky, R., 2013. New advancement in anthelmintic drugs in veterinary medicine. *Trends Parasitol.* 29, 129e134.
- Falzon, L.C; Menzies, P.I; Shakya, K.P; Jones-Bitton, A; Vanleeuwen, J; Avula, J; Stewart, H; Jansen, J.T; Taylor, M.A; Learmount, J; Peregrine, A.S., 2013. Anthelmintic resistance in sheep flocks in Ontario, Canada. *Vet. Parasitol.* 193, 150e162.
- Gasbarre, L.C., 2014. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in the US. *Vet. Parasitol.* 204, 3e11.
- Gill J.H; Redwin J.M; Van Wyk J.A., Lacey E. 1995: Avermectin inhibition of larval development in *Haemonchus contortus* –effects of ivermectin resistance. *Int. J. Parasitol.* 25: 463–470.
- Gilleard, J.S., 2006. Understanding anthelmintic resistance: the need for genomics and genetics. *Int. J. Parasitol.* 36, 1227e1239.
- González, S; Villegas, M., Manual de prácticas de laboratorio. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de ciencias químicas. Licenciatura: químico farmacobiólogo. (2006).
- Grzywacz M., 1983: The swallowing of chemical compounds by helminths. *Acta Parasitol. Pol.* 28: 357–368.
- Hoste, H; Torres-Acosta, J.F.J.; Sandoval-Castro, C.A; Mueller-Harveyd, I.; Sotirakie, S; Louvandinif, H; Thamsborgg, S.M; Terrillh, T.H., Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary parasitology* 212 (2015) 5-17.
- Heckendorn, F; Haring, D.A; Maurer, V; Senn, M; Hertzberg, H., 2007. Individual administration of three tanniferous forage plants to lambs artificially

infected with *Haemonchus contortus* and *Cooperia curticei*. *Vet. Parasitol.* 146, 123–134.

- Holden-Dye, L; Walker, R.J., 2014. Anthelmintic drugs and nematicides: studies in *Caenorhabditis elegans*. *WormBook* 1e29.
- Horigome T; Kumar R; Okamoto K., 1988: Effects of condensed tannins prepared from leaves of fodder plants on digestive enzymes in vitro and in the intestine of rats. *Br. J. Nutr.* 60: 275–285.
- Hoste, H; Jackson, F; Athanasiadou, S; Thamsborg, S.M; Hoskin, S.O., 2006. The effects of tannin-rich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends Parasitol.* 22, 253–261.
- Hoste, H; Torres. J.F.J., Non quimical control of helminths in ruminants: Adapting solutions for changing worms in a changing world. *Veterinary parasitology* 180 (2011) 144-154.
- Hsu, C.K y Levine, N.D., 1977. Degree-day concept in development of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* under constant and cyclic conditions. *Am. J. Vet. Res.* 38: 1115-1119
- Hughes, P.L; Dowling, A.F; Callinan, A.P., 2007. Resistance to macrocyclic lactone anthelmintics and associated risk factors on sheep farms in the lower North Island of New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 55, 177e183.
- Niezema, J. H; Waghorna, T. S; Charlestone, W. A. G; Waghorna, G. C., Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. *The Journal of Agricultural Science / Volume 125 / Issue 02 / October 1995*, pp 281-289.
- Kaneko, J.J; Cornelius, C.E., 1970. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 2nd ed. Academic Press. USA.
- Kaplan, R.M., (2004). Drug resistance in nematodes of veterinary importance. *Trends Parasitol.* 20: 477-481.
- Kaplan, R.M; Vidyashankar, A.N., 2012. An inconvenient truth: global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186, 70e78.

