



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

Efecto *in vitro* del extracto etanólico de *Prosopis laevigata* sobre *Haemonchus contortus*.

Diagnóstico de Situación

Que para optar por el grado de Maestra en Medicina Veterinaria y
Zootecnia presenta:

MVZ Sara Atzín Muñoz Marín

Dr. Augusto César Lizarazo Chaparro FMVZ, UNAM

Dra. Cintli Martínez Ortiz de Montellano FMVZ, UNAM

Dr. Víctor Manuel Díaz Sánchez FES, Cuautitlán

Dra. Claudia Cecilia Márquez Mota FMVZ, UNAM

Dra. Sandra Iturbe Requena FES Cuautitlán

Ciudad Universitaria, CD. MX. Noviembre, 2022.



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.

DEDICATORIA

A mi familia:

Francisco Javier Muñoz Osornio

Constantina Marín de los Santos

Francisco Javier Muñoz Marín

AGRADECIMIENTOS

Realizar este proyecto fue posible gracias al financiamiento del Proyecto PAPIIT IN2261 2020, a la beca otorgada por el Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACYT).

Dra. Cintli Martínez Ortiz de Montellano gracias por toda la paciencia y empatía que ha tenido conmigo, agradezco cada palabra de aliento y ánimo porque no lo hubiera logrado sin usted.

Dra. Claudia Márquez agradezco todo el apoyo brindado por usted y por dejarnos trabajar en su bonito laboratorio.

Mamá y papá, los amo con todo mi ser y gracias por su apoyo infinito, todo esto lo he logrado gracias a la inspiración que me causan. Que la vida me permita tenerlos por siempre...

Laura y David, gracias por ayudarme en mis periodos de crisis, porque me ayudaron a continuar mi trabajo de investigación, también me han brindado su hermosa amistad y porque sin ustedes tampoco lo hubiera logrado, nunca hay que separarnos.

Kenia y Pancho, ustedes son mis hermanos menores y espero darles el ejemplo que necesitan para salir adelante, los quiero mucho y siempre voy a estar para ustedes.

Nancy, de mis personas favorita sobre la tierra, porque siempre estuviste para mí en los momentos más difíciles y porque nunca terminaré de agradecerte todo lo bello que haces por mí, te quiero mucho.

CONTENIDO

1. Resumen

2. Introducción

3. Marco Teórico

3.1 Situación global del sector de la carne de ovino

3.2 Importancia de la ovinocultura en México

3.3 Sistemas de producción ovino en el centro del país

3.4 Nematodos gastrointestinales

3.4.1 Haemonchus contortus

3.5 Resistencia Antihelmíntica

3.6 Manejo integrado parasitario

3.6.1 Aumentar la respuesta inmune del huésped

3.6.2 Agotar la fuente de contaminación

3.6.3 Controlar al agente causal

3.7 Nutracéuticos

3.7.1 Plantas nutracéuticas

3.7.2 *Prosopis laevigata*

4. Justificación

5. Hipótesis

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

6.2 Objetivos específicos

7. Materiales y métodos

7.1 Recolección de la vaina del mezquite

7.2 Obtención de las hembras de *H. contortus*

7.3 Prueba de LMI

7.3.1 Preparación de las soluciones

7.3.2 Incubación

7.3.3 Preparación de las placas de cultivo

7.3.4 Colecta y lectura

7.3.5 Expresión de resultados

7.3.6 Análisis estadístico

8. Resultados

8.1 Análisis de la prueba de inhibición de la migración larvaria

9. Discusión

10. Conclusión

11. Perspectivas

12. Referencias

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Composición química de vainas de mezquite con distinto nivel de maduración

Cuadro 2. Actividad antihelmíntica de plantas del género *Prosopis* sobre *Haemonchus contortus*

Cuadro 3. Umbrales clínicos encontrados en los ovinos receptores de la cepa

Cuadro 4. Diluciones preparadas con el extracto etanólico de la vaina del mezquite y solución larvaria

Cuadro 5. Media y desviación estándar del porcentaje de larvas muertas de *Haemonchus contortus* obtenidas con la exposición del control negativo, positivo y las concentraciones del extracto etanólico de *Prosopis laevigata*

LISTA DE FIGURAS Y GRÁFICAS

Figura 1. Ciclo biológico de *Haemonchus contortus* en los pequeños rumiantes.

Figura 2. Tres principios del Manejo Integrado Parasitario.

Figura 3. Mapa de distribución de *Prosopis laevigata* en México.

Figura 4. Actividades realizadas en campo para la obtención de hembras de *H. contortus*.

Figura 5. Actividades realizadas en la FMVZ-UNAM y CEPIPSA.

Figura 6. Técnica de cultivo larvario de Corticelli y Lai.

Figura 7. Volumen final de los tubos falcon dependiendo de la concentración del extracto vegetal y de PBS.

Figura 8. Volumen final de los tubos falcon dependiendo de la concentración de levamisol o ivermectina.

Figura 9. Colocación de los insertos en los pocillos de las placas de cultivo.

Figura 10. Distribución en las placas de cultivo de las soluciones larvarias expuestas a diferentes concentraciones del extracto vegetal, levamisol e ivermectina.

Gráfica 1. Comparación de los porcentajes de larvas muertas (efecto antihelmíntico *in vitro*) entre los diferentes tratamientos.

1. Resumen

El impacto de la nematodosis es una de las causas más frecuentes de pérdidas económicas en los sistemas de producción. El cual, se evidencia con la reducción de la ganancia diaria de peso (hasta un 50%), muertes (20-50%) así como los gastos por intervención de médicos veterinarios y los tratamientos para el control.

Haemonchus contortus es un nematodo hematófago capaz de afectar clínica y subclínicamente a la población joven y adulta de ovinos. Los casos de anemia son comunes por la severa pérdida de sangre, mientras que una baja conversión alimenticia se observa en animales en producción y frecuentemente existe una alta mortalidad en animales jóvenes.

El control de los nematodos gastrointestinales (NGI) se basa en el uso de drogas de origen químico de amplio espectro. El uso indiscriminado e irracional de los tratamientos químicos disponibles, ha originado el fenómeno de la Resistencia Antihelmíntica (RHA), este problema ha sido reportado a nivel mundial y aqueja a los productores de pequeños rumiantes.

El mezquite representa un recurso natural de gran importancia para los habitantes de las zonas áridas y semiáridas del país, ya que sirve como forraje para animales domésticos y silvestres debido a su contenido nutricional. El objetivo del estudio fue demostrar la actividad antihelmíntica del extracto etanólico de la vaina del mezquite en la prueba de inhibición de la migración larvaria.

Las concentraciones que se utilizaron para el extracto etanólico de la vaina del mezquite fueron 25, 50, 150, 250 y 350 µg/mL. Se utilizó un control negativo con PBS y dos controles positivos a concentraciones de 0.125%, 0.25%, 0.5% y 1% de levamisol e ivermectina.

En el estudio se pudo observar que el extracto etanólico de la vaina del mezquite tiene un efecto antihelmíntico *in vitro* visible a partir de la concentración de 150 µg/mL, inhibiendo la migración larvaria en un 99%, enseguida la concentración de 250 µg/L tiene una inhibición del 96% y la concentración de 350 µg/mL una inhibición del 94%. En cuanto a los controles positivos, el tratamiento antihelmíntico con

levamisol tiene un porcentaje de inhibición superior al 98.26%, en contraste con el tratamiento de ivermectina donde se encontró un porcentaje de 94.8%.

1. Abstract

The impact of nematodosis is one of the most frequent causes of economic losses in production systems. This is evidenced by the reduction of daily weight gain (up to 50%), deaths (20-50%) as well as expenses for veterinary intervention and control treatments.

Haemonchus contortus is a hematophagous nematode capable of clinically and sub-clinically affecting young and adult sheep. Cases of anemia are common due to severe blood loss, while low feed conversion is observed in production animals and there is often high mortality in young animals.

The control of gastrointestinal nematodes (GIN) is based on the use of broad-spectrum chemical drugs. The indiscriminate and irrational use of available chemical treatments has originated the phenomenon of Anthelmintic Resistance (AR), this problem has been reported worldwide and affects small ruminant producers.

Mezquite represents a natural resource of great importance for the inhabitants of the arid and semi-arid zones of the country, since it serves as fodder for domestic and wild animals due to its nutritional content. The objective of the study was to demonstrate the anthelmintic activity of the ethanolic extract of mezquite pods in the larval migration inhibition test.

The concentrations used for the ethanolic extract of mezquite pod were 25, 50, 150, 250 and 350 µg/ml. A negative control with PBS and two positive controls were used at concentrations of 0.125%, 0.25%, 0.5% and 1% levamisole and ivermectin.

In the study it was observed that the ethanolic extract of mezquite pod has a visible *in vitro* anthelmintic effect from the concentration of 150 µg/ml, inhibiting larval migration by 99%, then the concentration of 250 µg/ml has an inhibition of 96% and the concentration of 350 µg/ml an inhibition of 94%. As for the positive controls, the anthelmintic treatment with levamisole has an inhibition percentage of over 98.26%, in contrast to the ivermectin treatment where a percentage of 94.8% was found.

2. Introducción

El registro de la población de ovinos en México desde el 2012 hasta el año 2020 se ha mantenido alrededor de los 8 millones de cabezas (SIAP, 2021). Su principal distribución es, la región centro; cerca del 55%, región centro norte 23% y sur 16%. Sin embargo, el número de cabezas sigue siendo insuficiente ya que no se logra cubrir la demanda nacional de carne y seguimos dependiendo de las importaciones que están alrededor de las 6700 toneladas (Bobadilla-Soto 2021), esto se debe principalmente a los bajos índices productivos y reproductivos que generan los rebaños (Herrera-Haro *et al.*, 2019). Los sistemas de producción ovinos en el centro del país se caracterizan por ser extensivos en zonas rurales. Estos sistemas tienen la característica de ser zonas de pastoreo en áreas comunales. La interacción de varios rebaños sin información sobre las condiciones de salud predispone a los animales a contraer enfermedades virales, bacterianas y/o parasitarias (Vázquez-Martínez *et al.*, 2018).

Bajo condiciones de pastoreo, los animales están en estrecha relación con los nematodos gastrointestinales, sin embargo esto no quiere decir que todos los animales presentarán una parasitosis. Considerando el fenómeno de superdispersión, donde aproximadamente el 75% de los ovinos en pastoreo presentaran cargas de bajas a moderadas de nematodos gastrointestinales y solo el 25% de la población del rebaño presentará cargas altas, es aquí donde se encuentran los animales que serán candidatos a una desparasitación estratégica (DE), (Sréter *et al.*, 1994 y Hoste *et al.*, 2011). De una forma más sencilla esto se refiere a que muchos animales tendrán pocos parásitos y pocos animales tendrán muchos parásitos y esto está estrechamente relacionado con el sistema inmune del individuo y con el medio ambiente que lo rodea.

En estos rebaños encontramos dos extremos sobre la atención de los animales, o no reciben asesoría de un médico veterinario y no han tenido un tratamiento antihelmíntico que pueda beneficiar la producción o encontramos rebaños donde todos los animales son desparasitados sin ningún criterio y de forma repetida a lo largo del año, lo que ha propiciado la aparición del fenómeno de Resistencia

Antihelmíntica (RHA), lo que significa que los tratamientos para controlar los nematodos gastrointestinales ya no son efectivos (Kaplan, 2004).