- Keane, O.M; Keegan, J.D; Good, B; de Waal, T; Fanning, J; Gottstein, M; Casey, M; Hurley, C; Sheehan, M., 2014. High level of treatment failure with commonly used anthelmintics on Irish sheep farms. *Ir. Vet. J.* 67, 16.
- Keiser, J; Utzinger, J., 2008. Efficacy of current drugs against soil-transmitted helminth infections: systematic review and meta-analysis. *JAMA* 299, 1937e1948.
- Krücken, J; Harder, A; Jeschke, P; Holden-Dye, L; O'Connor, V; Welz, C; Von Samson-Himmelstjerna, G., 2012. Anthelmintic cyclcooctadepsipeptides: complex in structure and mode of action. *Trends Parasitol.* 28, 385e394.
- Kudo, N; Yoshioka, T; Watanabe, Y; Terazono, Y; Takenouchi, S; Donomoto, T; Nakajima, K; Hitosugi, K; Tsukada, R; Ikadai, H; Oyamada, T., 2014. Reduced efficacy of ivermectin treatments in gastrointestinal nematode infections of grazing cattle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 1487e1491.
- Lange, K.C; Olcott, D.D; Miller, J.E; Mosjidis, J.A; Terill, T.H; Burke, J.M; Kearney, M.T., 2006. Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lamb. *Vet. Parasitol.* 141, 273–278.
- Lange, K.C; Olcott, D.D; Miller, J.E; Mosjidis, J.A; Terrill, T.H; Burke, J.M; Kearney, M.T., 2006. Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Vet. Parasitol.* 141, 273–278
- Lapage, G. 1976. *Parasitología veterinaria*. Editorial Continental. México. 121-127
- Lapage, G., 1983., *Parasitología Veterinaria*. Ed. Continental. México, D.F.
- Leathwick, D.M; Atkinson, D.S., 1996. Influence of different proportions of *Lotus corniculatus* in the diet of lambs on dags, flystrike and animal performance. *Proc. N.Z. Soc. Anim. Prod.* 56, 99±102.
- Mahieu, M; Ferre, B; Madassamy, M; Mandonnet, N., 2014. Fifteen years later, anthelmintic resistances have dramatically spread over goat farms in Guadeloupe. *Vet. Parasitol.* 205, 379e384.

- Manolaraki, F; Sotiraki, S; Skampardonis, V; Volanis, M; Stefanakis, A; Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some Mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 685–696.
- Manolaraki, F; Sotiraki, S; Stefanakis, A; Skampardonis, V; Volanis, M; Hoste, H., 2010. Anthelmintic activity of some mediterranean browse plants against parasitic nematodes. *Parasitology* 137, 684–696.
- Martínez, C; Arroyo, L; Fourquaux, I; Torres. F; Sandoval, C; Hoste, H., Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* exposed to tannin-rich plants under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Experimental Parasitology* 133 (2013) 281-286.
- Martinez-Ortiz-de-Montellano C; Fourquaux, I; Brunet, S; Torres-Acosta, JFJ; Sandoval-Castro, CA; Hoste, H., 2009. Scanning electron microscopy of *Haemonchus contortus* adults after contact with extracts of two tannin rich plants: *Lysiloma latisiliquum* and *Onobrychis viciifolia*. Proceedings WAAVP Conference. Calgary, Canada.
- Martinez-Ortiz-de-Montellano, C; Vargas-Magaña, JJ; Canul-Ku, HL; Miranda-Soberanis, R; Capetillo-Leal, C; Sandoval-Castro, CA; Hoste, H; Torres-Acosta, JFJ., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant *Lysiloma latisiliquum* on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet Parasitol* 10.1016/j.vetpar.2010.04.040.
- Martínez-Ortiz-De-Montellano, C; Vargas-Magana, J.J; Canul-Ku, H.L; Miranda-Soberanis, R; Capetillo-Leal, C; Sandoval-Castro, C.A; Hoste, H; Torres-Acosta, J.F.J., 2010. Effect of a tropical tannin-rich plant, *Lysiloma latisiliquum*, on adult populations of *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.*, <http://dx.doi.org.scopeesprx.elsevier.com/10.1016/j.vetpar.2010.04.040>.
- Martínez-Vázquez, J.B., 2007. Evaluación de la actividad antioxidante de Extractos orgánicos de semillas de *Heliocarpus terebinthinaceus*, Tesis de Licenciatura en Ingeniería en Alimentos, Universidad Tecnológica de la Mixteca.

- Meana, MA; Rojo, VFA., 1999. Trichostrongilosis y otras nematodiasis. En: Parasitología veterinaria. Edit. Por: Cordero, C.M y Rojo, V.F.A., Editorial McGraw-Hill Interamericana. México.
- Molan, A; Duncan, AJ; Barry, TN; McNabb, WC., 2003. Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitol Int* 52, 209-218.
- Molan A.L; Waghorn G.C; Min B.R; McNabb W.C., 2000: The effect of condensed tannins from seven herbage on *Trichostrongylus colubriformis* larval migration in vitro. *Folia Parasitol.* 47: 39–44.
- Muniz-Lagunes, A; Gonzalez-Garduno, R; Lopez-Arellano, M.E; Ramirez-Valverde, R; Ruiz-Flores, A; Garcia-Muniz, G; Ramirez-Vargas, G; Mendoza-de Gives, P; Torres- Hernandez, G., 2015. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes from grazing beef cattle in Campeche State, Mexico. *Trop. Anim. Health Prod.* 47 (6), 1049e1054.
- Mueller-Harvey, I., 2006. Unravelling the conundrum of tannins in animal nutrition and health. *J. Sci. Food Agric.* 86, 2010–2037.
- Nabukenya, I; Rubaire-Akiiki, C; Olila, D; Muhangi, D; H€oglund, J., 2014. Anthelmintic resistance in gastrointestinal nematodes in goats and evaluation of FAMACHA diagnostic marker in Uganda. *Vet. Parasitol.* 205, 666e675.
- Niec R., 1968. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. Manual técnico N° 3. INTA, Argentina, Pp 1-37.
- Niezen, JH; Waghorn, GC; Charleston, WAG., Establishment and fecundity of *Ostertagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in lambs fed lotus (*Lotus pedunculatus*) or perennial ryegrass (*Lolium perenne*). *Vet Parasitol* 1998;78:13±21.
- Niezen, J.H; Robertson, H.A; Waghorn, G.H; Charleston, W.A.G., 1998. Production, faecal egg counts and worm burdens of ewe lambs which grazed six contrasting forages. *Vet. Parasitol* 80, 15-27.

- Niezen, J.H; Waghorn, T.S; Charleston, W.A.G; Waghorn, G.C., 1995. Growth and gastrointestinal nematode parasitism in lambs grazing either lucerne (*Medicago sativa*) or sulla (*Hedysarum coronarium*) which contains condensed tannins. J. Agric. Sci. 125, 281±289.
- Oh H.I; Hoff J.E., 1986: Effect of condensed grape tannins on the *in vitro* activity of digestive proteases and activation of their zymogens. J. Food Sci. 51: 577–580.
- Olsen, W., 1974. Animal parasites: their life cycles and ecology third ed. University Park. Press. Baltimore, U.S.A.
- Paolini, V; Fouraste, I; Hoste, H., 2004. *In vitro* effects of three woody plant and sainfoin extracts on two parasitic stages of three parasitic nematode species. Parasitol 129, 69-77.
- Paolini, V; Bergaud, J.P; Grisez, C; Prevot, F; Dorchies, Ph; Hoste, H., 2003a. Effects of condensed tannins on goats experimentally infected with *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 113, 253–261.
- Paolini, V; De La Farge, F; Prevot, F; Dorchies, P; Hoste, H., 2005. Effects of the repeated distribution of sainfoin hay on the resistance and the resilience of goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. Vet. Parasitol. 127, 277–283.
- Paolini, V; Dorchies, P; Hoste, H., 2003b. Effects of sainfoin hay on gastrointestinal nematode infections in goats. Vet. Rec. 152, 600–601.
- Paolini, V; Frayssines, A; De-La-Farge, F; Dorchies, Ph; Hoste, H., 2003c. Effects of condensed tannins on established populations and on incoming larvae of *Trichostrongylus colubriformis* and *Teladorsagia circumcincta* in goats. Vet. Res. 34, 331–339.
- Paolini, V; Prevot, F; Dorchies, Ph; Hoste, H., 2005a. Lack of effects of quebracho and sainfoin hay on incoming third stage larvae of *Haemonchus contortus* in goats. Vet. J. 170, 260–263.
- Papadopoulos, E; Gallidis, E; Ptochos, S., 2012. Anthelmintic resistance in sheep in Europe: a selected review. Vet. Parasitol. 189, 85e88