Por esta razón se han buscado alternativas más sostenibles para los sistemas de producción y tratando de resolver esta problemática se ha investigado el uso de plantas con potencial nutracéutico, es decir plantas que puedan tratar y prevenir enfermedades, es este caso de origen parasitario (Waller, *et al.*, 2004).

El interés de realizar este estudio se basó en el uso potencial de la vaina del mezquite como nutracéutico ya que es un recurso de gran calidad nutricional que se consigue a bajo costo y es de fácil acceso para los productores, sobre todo de las regiones centrales del país donde se concentra la mayor cantidad de los sistemas de producción ovina y donde también coincide geográficamente el desarrollo de los árboles de mezquite (Ruíz-Tavares, 2011).

3. Marco Teórico

3.1 Situación mundial del sector de la carne de ovino.

Según las predicciones de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE) para el 2024 frente al continuo descenso en el consumo de carne ovina por parte de Europa, otras regiones del mundo aumentarán la demanda de este producto, sobre todo por parte de China y países del Medio Oriente. En la actualidad, China ya es el principal país consumidor de carne de cordero con cerca de 4 millones de toneladas al año, lo que representa casi el 30% del consumo total a nivel mundial. Australia siendo uno de los países con mayor número de cabezas de ovinos, centra sus esfuerzos para exportar su producción a China y a países del Medio Oriente, siendo la exportación de ovinos su principal actividad que impulsa la economía del país. Estos factores y otros como el cambio climático y sus consecuencias sobre los sistemas de producción obligarán a los principales países productores a buscar modelos de producción más sostenibles, ya que en la actualidad el consumidor está más concientizado sobre el cuidado del medio ambiente (Gómez-Alcalá, 2018).

3.2 Importancia de la ovinocultura en México

Los sistemas de producción de pequeños rumiantes muestran grandes coincidencias en los distintos países donde se desarrollan, sobre todo en Latinoamérica, ya que se localizan en zonas con climas extremos y en terrenos con difícil orografía (Bobadilla-Soto, *et al.*, 2017).

Históricamente, en México, los sistemas ovinos han estado en manos de los productores más marginados, con escasos recursos y alejados de los beneficios de la asistencia técnica. Sin embargo, cada vez es más frecuente el flujo de capital, lo que ofrece un panorama prometedor para estas empresas, en su mayoría, familiares (Cuéllar-Ordaz, 2003).

México cuenta con aproximadamente 8,725,882 cabezas de ovinos. Los principales estados productores de carne de ovino son: Estado de México, Hidalgo y Veracruz (SIAP, 2020).

La producción de ovinos se concentra en el centro del país con aproximadamente 3,167,444 cabezas, que representa el 35% de total nacional, y se obtienen 25,300 toneladas de carne en canal (SIAP, 2020), lo que contribuye al 42% de la oferta de carne en canal en el país (Desdémona-Martínez, 2019). El sistema de producción que predomina en el centro del país es el extensivo que se desarrolla en zonas rurales, el objetivo de este tipo de sistemas es el autoconsumo y el ahorro por parte de los productores (Vázquez-Martínez, *et al.*, 2018).

La ovinocultura, se caracteriza por ser una actividad secundaria a la agricultura, la cual depende de la mano de obra familiar, estos animales son alimentados mediante el pastoreo en zonas comunales y algunas veces complementan su dieta a base de granos o rastrojo de maíz, sobre todo en épocas de estiaje (Galaviz, *et al.*, 2011).

El principal producto comercializado es la venta de corderos para engorda o pie de cría (Vázquez-Martínez, *et al.*, 2018).

En las zonas templadas, se ha empleado la cruce de borregos de pelo con razas lanares, obteniendo cruces terminales que proveen y benefician el mercado de la producción de carne. Las razas que más sobresalen en el centro del país son; Pelibuey, Dorper, Katahdin, Blackbelly, Dorset, Texel, Hampshire, Charollais,

Ramboulliet, Corriedale, Suffolk y Romanov, que son criados en sistemas extensivos, semi-intensivos e intensivos y la carne se destina para platillos típicos de la región. Por otra parte, en los últimos años se ha incursionado en un nuevo mercado que son los cortes selectos, empacados al alto vacío como rack francés, rack americano, doble mariposa, filete y medallón de corderos (Desdémona-Martínez, 2019).

3.3 Sistemas de producción ovino en el centro de México

En la zona centro del país se encuentran los sistemas extensivos de zonas rurales, el objetivo de estas producciones son el autoconsumo, ahorro y en rebaños más grandes y tecnificados la comercialización de corderos para abasto y pie de cría. Las razas que mayormente se pueden encontrar son cruza de Suffolk, criollos, entre otras. La mano de obra para el manejo de estos rebaños es de tipo familiar y la alimentación de los animales se basa en el consumo de la vegetación nativa y el complemento con residuos de la agricultura que muchas veces funge como actividad primaria por parte de los productores (Vázquez-Martínez, 2018).

3.4 Nematodos gastrointestinales

El ganado ovino que se desarrolla en condiciones de pastoreo mantiene una estrecha relación con el medio ambiente, lo que provoca la incidencia de enfermedades parasitarias ocasionadas por nematodos gastrointestinales (NGI), esto origina bajos parámetros productivos y reproductivos y por consiguiente daños económicos en los sistemas de producción (Nari, 2011).

Los rumiantes que padecen infecciones severas por nematodos gastrointestinales manifiestan signos clínicos como diarrea, pérdida de peso, edema submandibular, anemia, debilidad y en casos agudos la muerte (Medina, *et al.*, 2014).

La nematodosis, es una de las causas más frecuentes de pérdidas económicas para los productores. Este problema se refleja en la reducción de la ganancia diaria de peso (hasta un 50%) y muertes (20-50%), sobre todo en animales jóvenes o mal alimentados, así como gastos por la atención y asistencia médica y terapéutica

(Luna-Palomera, *et al.*, 2010; Medina, *et al.*, 2014). Las especies de NGI que predominan en los sistemas de producción de ovinos en clima templado son: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Trichostrongylus axei*, *Teladorsagia circumcincta*, *Nematodirus* spp, *Chabertia ovina* y *Cooperia* spp (González-Garduño, *et al.*, 2011).

Para fines prácticos del presente estudio se profundizará únicamente sobre el nematodo *Haemonchus contortus*.

3.4.1 *Haemonchus contortus*

Haemonchus contortus es un nematodo gastrointestinal hematófago, el cual es responsable de afectar clínica y sub-clínicamente a ovinos jóvenes y adultos. Los casos de anemia son comunes y se presentan cuando la carga de parásitos adultos en el abomaso es alta, al ingerir gran cantidad de sangre, el huésped es incapaz de reponer las pérdidas (Bowman, 2020). Como consecuencia los animales del rebaño tienen una baja conversión alimenticia y en animales jóvenes la mortalidad es alta (Munguía-Xóchihua, *et al.*, 2013).

Esta especie de NGI, se localiza principalmente en el abomaso de los ovinos y caprinos. Los machos miden entre 10 y 20 mm, y son de un color rojizo uniforme. Las hembras miden entre 18 y 30 mm y su coloración es rojo con blanco, debido a que el aparato digestivo por la ingesta de sangre adquiere un color rojizo que se enrolla en espiral con el aparato reproductor que tiene una coloración blanquecina (Hernández-Barral, 2011).

El ciclo biológico de este parásito es directo (Figura 1). Los huevos son eliminados con las heces, estos eclosionan, para que posteriormente la larva 1 mude a larva 2; estas dos primeras fases larvianas permanecen en las heces, se alimentan de materia orgánica y microorganismos. Continuando con el ciclo de vida, la larva 2 muda a la larva 3, la cual es la infectante, esta conserva la cutícula de su estadio anterior que la cubre a modo de vaina y la aísla del medio exterior. Esta L3 migra hacia la hierba bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura. La L3 es ingerida con el pasto por los ovinos y aquí comienza el ciclo parasitario. En el rumen,

las larvas se liberan de la vaina que las protege y se introducen en las glándulas epiteliales de la mucosa abomasal, en la región del *fundus*, para continuar con su desarrollo. Las L4 aparecen en la superficie de la mucosa a los 4-5 días post infección y después de una nueva muda se transforman en L5 o pre-adulto que posteriormente maduran sexualmente para copular y producir huevos (Hernández-Barral, 2011).

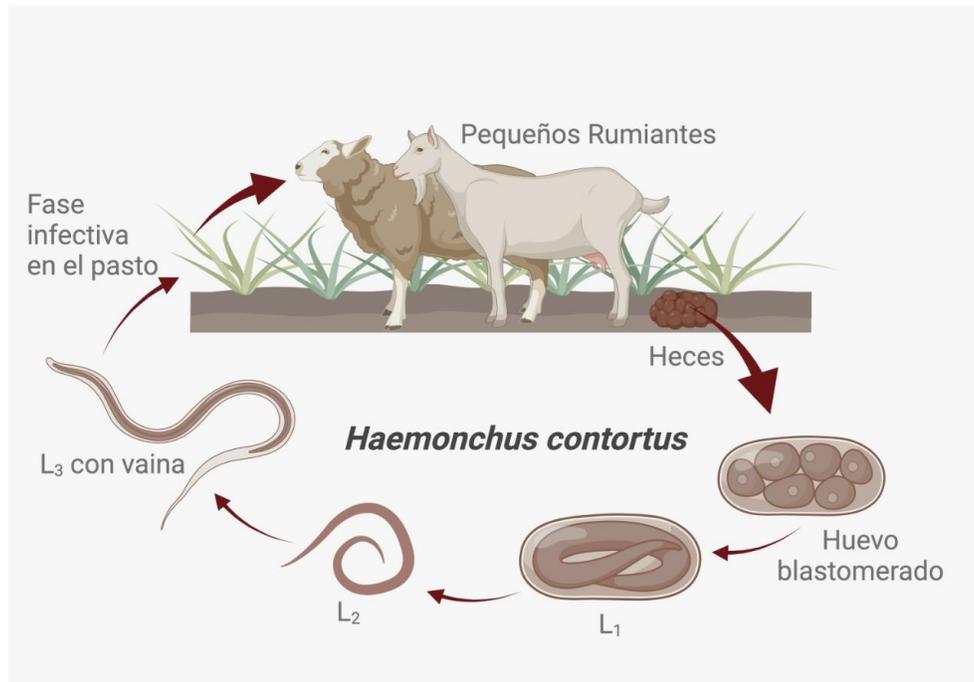


Imagen creada con BioRender.com, cuenta con licencia, prohibida su copia y distribución.

Figura 1. Ciclo biológico de los *Haemonchus contortus* en pequeños rumiantes.

Los estadios larvarios L4, L5 y los adultos son hematófagos, los parásitos adultos al tener un mayor tamaño también tienen mayor capacidad para alimentarse, pudiendo consumir hasta 0.05 ml de sangre al día (Soulsby, 1987).

3.5 Resistencia antihelmíntica

Desde hace 40 años y hasta la actualidad, con la aparición de desparasitantes de amplio espectro en el mercado, el control de los problemas por NGI se basa en el uso de antihelmínticos (AH) comerciales, los cuales se administran repetidamente

a todos los animales del rebaño. El uso frecuente y descontrolado de los AH ha provocado la aparición de NGI resistentes a los tres grupos de AH más comunes: benzimidazoles, imidazotiazoles y lactonas macrocíclicas. El problema de la Resistencia Antihelmíntica (RAH) es un problema mundial que también se presenta en los rebaños de pequeños rumiantes de México (Torres-Acosta, *et al.*, 2009).

La RAH es un fenómeno con distribución mundial que consiste en la disminución gradual de la efectividad antihelmíntica sobre los parásitos. Esta es una capacidad heredable que tienen los parásitos para sobrevivir a tratamientos que, a dosis terapéuticas, causan la inhibición del crecimiento o muerte de los individuos en una población susceptible. Actualmente se encuentra en expansión el fenómeno de multirresistencia, lo cual significa que hay pérdida de eficacia en todas las familias de antiparasitarios disponibles en el mercado (Martínez-Ortiz-de-Montellano, 2010; Medina *et al.*, 2014).

Debido a la RAH se han adoptado estrategias de control alternativo de NGI, muchas de las cuales han sido evaluadas y han disminuido el uso y la dependencia de fármacos, lo que ha permitido retrasar o evitar la resistencia (Torres-Acosta, *et al.*, 2009; Nari, 2011).

La RAH ha obligado a los veterinarios, productores y científicos a enfocar todos los esfuerzos de integrar varias estrategias y conjunto de herramientas para el control parasitario.

3.6 Manejo Integrado Parasitario

El Manejo Integrado Parasitario (MIP), es la combinación y utilización adecuada de los métodos de control parasitario, con la finalidad de mantener niveles aceptables de producción sin la eliminación total del agente causal (Martínez-Ortiz-de-Montellano y Torres-Acosta, 2011).

Dicho manejo se basa en tres principales ejes (Figura 2): 1) aumentar la respuesta del hospedero; 2) controlar al agente causal y 3) agotar la fuente de contaminación.



Imagen creada con BioRender.com, cuenta con licencia, prohibida su copia y distribución.

Figura 2. Tres principios del Manejo Integrado Parasitario.

3.6.1 Aumentar la respuesta del huésped

En este punto es importante recordar que una población de parásitos no tiene una distribución uniforme dentro de los individuos que fungen como huéspedes.

La coevolución entre los parásitos y el hospedero se define por Thomson (1984) como: “cambios recíprocos en especies interactuantes”.

En las interacciones parásito-hospedero se tiene la hipótesis que existe una coevolución en las asociaciones, esto quiere decir que cuando el parásito desarrolla un gen de virulencia, el hospedero monta un gen de resistencia, de esta forma convergen en equilibrio ya que al parásito no le conviene destruir a su huésped porque eso lo destruiría a él también, esta teoría de la coevolución es denominada “gen por gen” (Sánchez-Sánchez, 2005). Pero el equilibrio que existe entre el parásito y el hospedero se puede llegar a romper por diferentes causas, por ejemplo

enfermedades que deterioren la salud del animal, una mala alimentación o cualquier factor que debilite el sistema inmune del animal.

Dentro de este eje existen herramientas que ayudan a mejorar el sistema inmune de los animales, por ejemplo, mejorar la alimentación, suplementación estratégica y uso de vacunas.

Estudios realizados previamente han demostrado que mejorar la alimentación en los individuos del rebaño aumenta la resiliencia y la resistencia de los animales parasitados. El desarrollo de la inmunidad en un animal parasitado conlleva un gasto metabólico de origen proteico importante, ya que el animal debe montar una respuesta produciendo: mucus, leucocitos, eosinófilos, mastocitos, citocinas y en el caso de parásitos hematófagos una eritropoyesis activa para compensar la pérdida de sangre (Aguilar-Caballero *et al.*, 2013). Una dieta con una mayor cantidad de proteína ha demostrado una disminución en los daños fisiopatológicos de corderos infectados artificialmente con *Haemonchus contortus*, es decir mostraron valores menores en cuanto al grado de pérdida de sangre y de hipoalbuminemia (Wallace *et al.*, 1995, Luna-Palomera *et al.*, 2010). En otros estudios se ha demostrado que individuos a pesar de presentar una parasitosis, al momento de aumentar la ingesta de proteína o de complementar el pastoreo con una fuente proteica, los animales tienen ganancias de peso positivas (Van-Houtert y Sykes, 1995; Luna-Palomera *et al.*, 2010; Aguilar-Caballero *et al.*, 2013). Analizando la evidencia al respecto, se creía que solamente la proteína contribuía de manera importante a la inmunidad innata y adquirida de los animales infectados con nematodos gastrointestinales sin embargo, diversos estudios han demostrado que agregar fuentes de energía en la dieta de estos animales ayuda al desarrollo de células y proteínas que contribuyen a la inmunidad (Van-Houtert y Sykes, 1996; Luna-Palomera *et al.*, 2010).

Otra herramienta disponible para el control de *H. contortus* es la vacunación, aunque sigue siendo una medida poco viable para los sistemas de producción en México. Existe una vacuna disponible para Australia, Sudáfrica y algunas regiones de Reino Unido, esta vacuna se llama *Barbervax Wirevax* y es una mezcla de antígenos de la membrana intestinal del parásito, sin embargo se utilizan antígenos nativos, lo

que ha tenido buenos resultados para los rebaños de los países antes mencionados, pero no en otras partes del mundo. Recientemente se encontró un antígeno somático denominado Hc23 que ha dado resultados prometedores, hasta un 80% de reducción en la excreción de huevos, la obtención de una vacuna recombinante que sea efectiva en todos los rebaños del mundo sigue siendo un reto que necesita de investigaciones más profundas (Claerebout y Geldhof, 2019).

3.6.2 Agotar la fuente de contaminación

En este punto es importante mantener el refugio, ya que el 95% de los nematodos gastrointestinales se encuentran en las praderas donde pastorean los ovinos. El refugio es la proporción de parásitos que no han sido expuestos a una medida de control, ya que viven fuera del huésped y no han desarrollado genes de resistencia a los fármacos que se administran a la población parasitaria que vive dentro del animal que corresponde solo al 5% (Van-Wyk, 2001; Nari, 2011).

Para mantener las praderas con bajas cargas parasitarias existen varias estrategias, como el uso de un pastoreo rotacional, esta herramienta proporciona un descanso a la pradera para su recuperación y su exposición prolongada a los rayos del sol permite la desecación de las larvas infectante de *H. contortus* (Vázquez-Hernández, *et al.*, 2006). Otra alternativa existente, pero poco conocida, es la recolección de heces de las praderas, esta actividad disminuye la carga parasitaria de los potreros, disminuyendo la fuente de contaminación (Corbett, *et al.*, 2014). Los huevos de NGI no tienen la oportunidad de eclosionar ni de llegar a ser larvas infectivas y un beneficio para los productores es vender el estiércol como subproducto.

Por otro lado existen organismos que son antagonistas naturales de los NGI, como por ejemplo, bacterias, ácaros y hongos.

Se ha identificado que la bacteria *Pasteuria* sp. tiene una afinidad que ronda entre 0-40% para adherirse a diferentes estadios de *H. contortus*, disminuyendo así la población de este parásito. También se ha estudiado la capacidad depredadora del ácaro *Lasioseius penicilliger*, disminuyendo la población de larvas infectantes de *H. contortus* alrededor de un 80% (Aguilar-Marcelino, 2012). Otra herramienta es el

uso de hongos hematófagos como *Duddingtonia flagrans* que tienen la capacidad de disminuir poblaciones entre un 40% hasta un 90% de los géneros: *Ostertagia circumcincta*, *H. contortus* y *Trichostrongylus colubriformis* (González-Garduño, 2006).

3.6.3 Controlar al agente causal

En la actualidad, el control de los problemas por NGI se basa en el uso de antihelmínticos (AH) comerciales, repetidamente a todos los animales del rebaño. El uso frecuente y descontrolado de los AH ha provocado la aparición de NGI resistentes a los tres grupos de AH. La problemática de parásitos resistentes a las drogas es un problema mundial que también se presenta en los rebaños ovinos de México. Para evitar la aparición de NGI resistentes a los AH es necesario reducir el uso de AH en los animales de los rebaños. Para esto se están desarrollando sistemas de desparasitación que se basan en tratar farmacológicamente únicamente a aquellos animales que realmente lo necesiten, a esto se le denomina Desparasitación Estratégica (DE), (Torres-Acosta *et al.*, 2009; Medina *et al.*, 2014). La DE se basa en umbrales clínicos, un umbral clínico se define como: Nivel de carga parasitaria en un rebaño o hato, en el cual se evitan pérdidas económicas en la producción animal, al aplicar un método de control en tiempo y forma. En este caso, los umbrales clínicos a consideración son: la condición corporal (C.C), el método FAMACHA® y la carga parasitaria (HPG), mediante la técnica de McMaster. Es decir, se busca evitar desparasitar a aquellos ovinos que tienen infecciones moderadas o bajas de NGI (Martínez-Ortiz-de-Montellano y Torres-Acosta, 2011). Esto se basa en algunos principios importantes:

- ✓ En un rebaño de ovinos es normal encontrar animales con poblaciones bajas o moderadas de NGI en su tracto gastrointestinal.
- ✓ La presencia de poblaciones bajas o moderadas de NGI puede representar en los animales una parasitiasis, esto significa, que los ovinos son capaces de tolerar y defenderse por sí mismos de los parásitos. Incluso pueden mantener una producción óptima (ganar peso, reproducirse, producir leche) si tienen una buena nutrición.

- ✓ Los trabajos realizados con poblaciones de ovinos de México demuestran que solo una minoría de ovinos que pastorean tienen NGI en cantidades elevadas (20 a 25% de toda la población). Y solo estos animales pueden tener problemas de salud relacionados con los parásitos. En una población o rebaño cuando obtenemos el número de HPG y lo graficamos, obtendremos tres tipos de individuos, bajos eliminadores que corresponden del 20-25%, medianos eliminadores que conforman el 50% y por último los altos eliminadores que son del 20-25% de los individuos en la población, este fenómeno se conoce como superdispersión u overdispersion en inglés (Sréter *et al.*, 1994; Hoste *et al.*, 2002; Hoste *et al.*, 2011).
- ✓ Los únicos animales que necesitan ser desparasitados son los que tienen cantidades elevadas de parásitos. Sin embargo, debido a que los NGI son internos, es difícil saber cuáles animales están muy parasitados sin contar con un apoyo de diagnóstico.
- ✓ Si el productor solo desparasita a los ovinos que lo necesitan, los demás pueden vivir en óptimas condiciones y no disminuir sus parámetros productivos (Torres-Acosta *et al.*, 2009).

El uso de antihelmínticos para el control de NGI ha sido efectivo durante varios años, pero a nivel mundial, su uso indiscriminado ha disminuido la eficacia de estos tratamientos. Debido a la RHA se han adoptado estrategias de control alternativo de NGI, muchas de las cuales han sido evaluadas y han disminuido el uso y la dependencia de fármacos (Torres-Acosta *et al.*, 2012; Medina *et al.*, 2014).

La disponibilidad de nuevos fármacos antiparasitarios está comprometida por el aumento de los casos de resistencia y los costos de investigaciones para el desarrollo de nuevas drogas (Smith *et al.*, 2015). Por toda esta problemática es necesario proponer estrategias de control disponibles para los productores, que tengan como objetivo un uso racional de los antiparasitarios.