- Playford, M.C; Smith, A.N; Love, S; Besier, R.B; Kluver, P; Bailey, J.N., 2014. Prevalence and severity of anthelmintic resistance in ovine gastrointestinal nematodes in Australia (2009e2012). *Aust. Vet. J.* 92, 464e471.
- Quiroz, MH., 2003. *Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos*. 1ª ed. Edit Limusa. México.
- Reed JD., Nutritional toxicology of tannins and related polyphenols in forage legumes. *J Anim Sci* 1995;73:1516±28.
- Rialch, A; Vatsya, S; Kumar, R.R., 2013. Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats of sub-Himalayan region of northern India using different tests. *Vet. Parasitol.* 198, 312e318.
- Robertson, A.P; Clark, C.L; Martin, R.J., 2010. Levamisole and ryanodine receptors. I: A contraction study in *Ascaris suum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 171, 1e7.
- Rochfort. S; Parker. A; Dunshea. F., Plants bioactive for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69 (2008) 299-322.
- Rogers W.P; Brooks F., 1977: The mechanism of hatching of egg of *Haemonchus contortus*. *Int. J. Parasitol.* 7: 61–65.
- Rose, H; Rinaldi, L; Bosco, A; Mavrot, F; De Waal, T; Skuce, P; Charlier, J; Torgerson, P.R; Hertzberg, H; Hendrickx, G; Vercruysse, J; Morgan, E.R., 2015. Widespread anthelmintic resistance in European farmed ruminants: a systematic review. *Vet. Rec.* 176, 546.
- Shahidi F; Naczki M., 1995. Methods of analysis and quantification of phenolic compounds. Chap 9 Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. Technomic publishing Co. Inc. Lancaster, PA, USA and Basel, 281-320.
- Shaik, S.A; Terrill, T.H; Miller, J.E; Kouakou, B; Kannan, G; Kaplan, R.M; Burke, J.M; Mosjidis, J.A., 2006. *Sericea lespedeza* hay as a natural deworming agent against gastrointestinal nematode infection in goats. *Vet. Parasitol.* 139, 150–157.

- Smith, L.P., 1974. Meteorological factors of importance in biological systems. *Brit. Soc. Parasitit.*, 12: 13-32.
- Sommerville R.I; Rogers W.P., 1987: The nature and action of host signals. *Adv. Parasitol.* 26: 239–293.
- Sommerville, R.I., 1977. Development of *Haemonchus contortus in vitro* and the stimulus from the host. *J. Parasit.*, 63: 344-347.
- Streit, W; Fengel, D., 1994 Purified tannins from quebracho colorado. *Phytochemistry* 2, 481–484
- Soulsby, E.J., 1982. Helminths, Arthropods and protozoa of domesticated animals. Balliere Tindall, London
- Soulsby, E.J.L., 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7 a ed. Interamericana México.
- Stepek, G; Buttle, D.J; Duce, I.R; Behnke, J.M., 2006. Human gastrointestinal nematode infections: are new control methods required? *Int. J. Exp. Pathol.* 87, 325e341.
- Terrill, T.H; Douglas, G.B; Foote, A.G; Purchas, R.W; Wilson, G.F; Barry, T.N., 1992. Effect of condensed tannins upon body growth, wool growth and rumen metabolism in sheep grazing sulla (*Hedysarum coronarium*) and perennial pasture. *J. Agric. Sci.* 119, 265±273.
- Terrill, T.H; Dykes, G.S; Shaik, S.A; Miller, J.E; Kouakou, B; Kannan, G; Burke, J.M; Mosjidis, J.A., 2009. Efficacy of *Sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats: dose titration study. *Vet. Parasitol.* 163, 52–56.
- Terrill, T.H; Mosjidis, J; Moore, D.A; Shaik, S.A; Miller, J.E; Burke, J.M; Muir, J.P; Wolfe, R., 2007. Effect of pelleting on efficacy of *Sericea lespedeza* hay as a natural dewormer in goats. *Vet. Parasitol.* 146, 117–122.
- Thompson, D.P; Geary, T.G., 1995 The structure and function of helminth surfaces. In *Biochemistry and Molecular Biology of Parasites* (Marr, J.J. and Muller, M., eds), pp. 203–232, Academic Press
- Tsoetsi, A.M; Njiro, S; Katsande, T.C; Moyo, G; Baloyi, F; Mporu, J., 2013. Prevalence of gastrointestinal helminths and anthelmintic resistance on

small-scale farms in Gauteng Province, South Africa. *Trop. Anim. Health Prod.* 45, 751e761.