Dentro de la quimioterapia no convencional se encuentra el uso de plantas con potencial nutracéutico, que aparte de controlar poblaciones de parásitos

gastrointestinales son una fuente importante de macronutrientes que pueden ayudar a la salud de los animales.

3.7 Nutracéuticos

El término nutracéutico fue creado a finales de 1989 por el Dr. Stephen DeFelice, Presidente de la Fundación para la Innovación en Medicina (Foundation for Innovation in Medicine FIM). Son sustancias químicas o biológicas activas que pueden estar como componentes naturales en los alimentos o adicionarse. Los nutracéuticos se caracterizan por ser profilácticos a diferencia de las drogas químicas que se utilizan para tratar un padecimiento ya presente. (Pérez-Leonard, 2006).

- Son alimentos con un beneficio médico a la salud, incluida la prevención y el tratamiento de alguna enfermedad.
- También se conocen como alimentos funcionales, lo que significa que ellos y sus componentes pueden proporcionar un beneficio para la salud más allá de la nutrición básica (Pérez-Leonard, 2006).

Gran cantidad de hierbas y plantas de nuestro país han estado en uso desde la antigüedad, demostrando que desempeñan un papel importante en la prevención de enfermedades. Además de contar con un perfil de macro y micronutrientes que ayudan a mejorar la salud. En el control de NGI se han utilizado múltiples plantas con compuesto bioactivos que tienen actividad antihelmíntica, dentro de estos compuestos se han identificado: taninos, alcaloides, terpenos, saponinas, entre otros (Alonso-Díaz *et al.*, 2009).

El uso de plantas bioactivas con potencial nutraceútico son consideradas como una alternativa sustentable para el control de NGI como *H. contortus*.

3.7.1 Plantas nutracéuticas: Son aquellas que tienen propiedades curativas y nutritivas (Martínez-Ortiz-de-Montellano, 2017).

El uso de plantas nutracéuticas no se impone como los tratamientos basados en plantas medicinales, estas se ofrecen durante un periodo relativamente largo de

semanas o meses y su eficacia dependerá del consumo voluntario del individuo. La bioactividad de estas plantas también dependerá de los metabolitos secundarios que contengan, ya sea por ejemplo: taninos condensados, flavonoides, polifenoles, etc. y se sabe que estos compuestos pueden ser variables dependiendo de la época del año, edad de la planta y de la parte de la misma que se utilice (Hoste *et al.*, 2015).

Para la selección de plantas con potencial nutracéutico como control contra parásitos se deben tener ciertas consideraciones: a) Demostrar su efecto AH *in vitro*. b) Tener un perfil de macronutrientes adecuado con niveles de medios a altos de proteína o energía y bajo en lignina, se debe evaluar su digestibilidad *in vitro* de MS. b) Debe ser un alimento que los animales consuman fácilmente es decir que tenga niveles adecuados de consumo y aceptación. c) Tener una digestibilidad *in vivo* que permita cumplir con los requisitos fisiológicos del animal. d) Se deben evaluar los factores negativos que la planta pueda representar para la producción o la salud del animal. e) El paso final es evaluar su efecto AH *in vivo* (Hoste *et al.*, 2015).

Consideraciones:

- Las sustancias bioactivas solo son efectivas para algunos parásitos.
- Existen helmintos resistentes naturalmente.
- Hay diferencia en la susceptibilidad de los metabolitos secundarios entre cepas de la misma especie.
- En las pruebas *in vivo* el microbioma ruminal puede tener influencias sobre la efectividad.
- Se deben evaluar los efectos tóxicos de los compuestos bioactivos.
- Los efectos *in vitro* pueden ser diferentes a los esperados *in vivo*.

3.7.2 *Prosopis* spp (Mezquite)

La palabra mezquite procede del náhuatl mizquitl. El mezquite es un árbol o arbusto, una especie botánica de plantas espinosas leguminosas que pertenecen a la familia *Leguminosae*, subfamilia *Mimosoideae*, y género *Prosopis*, los cuales se distribuyen principalmente en las zonas áridas y semiáridas del mundo. Este género está representado por arbustos de tamaño mediano o árboles frondosos de tronco mediano, aunque en sitios de buena disponibilidad de agua, puede alcanzar hasta los 20 m de altura y diámetros mayores a 1 m (Román-Pérez, 2016).

En la actualidad se le considera como un recurso con potencial forrajero, combustible y de construcción. Las zonas donde se localiza este árbol sirven como refugios para la fauna silvestre, fuente de néctar para las abejas y otros insectos. También es importante para la retención de suelo ya que evita la desertificación (Rodríguez-Sauceda, 2014).

La vaina del mezquite se dispone en forma drupáceo; alargadas, rectas o arqueadas y en algunos casos en forma de espiral, indehiscentes, de 3 a 30 cm de longitud, pueden ser planas o cilíndricas en la madurez, y contienen de 12 a 20 semillas; la cáscara o pericarpio es coriácea, de color paja a rojizo-violáceo. La fructificación se extiende durante los meses de mayo a agosto en la zona centro del país (Pérez, 2016).

Las vainas de *Prosopis spp.* prometen ser un recurso alternativo de alimentación que puede ser utilizado por las industrias de procesamiento de alimentos para el ganado ya que representa una fuente importante de proteína cruda, como se observa en el Cuadro 1. La utilidad de las vainas en la alimentación del ganado ha sido reportada anteriormente. Este recurso representa una fuente de complementación alimenticia de bajo costo, sobre todo en aquellas explotaciones donde los recursos económicos son escasos (Armijo-Nájera, *et al.*, 2019).

Cuadro 1. Composición química de vainas de mezquite con distinto nivel de maduración (tomado de Armijo-Nájera *et al.*, 2019).

Vainas	MS (%)	FDA (%)	FDN (%)	CEN (%)	NT (%)	PC (%)	GRA (%)	FC (%)
Tiernas 65 días post floración	87.83 ^a	28.50 ^a	40.58 ^a	3.78 ^b	1.79 ^a	11.20 ^a	0.06 ^a	0.14 ^a
Maduras 75 días post floración	85.27 ^a	30.91 ^a	43.9 ^a	4.11 ^a	1.92 ^a	12.05 ^a	0.07 ^a	0.15 ^a

MS=materia seca; FDA= fibra detergente ácida; FDN= fibra detergente neutra; CEN= cenizas; NT= nitrógeno total;
PC= proteína cruda; GRA= grasa; FC= fibra cruda.
Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey, 0.05).

El género *Prosopis laevigata*, también llamado mezquite blanco, posee una extensa distribución natural en México (ver Figura 3). Se le ha identificado en distintos estados, entre los cuales destacan Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí y Veracruz (Palacios *et al.*, 2016).



Figura 3. Mapa de distribución de *Prosopis laevigata* en México (tomado y modificado de Palacios-Romero *et al.*, 2016).

Estudios previos (Cuadro 2), han comprobado la actividad antihelmíntica de plantas del género *Prosopis*. En un estudio realizado en 2008, se analizaron 20 extractos de diferentes plantas, de las cuales el mezquite tuvo éxito como larvicida de *H.*

contortus. El extracto hexánico (disolvente) de *P. laevigata* de tallo y hojas combinadas, produjo 51%, 81% y 86% de mortalidad larval a las 24, 48 y 72 h después de la exposición, respectivamente (estudio *in vitro*). (López-Aroche *et al.*, 2008). Se continuó con el estudio y se probó el mismo extracto hexánico en gerbos infectados artificialmente con larvas de *H. contortus*, observándose una reducción de 42.5% en la población de parásitos. La importancia del estudio fue evidenciar su actividad antihelmíntica *in vivo*, lo que motiva a continuar estas investigaciones en pequeños rumiantes (De Jesus-Gabino, *et al.*, 2008).

Otros estudios relacionados con el mezquite, comprobaron la actividad ovicida de NGI de la fracción de acetato de etilo de la vaina *Prosopis juliflora*, que es rica en alcaloides; el alcaloide responsable de esta respuesta se identificó como juliprosopina (Goncalves-Lima, *et al.*, 2017). En otros estudios relacionados con el mismo género y especie dieron resultados significativos sobre la inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* con un extracto etanólico en PBS y con un extracto etanólico encapsulado (Rechab *et al.*, 2014; Cheruiyot, *et al.*, 2015).

Por lo tanto, el presente estudio estará enfocado en estudiar la actividad antihelmíntica *in vitro* de la vaina de mezquite con la finalidad de incluirlo como un posible nutraceutico en la producción ovina de nuestro país.

Cuadro 2. Actividad antihelmíntica de plantas del género *Prosopis* sobre *Haemonchus contortus*.

Planta	Nematodo	Solvente	Actividad %	País	Referencia
<i>P. juliflora</i>	<i>Haemonchus contortus</i> (ovicida)	Acetato de etilio	90.0	Brasil	Goncalves-Lima, et al., 2017
<i>P. laevigata</i>	<i>Haemonchus contortus</i> (desenvaine).	N-hexano	51.0, 81.0 y 86.0	México	López-Aroche <i>et al.</i> , 2008
	<i>Haemonchus contortus</i>	N-hexano	42.5	México	De Jesus-Gabino, <i>et al.</i> , 2008.

	Estudio <i>in vivo</i>				
<i>P. juliflora</i>	<i>Haemonchus contortus</i> (ovicida)	Etanol	95.0	Kenia	Rechab et al., 2014
<i>P. juliflora</i>	<i>Haemonchus contortus</i> Inhibición de la eclosión de huevos	Etanol	90.07	Kenia	Cheruiyot et al., 2015

4. Justificación

En los sistemas de producción ovina el control de nematodos gastrointestinales se basa en el uso de antihelmínticos comerciales, su uso indiscriminado y constante ha propiciado la aparición del fenómeno de Resistencia Antihelmíntica. El reto actual es encontrar alternativas más sostenibles para mantener poblaciones de parásitos susceptibles a los antihelmínticos. El uso de plantas con potencial nutracéutico es una estrategia que ayuda al control del agente causal y a aumentar la respuesta inmune de los huéspedes.

En la región central de México, se concentra la mayor parte de las producciones ovinas y además, cuenta con una orografía óptima para el crecimiento de árboles de mezquite, su fruto, la vaina ha mostrado ser un alimento disponible para los animales con una buena calidad de macronutrientes y con metabolitos de acción antihelmíntica.

Por lo tanto, en este trabajo se evaluará el efecto antihelmíntico de la vaina del mezquite sobre larvas infectantes de *H. contortus*.

5. Hipótesis

Al evaluar la vaina del mezquite como un posible nutracéutico se observará un efecto antihelmíntico sobre larvas infectantes de *H. contortus*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Demostrar la actividad antihelmíntica del extracto etanólico de la vaina del mezquite sobre larvas de *H. contortus* para su posible uso nutracéutico a través de la prueba de Inhibición de la Migración Larvaria.

6.2 Objetivos específicos

- Probar el efecto antihelmíntico *in vitro* de los extractos vegetales de la vaina del mezquite mediante la prueba de inhibición de la migración larvaria.
- Probar diferentes concentraciones del extracto etanólico de la vaina del mezquite para determinar su potencial antihelmíntico mediante la prueba de Inhibición de la Migración Larvaria.
- Comparar la actividad antihelmíntica de los extractos etanólicos de la vaina del mezquite con drogas comerciales mediante la prueba de Inhibición de la Migración Larvaria sobre larvas infectante de *H. contortus*.

7. Materiales y Métodos

7.1 Recolección de la vaina del mezquite

Durante el mes de agosto del año 2020 se inició con la recolección de la vaina del mezquite en San Lucas Xolox, este lugar se localiza en el municipio de Tecámac, en la región norte del Estado de México. Presenta lluvias en verano y predomina el clima seco en invierno. La temperatura media anual en San Lucas Xolox es 21°C y la precipitación media anual es 599 mm. La literatura menciona que la fructificación del árbol de mezquite se extiende entre los meses de mayo hasta agosto; al realizar las entrevistas pertinentes a los productores de la zona se mencionó que esta fructificación se puede extender hasta el mes de septiembre, sin embargo, por la concentración de lluvias en la zona el fruto se descompone muy rápido

Durante la recolección de la vaina se iba verificando su integridad, evitando recoger las vainas maltratadas o con presencia de insectos. Aproximadamente se recogieron 25 kg y durante los días posteriores se dejaron secar perfectamente, se almacenaron en costales y se protegieron tanto de la luz como de la humedad y/o lluvia.

7.2 Obtención de las hembras de *Haemonchus contortus*

Para la obtención de las hembras de *H. contortus*, se procedió a visitar una granja en Tepotzotlán, Estado de México, para localizar a un ovino con signos clínicos sugerentes a haemoncosis y así poder obtener los parásitos de interés. Las actividades realizadas se muestran en la Figura 4. Durante la visita, el propietario se encontraba realizando una necropsia, la cual se aprovechó para poder recuperar el abomaso del animal. El animal presentaba los siguientes umbrales clínicos:

I.D	FAMACHA©	C.C	HPG	Observaciones
1 (hembra)	4	1	20,450	Postración, diarrea

Una vez que el propietario nos proporcionó el órgano de interés, se procedió a calentar agua purificada a 37°C para poder mantener a las hembras de *H. contortus* viables. También se tenían listas las placas para cultivo (Figuroa-Castillo *et al.*, 2000).

El abomaso se abordó de manera inmediata debido a que el cambio de temperatura provoca que las hembras de *H. contortus* se estresen y ovipositen. Inmediatamente, se incidió sobre la curvatura mayor del abomaso y expuesta la mucosa se colocó sobre una charola de metal para poder visualizar y extraer los parásitos. (Figuroa-Castillo *et al.*, 2015).

En placas de cultivo de 12 pozos, se llenó cada uno con hasta $\frac{3}{4}$ partes de agua a 37°C y se colocaron de 4-5 hembras de *H. contortus* con ayuda de un pincel o una asa bacteriológica de plástico. Para asegurarnos que solo se estaban recolectando hembras del género *H. contortus*, se revisaba detenidamente la morfología, recordando que las hembras miden entre 18 y 30 mm, y en su coloración se alternan el rojo y el blanco, debido a que el aparato digestivo, rojizo por la ingesta de sangre, se enrolla en espiral alrededor del reproductor, blanquecino. Una vez que las placas estaban listas, se iban colocando en una hielera de unicel para evitar que perdieran calor. De esta manera se llenaron 22 placas, se acomodaron en la hielera y se transportaron a la FMVZ-UNAM.

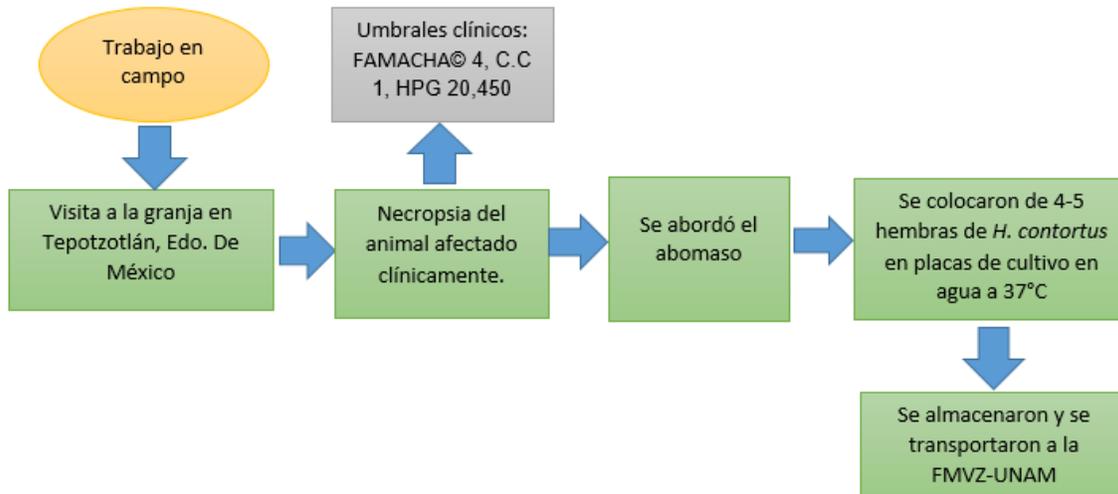


Figura 4. Actividades realizadas en campo para la obtención de hembras de *H. contortus*.

En la Figura 5 se muestran las actividades realizadas en el laboratorio de la FMVZ y en CEPIPSA. Transcurridas 4 horas entre el tiempo de traslado y acomodo de las placas en la incubadora del laboratorio con una temperatura de 30°C y aproximadamente 75% de humedad, se comenzaron a retirar las hembras de *H. contortus* de los pozos de las placas que ya habían terminado de ovipositar. Aleatoriamente algunas se fijaron en alcohol al 70% para su estudio posterior. Se procuró dejar lo más limpio posible los pozos de las placas de cultivo para poder visualizar mejor los huevos y días después las larvas. Los huevos fueron incubados en esas mismas placas a 30°C durante 6 días. Diariamente se monitoreaba la humedad de los pozos. Al tercer día, post incubación, se empezaron a visualizar larvas en el microscopio estereoscópico.

Al sexto día post incubación, todo el líquido de los pozos con las larvas, se pasó a matraces de cultivo celular de 50 mL, estos fueron aforados hasta 40 mL para que las larvas tuvieran espacio para oxigenar. Así se llenaron 24 matraces, previamente identificados y se conservaron en refrigeración para mantener a las L3 de *H. contortus* (Figueroa-Castillo *et al.*, 2000).

Al siguiente día, se sacaron los matraces de refrigeración y se decantó 10 mL de líquido, las larvas no fueron afectadas durante este manejo ya que por el efecto de la refrigeración quedan en el fondo del matraz.

Una vez que todos los matraces fueron aforados a 30 mL, se procedió a realizar el conteo aproximado de las larvas para sacar un estimado del total. Para realizar esto, se obtuvieron 12 gotas de 20 μ L cada una, sobre un porta objetos, para su observación. En cada gota se contó el número de larvas vivas observadas (Figuroa-Castillo *et al.*, 2015).

Posteriormente, se prepararon dos dosis en matraces de cultivo de 500 mL para infectar artificialmente a los borregos receptores de las larvas infectantes de *H. contortus*, se calculó que aproximadamente cada borrego recibiera una dosis de 5000 L3. En el CEPIPSA (Centro de Enseñanza Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal) se seleccionaron a dos borregos que serían los receptores de las larvas infectantes, se analizaron los umbrales clínicos de FAMACHA®, condición corporal y HPG, los cuales se presentan en el Cuadro 3, esto con el fin de determinar que estuvieran libres de parásitos que pudieran influir en la investigación. Este proyecto fue aceptado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales (CICUA).

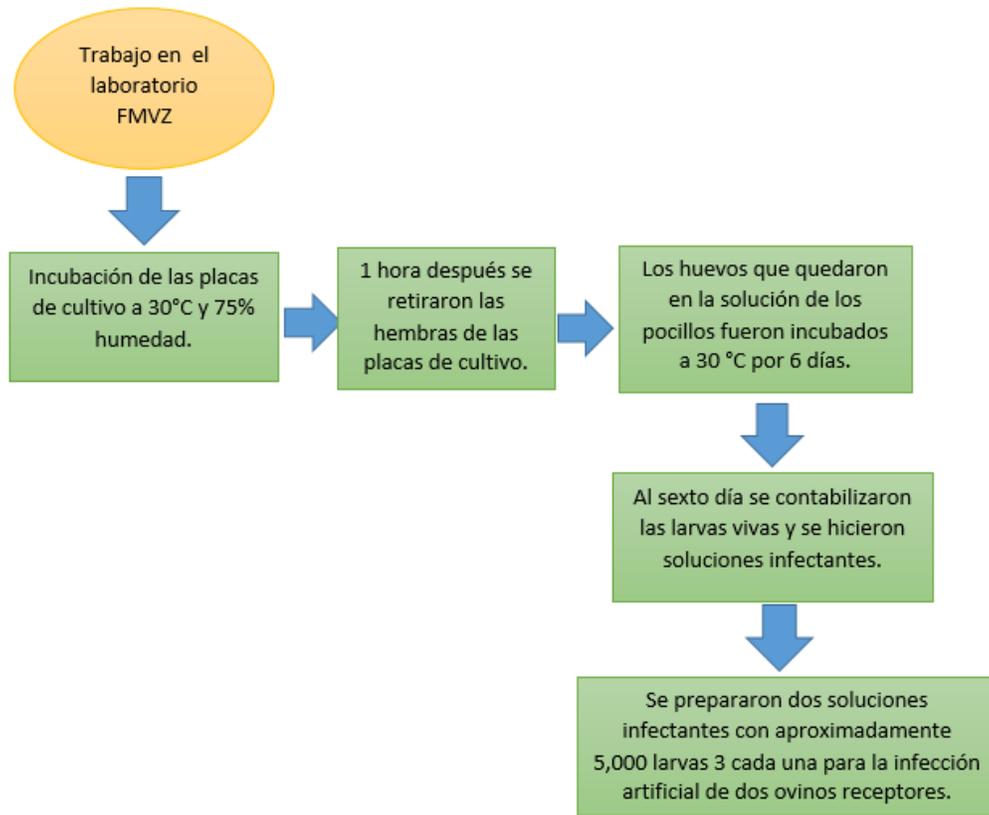


Figura 5. Actividades realizadas en la FMVZ-UNAM y CEIPSA.

Cuadro 3. Umbrales clínicos encontrados en los ovinos receptores de la cepa.

I.D	FAMACHA®	C.C	HPG
Borrego 1	1	4	0
Borrego 2	1	3.5	0

A los animales se les dio seguimiento para verificar el establecimiento de la infección, alrededor del día 24 post infección se empezaron a visualizar huevos mediante la técnica de McMaster y el primer coprocultivo se realizó al día 26 post infección siguiendo la metodología de Corticelli y Lai (1963) en el laboratorio de investigación en parasitología con número 3304 de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Las larvas obtenidas de los coprocultivos se utilizaron en la prueba *in vitro*.

La técnica de Corticelli y Lai (1963), consistió en el uso de dos cajas de Petri, como se observa en la Figura 6, una con un tamaño de 10 cm de diámetro que contenía

el material de cultivo y fue colocada dentro de otra mayor (15 cm de diámetro) con agua a una altura de 1 cm, aproximadamente.