- Valdez, R.L; Hernández, M.F.R; Silva, M.R; Valdivia, A.G; Cuéllar, O.J.A., Aislamiento y caracterización de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino en México. Mem. XX Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Santiago, Chile. 2006.
- Verissimo, C.J; Niciura, S.C; Alberti, A.L; Rodrigues, C.F; Barbosa, C.M; Chiebao, D.P; Cardoso, D; Da Silva, G.S; Pereira, J.R; Margatho, L.F; Da Costa, R.L; Nardon, R.F; Ueno, T.E; Curci, V.C; Molento, M.B., 2012. Multidrug and multispecies resistance in sheep flocks from Sao Paulo state, Brazil. *Vet. Parasitol.* 187, 209e216.
- Waghorn, G.C; Shelton, I.D; McNabb, W.G; McCutcheon, S.N., 1994. The effect of condensed tannin in *Lotus pedunculatus* on nutritive value for sheep. Nitrogenous aspects. *J. Agric. Sci.* 123, 109±119.
- Waller, J.P; Chandrawathani, P., 2005. *Haemonchus contortus*: Parasite problem No.1 from Tropics-Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. *Tropical Biomedicine.* 22: 131-137.
- Wang, Y; Douglas, G.B; Waghorn, G.C; Barry, T.N; Foote, A.G., 1996. Effect of condensed tannins on *Lotus corniculatus* upon lactation performance in ewes. *J. Agric. Sci.* 126, 353±362.
- Wolstenholme, A.J; Fairweather, I; Prichard, R; Von Samson-Himmelstjerna, G; Sangster, N.C., 2004. Drug resistance in veterinary helminths. *Trends Parasitol.* 20, 469e476.

Anexos.

Anexo 1.

Ensayo de eclosión de huevos (EHA) (Coles y col., 1992).

1. Colección de la muestra

Para obtener un dato representativo, los huevos se usan dentro de las primeras tres horas de haberse tomado la muestra, teniendo en cuenta que la sensibilidad disminuye cuando la embrionación incrementa.

Colección de huevos

- 1.1. Homogenizar las muestras de materia fecal con un agitador.
- 1.2. Verter el contenido por una malla de 0.15 mm de apertura y 20 cm de diámetro en un tazón. Verter el contenido filtrado en un recipiente de vidrio.
- 1.3. Adicionar cloruro de sodio para crear una solución sobresaturada.
- 1.4. Agitar y retirar el sobrenadante.
- 1.5. Verter el sobrenadante en tubos y añadir la mitad de cada tubo con agua destilada, centrifugar a 300 rpm/5 minutos.
- 1.6. Retirar el sobrenadante, adicionar la mitad de agua destilada y centrifugar de nuevo.
- 1.7. Realizar el mismo procedimiento por cinco veces.
- 1.8. Retirar el sobrenadante y obtener el residuo del fondo de los tubos.
- 1.9. Cuantificar y evaluar integridad de los huevos.
- 1.10. Adicionar 100 huevos aproximadamente a cada pozo de placa para Elisa, dejando una fila y una columna por medio de cada muestra.
- 1.11. Utilizar una placa por cada tratamiento. Adicionar el extracto de taninos (X μ L), agua (20 μ L), albendazol a 300 mg/ml (X μ L), solvente y sólo huevos (X μ L).
- 1.12. Incubar a 27°C por 48 horas.

- 1.13. Añadir dos gotas de lugol. Se cuentan por lo menos 100 de los huevos restantes (muertos y embrionados) y las larvas eclosionadas en microscopio a 40X.
- 1.14. Se determina el porcentaje de inhibición de la eclosión.

Anexo 2

Ensayo de la motilidad de L₃

Se utilizó la técnica descrita por Fumiyuki (1987) y Chávez-Güitron (2016), la cual fue modificada.

1. Obtener larvas 3 por cultivo larvario luego de siete días.
2. Cuantificar las larvas y evaluar viabilidad de las larvas.
3. Utilizar una placa de ELISA por cada muestra a evaluar y colocar alrededor de 200 L₃ en cada pozo de una placa de ELISA (realizar esto por triplicado)
4. Adicionar el extracto de taninos (100 µL) a diferentes dosis (125 µg, 250 µg, 500 µg y 750 µg), albendazol (300 mg/ml, 100 µL), y solo huevos (sin tratamiento), e incubar las larvas por tres horas a 28 °C.
6. Realizar observaciones a las tres, seis, 24 y 48 horas; tomar una muestra de larvas (alrededor de 20) y filmar por un minuto y asignar una calificación dependiendo su motilidad.

0	<i>Muertas</i>
1	<i>No se mueven, pero están vivas</i>
2	<i>Movimiento bajo</i>
3	<i>Movimiento medio</i>
4	<i>Movimiento alto</i>