- La caja de menor diámetro va sin tapa dentro de la caja de Petri con mayor diámetro, la cual si requiere estar tapada. Así se formó una "cámara húmeda" con el cultivo, se colocó en la incubadora a una temperatura de 28°C durante 12 días.
- Diariamente se monitoreaba que la caja tuviera suficiente agua y que el material de cultivo estuviera húmedo. Transcurridos los 12 días, se invirtió la caja de Petri de menor diámetro con cultivo dentro de la caja de mayor diámetro y se dejó durante 12 horas.
- Al término de este tiempo la mayoría de las larvas pasaron al agua. Se observó que con este método se recupera un mayor porcentaje de larvas y además se obtuvo una suspensión de ellas más limpia, libre de partículas orgánicas y de tierra.



Figura 6. Técnica de cultivo larvario de Corticelli y Lai (1963).

7.3 Prueba *in vitro*

Siguiendo los lineamientos de Kotze *et al* (2006), se realizó la prueba de Inhibición de la Migración Larvaria LMI (por sus siglas en inglés) en el laboratorio del Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica.

La prueba de LMI se basa en medir la migración larvaria *in vitro* del parásito de interés. El principio de la prueba es evaluar la capacidad que tienen las larvas para migrar y atravesar un tamiz después de la exposición a diferentes drogas o extractos de plantas, el tamiz ayuda a la separación de las larvas móviles (vivas) de las inmóviles (muertas).

7.3.1 Preparación de las soluciones

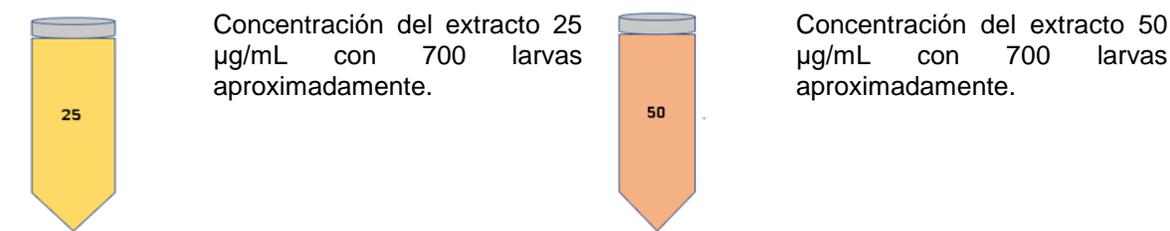
Del extracto vegetal de la vaina de *Prosopis laevigata* (mezquite) se prepararon soluciones a concentraciones de 25, 50, 150, 250 y 350 µg/ml de los extractos con PBS. Para las soluciones de levamisol (Levamisol al 5% SIGMA) se prepararon con PBS en concentraciones de: 1%, 0.5%, 0.25% y 0.125%. Para las de ivermectina (Ivermectina SIGMA) se prepararon con DMSO en concentraciones de: 1%, 05%, 0.25% y 0.125%.

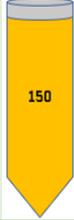
Todas las soluciones se conservaron a 4°C un día antes de su utilización y dos horas antes de su uso se pusieron a temperatura ambiente.

7.3.2 Incubación

La incubación se llevó a cabo en tubos falcon de 50 mL, donde se colocaron las diferentes concentraciones del extracto vegetal, levamisol, ivermectina y 700 L3 de *H. contortus* (ver Cuadro 7). Se incubaron durante 3 horas a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C).

Cuadro 4. Diluciones preparadas con el extracto etanólico de la vaina del mezquite y solución larvaria.



	Solución de PBS con 800 larvas aproximadamente.		Concentración del extracto 150 µg/mL con 700 larvas aproximadamente.
	Concentración del extracto 250 µg/ml con 700 larvas aproximadamente.		Concentración del extracto 350 µg/ml con 700 larvas aproximadamente.
	Concentración de levamisol al 0.125% con 100 larvas aproximadamente.		Concentración de levamisol al 0.25% con 100 larvas aproximadamente.
	Concentración de levamisol al 0.5% con 100 larvas aproximadamente.		Concentración de levamisol al 0.5% con 100 larvas aproximadamente.
	Concentración de Ivermectina al 0.125% con 100 larvas aproximadamente.		Concentración de Ivermectina al 0.25% con 100 larvas aproximadamente.
	Concentración de Ivermectina al 0.5% con 100 larvas aproximadamente.		Concentración de Ivermectina al 1% con 200 larvas aproximadamente.

Después de incubar los tubos falcon y con la finalidad de retirar los compuestos de los extractos vegetales y el levamisol, las L3 fueron centrifugadas a 2500 RPM durante 3 minutos y lavadas con agua destilada, este paso se repitió dos veces y al final se volvieron a lavar con agua destilada. El volumen de la solución larvaria

correspondiente a cada tubo quedó de la siguiente manera como se muestra en la Figura 7 y Figura 8.

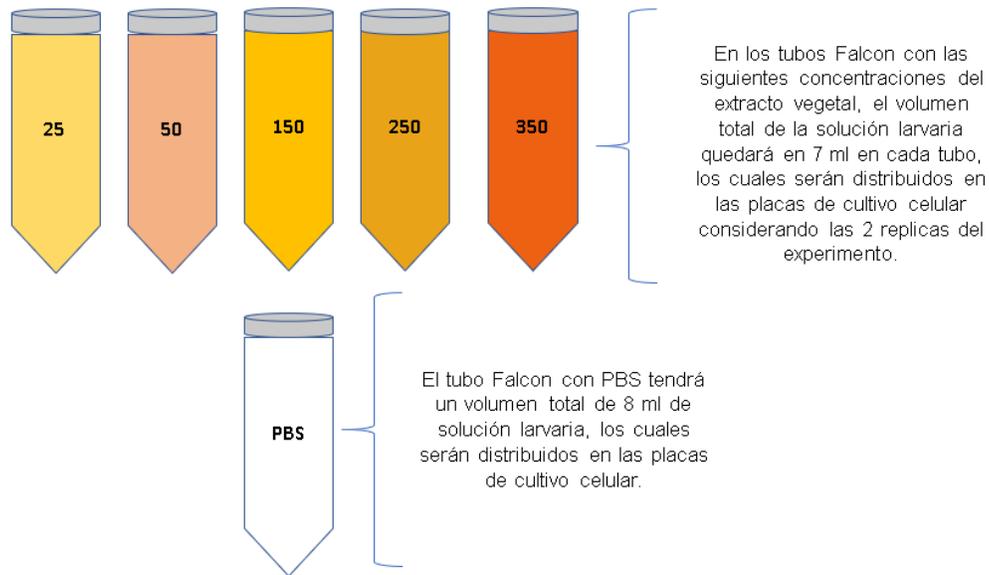
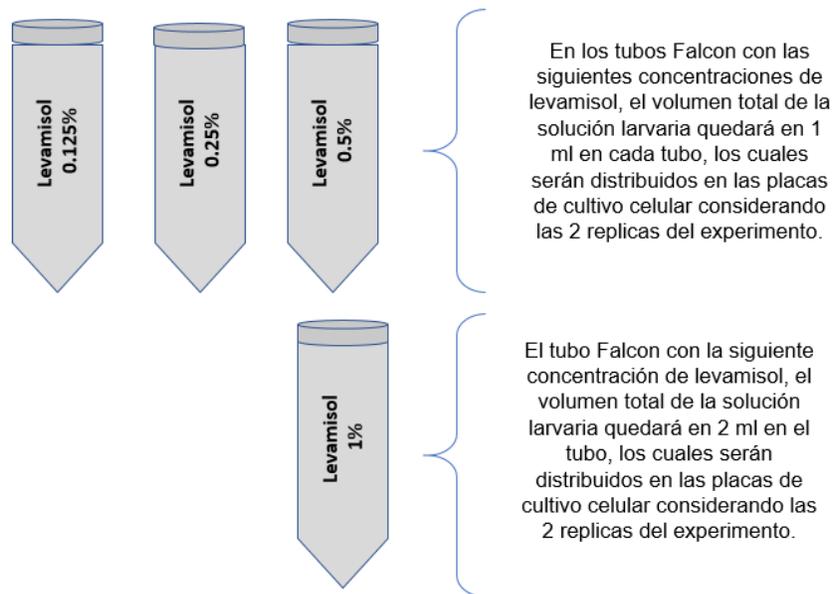


Figura 7. Volumen final de los tubos falcon dependiendo de la concentración del extracto vegetal y de PBS.



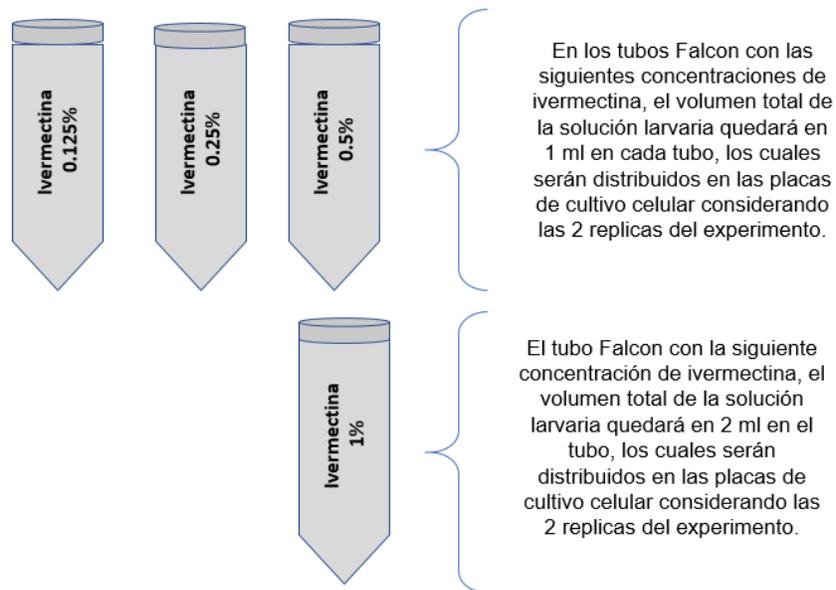


Figura 8. Volumen final de los tubos falcon dependiendo de la concentración de levamisol o ivermectina.

7.3.3 Preparación de las placas de cultivo

En placas de cultivo celular de 48 pocillos, como se muestra en la Figura 9, se depositó 0.5 ml de PBS en cada pocillo. Posteriormente se fueron acomodando los insertos con una malla de nylon de 25 micras, revisando la permeabilidad entre la malla y el PBS, de esta forma se evitó que quedaran atrapadas las L3 en burbujas de aire.

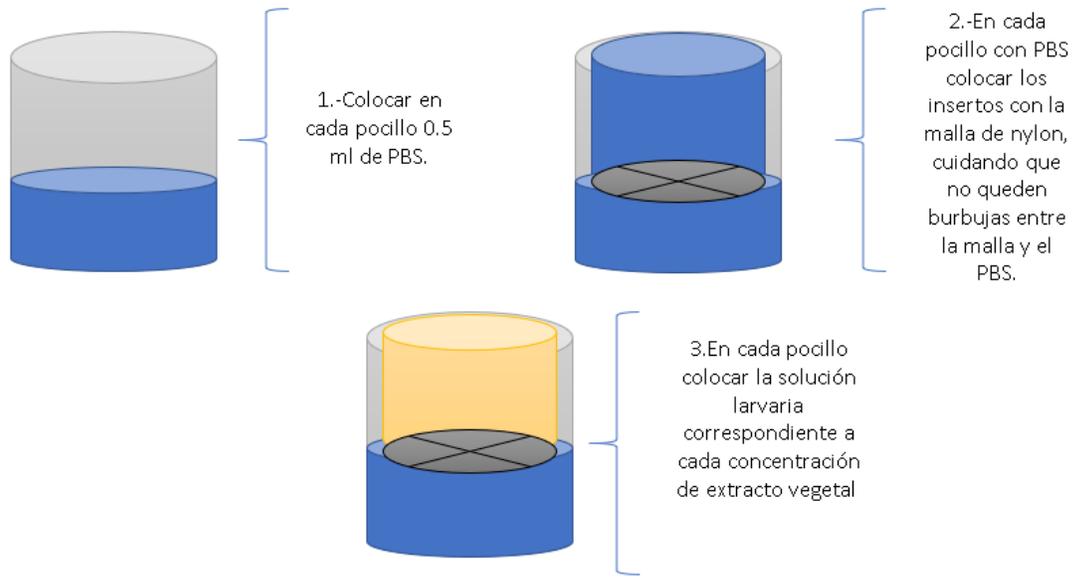
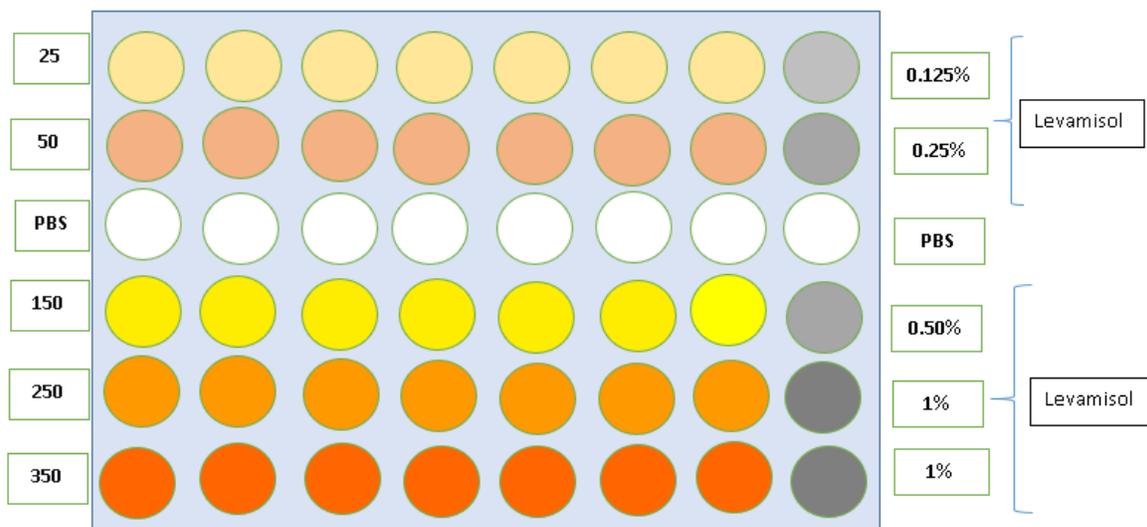


Figura 9. Colocación de los insertos en los pocillos de las placas de cultivo.

Después se colocaron 0.5 ml de solución larvaria, las cuales ya habían sido expuestas a diferentes concentraciones del extracto vegetal o a diferentes concentraciones de levamisol o ivermectina.

La distribución de las soluciones con el extracto vegetal de la vaina del mezquite, levamisol e ivermectina en las placas de cultivo celular quedaron como se muestra en la Figura 10.



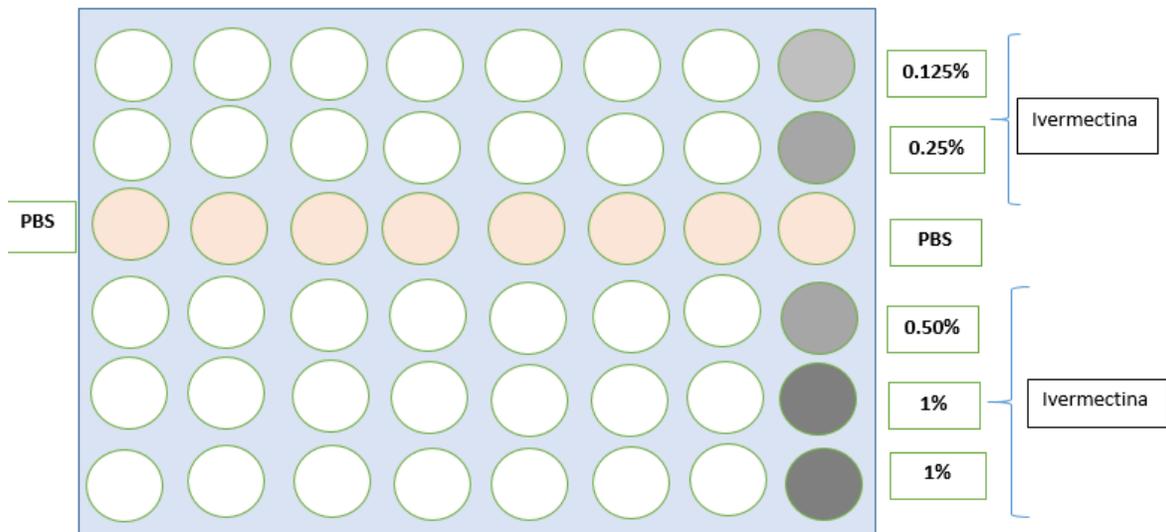


Figura 10. Distribución en las placas de cultivo de soluciones larvarias expuestas a diferentes concentraciones del extracto vegetal, levamisol e ivermectina.

El experimento se replicó dos veces, es decir se utilizaron 4 placas de cultivo y las repeticiones por tratamiento fue el número de pozos totales para cada concentración del extracto vegetal y de levamisol e ivermectina; las placas fueron incubadas a 24°C durante tres horas.

7.3.4 Colecta y lectura

Transcurrido el periodo de incubación de tres horas de las placas de cultivo, los insertos con la malla de nylon fueron retirados cuidadosamente para recuperar la solución de cada pocillo. Estas soluciones fueron vertidas en tubos de 2mL previamente identificados, con la concentración del extracto vegetal, levamisol, ivermectina y PBS para su posterior lectura. Se procedió a contabilizar el número de larvas vivas, para calcular esto, se utilizó la misma metodología descrita previamente (Figuroa-Castillo *et al.*, 2015).

7.3.5 Expresión de resultados

Por cada pocillo, se contabilizó el número de larvas que quedaron sobre la malla en comparación con el número de larvas que lograron atravesar la malla.

La tasa de migración larvaria se expresa según la fórmula:

El diagrama muestra la fórmula para calcular la tasa de migración larvaria. A la izquierda, un recuadro gris contiene el texto "Tasa de migración larvaria". A su derecha, un signo de igualdad (=) indica la operación. El numerador de la fracción está formado por un recuadro verde que dice "Número de larvas que no atravesaron la malla según el Tx" multiplicado por un recuadro verde que contiene el número "100". El denominador de la fracción es un recuadro verde que dice "Número total de larvas para el mismo Tx". Una línea horizontal azul separa el numerador del denominador, y un símbolo de multiplicación (X) azul está situado entre el numerador y el denominador.

$$\text{Tasa de migración larvaria} = \frac{\text{Número de larvas que no atravesaron la malla según el Tx} \times 100}{\text{Número total de larvas para el mismo Tx}}$$

7.3.6 Análisis estadístico

Se usó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor para identificar la varianza entre los diferentes tratamientos usando el paquete estadístico de Excel y la extensión de MegaStat. Las variables de respuesta fueron las diferentes concentraciones del extracto etanólico de la vaina del mezquite, las cuales fueron las siguientes: 25, 50, 150, 250, 350 $\mu\text{g/mL}$. El control negativo empleado fue solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y en los controles positivos se utilizaron concentraciones de 0.125%, 0.5% y 1% de levamisol e ivermectina.

Una vez realizado el análisis de varianza y observando que la hipótesis nula era rechazada a partir de la concentración del extracto etanólico de la vaina de mezquite de 150 $\mu\text{g/mL}$ se procedió a realizar la prueba de Dunnett, que tiene como objetivo comparar las medias de los diferentes tratamientos con un control negativo (PBS).

8. Resultados

8.1 Análisis estadístico de la prueba de inhibición de la migración larvaria

El extracto etanólico de la vaina del mezquite inhibe la migración larvaria a partir de la concentración de 150 $\mu\text{g/mL}$, en un 99%, seguida de la concentración de 250 $\mu\text{g/mL}$ con un 96.5% y finalmente con la concentración de 350 $\mu\text{g/mL}$ se obtuvo una inhibición del 94.49%. En cuanto a los controles positivos, el tratamiento antihelmíntico con levamisol tiene un porcentaje de inhibición superior al 98%, en el

tratamiento de ivermectina un porcentaje del 95% en la concentración al 0.5% y superior en las otras concentraciones (1%).

Como se observa en el Cuadro 5, a partir de la concentración de *Prosopis laevigata* 150 µg/mL hay diferencias significativas en el porcentaje de inhibición comparado con el control negativo, comportándose de manera similar al compararlos con los tratamientos de ivermectina y levamisol.

Cuadro 5. Media y desviación estándar del porcentaje de larvas muertas de *Haemonchus contortus* obtenidas con la exposición del control negativo, positivo y las concentraciones del extracto etanólico de *Prosopis laevigata*.

No.	Tratamientos	<i>Haemonchus contortus</i>
1	PBS	75.5 ± 3.54 ^a
2	Levamisol 0.125%	100.0 ± 0.00 ^{b**}
3	Levamisol 0.5%	100.0 ± 0.00 ^{b**}
4	Levamisol 1%	98.5 ± 2.12 ^{b**}
5	Ivermectina 0.125%	98.0 ± 0.00 ^{b**}
6	Ivermectina 0.5%	95.0 ± 7.07 ^{b*}
7	Ivermectina 1%	100.0 ± 0.00 ^{b**}
8	<i>Prosopis laevigata</i> 25 µg/ml	67.0 ± 4.24 ^{ac*}
9	<i>Prosopis laevigata</i> 50 µg/ml	79.5 ± 4.95 ^{cd}
10	<i>Prosopis laevigata</i> 150 µg/ml	99.5 ± 0.71 ^{b**}
11	<i>Prosopis laevigata</i> 250 µg/ml	96.5 ± 4.95 ^{b**}
12	<i>Prosopis laevigata</i> 350 µg/ml	94.5 ± 0.71 ^{b*}

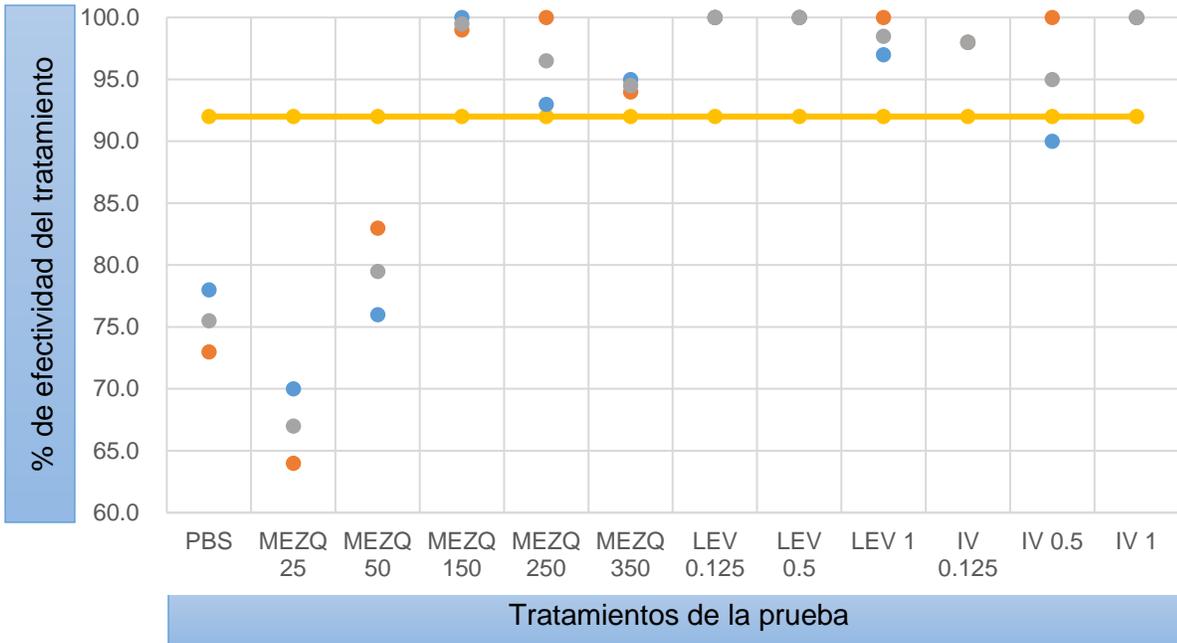
*Diferencias significativa con el control negativo.

**Diferencias muy significativas con el control negativo (p < 0.01).

Letras diferentes significan diferencia estadística (p < 0.05).

En la Grafica 1, se muestra como a partir de la concentración de 150 µg/mL del extracto etanólico de la vaina del mezquite hay un efecto antihelmíntico *in vitro* con un nivel de confianza del 95% comparado con el control positivo (PBS) y las concentraciones de 25 y 50 µg/mL del extracto donde no hay un efecto significativo.

Gráfica 1. Comparación de los porcentajes de larvas muertas (efecto antihelmíntico *in vitro*) entre los diferentes tratamientos.



Una vez observando las diferencias significativas a partir del tratamiento de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se procedió a realizar la prueba de Dunnett que tiene como objetivo comparar las medias de los tratamientos con un control, en este caso el control positivo (PBS), obteniendo los siguientes resultados.

Prueba de Dunnett (comparación de medias de tratamientos con un control)

Promedio de nivel de control
Control positivo (PBS) 75.5

Valor teórico del estadístico de prueba

$D\alpha = 8.41879594$

MEZQ 25	MEZQ 50	MEZQ 150	MEZQ 250	MEZQ 350	LEV 0.125	LEV 0.5	LEV 1	IV 0.125	IV 0.5	IV 1
67	79.5	99.5	96.5	94.5	100	100	98.5	98	95	100
8.5	4	24	21	19	24.5	24.5	23	22.5	19.5	24.5

La hipótesis nula no se rechaza

La hipótesis nula se rechaza y se acepta la hipótesis alterna con un nivel de confianza del 95%

La prueba de Dunnett consiste en obtener el valor absoluto de las diferencias de las medias de los distintos tratamientos empleados comparado con la media del control, si este valor resulta menor comparado con el valor teórico del estadístico de prueba, la hipótesis nula se acepta, en cambio si el valor obtenido es mayor, la hipótesis nula se rechaza.

Lo anterior se interpreta de la siguiente forma: las concentraciones del extracto etanólico de la vaina del mezquite de 25 y 50 µg/mL no son significativas, es decir estos tratamientos no tiene ningún efecto comparado con el control negativo (PBS), en cambio a partir de la concentración 150 µg/mL del extracto etanólico de la vaina del mezquite y los controles positivos que son los fármacos comerciales, presentan un efecto significativo comparado con el control negativo (PBS) con un nivel de confianza del 95%, de esta forma se demuestra el efecto antihelmíntico *in vitro* del extracto etanólico de la vaina del mezquite.

9. Discusión

En el presente estudio se logró identificar que el extracto etanólico de la vaina del mezquite inhibió la migración larvaria en más del 90% a partir de una concentración de 150 µg/ml, aunque no existen estudios anteriores que prueben el efecto de los extractos de la vaina del mezquite contra *Hemonchus contortus*, si hay estudios en los que se probaron las hojas y tallos del mismo árbol. En un estudio realizado en 2008, se analizaron 20 extractos de diferentes plantas, de las cuales el mezquite tuvo éxito como larvicida de *H. contortus*. El extracto hexánico (disolvente) de *P. laevigata* de tallo y hojas combinadas, produjo 51%, 81% y 86% de mortalidad larval a las 24, 48 y 72 h después de la exposición, respectivamente (estudio *in vitro*), estos estudios *in vitro* comparados con el nuestro, demuestran que la vaina tiene actividad antihelmíntica prometedora y con buenos porcentajes sobre la Inhibición de la Migración Larvaria (López-Aroche *et al.*, 2008).

En 2010 se realizó un estudio *in vivo* en gerbos para probar el efecto antihelmíntico de las hojas de *Prosopis laevigata*, este estudio ha sido el único probando esta especie de árbol utilizando un modelo animal, obteniendo una reducción parasitaria del 53%, estos resultados comparados con los estudios *in vitro* no tienen el mismo

porcentaje larvicida, sin embargo, aunque se trata de una especie muy diferente a los rumiantes podrían tener resultados diferentes (De Jesús-Gabino *et al.*, 2010). Teniendo estos resultados como referencia, quedaría probar el efecto de la vaina del mezquite en rumiantes como modelos animales, ya que posiblemente el contenido de polifenoles en la vaina del mezquite tenga una mayor concentración lo que se traduciría en un mejor efecto antihelmíntico *in vivo*.

En un estudio reciente, se utilizó un extracto hidroalcohólico a partir de hojas de *P. laevigata* contra estadios del parásito de *H. contortus*, donde hubo un efecto ovicida cercano al 100% a una concentración de 25 mg/mL. La fracción orgánica del extracto mostró un efecto letal ovicida a una concentración de 0.75 mg/ml. El efecto larvicida del extracto hidroalcohólico fue del 85% de mortalidad a una concentración de 150 mg/mL y la fracción orgánica tuvo un porcentaje de actividad larvicida de 96% a una concentración de 50 mg/ml. Por otro lado, en el mismo estudio se logró identificar que las hojas de la planta *P. laevigata* contiene un flavonoide llamado isoramnetina con actividad antihelmíntica *in vitro* contra *H. contortus* (Delgado-Núñez, 2020). Estos resultados comparados con los nuestros son similares en cuanto al porcentaje larvicida pero la concentración utilizada en el estudio antes mencionado fue mayor, lo que nos indica que el extracto etanólico de la vaina del mezquite a una menor concentración genera un porcentaje larvicida mayor.

En cuanto a los componentes bioactivos de la vaina del mezquite no se pudieron identificar con exactitud, pero dentro de los componentes presentes se encontraron polifenoles ya que el extracto utilizado se sometió a la prueba de Folin-Ciocalteu la cual se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes (Jiménez-López, *et al.*, 2013).

También se ha reportado que las hojas de *P. juliflora* contiene alcaloides y flavonoides con actividad antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatoria y antitumoral; las hojas de *P. alba* Griseb contienen catequinas con actividad antioxidante; se han identificado que compuestos de tipo polifenoles son los responsables de la actividad antioxidante de extractos generados a partir de hojas de *P. chilensis*; la corteza de *P. africana* contiene flavonoides con actividad antiinflamatoria; y de

manera general, la corteza de especies del género *Prosopis* muestran actividad antidiarreica y antiviral (Díaz-Batalla *et al.*, 2018).

Un estudio realizado en Brasil logró demostrar el efecto antihelmíntico *in vitro* de las vainas de *Prosopis jujiflora* también llamadas algarrobas. La fracción rica en alcaloides, reconocida como juliprosopina tuvo un mejor efecto ovicida comparado con su efecto sobre la motilidad de L3 de nematodos gastrointestinales. La ventaja de las vainas de esta especie de *Prosopis* es que ya se utilizan como un complemento en la dieta de los caprinos (Goncalvez-Lima, 2017), en nuestro país las vainas de *P. laevigata* también se utilizan en la alimentación de pequeños rumiantes aunque no existen estudios más profundos sobre el efecto que pudieran tener sobre nematodos gastrointestinales. Como se mencionó, en nuestro país no existen estudios sobre el efecto antihelmíntico de la vaina de *P. laevigata* lo que deja un camino abierto para futuras investigaciones tanto *in vitro* como *in vivo*.

10. Conclusión

Los resultados obtenidos en este estudio cumplieron con los objetivos planteados ya que nos permitieron comprobar el efecto antihelmíntico del extracto etanólico de la vaina del mezquite *in vitro*, ya que solo existían estudios donde se utilizaban las hojas y/o tallos del mismo árbol. La prueba de inhibición de la migración larvaria (LMI) demostró que la eficacia del extracto etanólico de la vaina del mezquite fue significativa a partir de 150 µg/ml comparado con el control negativo.

Se necesitarían estudios *in vivo* en especies de rumiantes para reconocer a este alimento como un nutraceutico ya que tiene las características óptimas de macronutrientes y también se evidenció su actividad antihelmíntica *in vitro*.

11. Perspectivas

La Resistencia Antihelmíntica representa un grave problema en las explotaciones de pequeños rumiantes, por ejemplo, en Australia amenaza la rentabilidad de las granjas ovinas, ya que ha surgido resistencia a las principales familias de antihelmínticos de amplio espectro, los benzimidazoles, levamisol y otros agonistas

nicotínicos, además de las avermectinas; incluyendo ivermectina, abamectina y moxidectina (Wolstenholme *et al.*, 2004).

Debemos entender que la RAH es un problema con el que debemos aprender a convivir, ya que no existe evidencia de la reversión a la susceptibilidad antihelmíntica, incluso en rebaños donde se ha retirado el fármaco con este problema. El objetivo del manejo integrado parasitario es hacer un control de NGI sostenible, haciendo un uso consciente y responsable de los fármacos que aún son eficaces y mitigando los costos de producción que la parasitosis representa, ya sea en las pérdidas de producción y costos de prevención y tratamiento (Wolstenholme *et al.*, 2004). Si este fenómeno no se controla, en pocos años los tratamientos antihelmínticos comerciales dejarán de funcionar, poniendo en riesgo la viabilidad de los sistemas de producción. Por lo que, se han desarrollado investigaciones tratando de encontrar tratamientos alternativos para el control de NGI, disminuyendo la dependencia a los fármacos y alargando su vida útil mediante la desparasitación estratégica, que tiene como objetivo, desparasitar solo a los animales que lo necesitan, evaluando los umbrales clínicos (Torres-Acosta *et al.*, 2003).

Las estrategias de control de NGI deben estar dirigidos hacia tres ejes importantes 1.-Controlar el agente causal, entendiendo que la eliminación no es una opción viable. 2- Reducir la fuente de contaminación y 3.-Aumentar la respuesta inmune del hospedero (Torres-Acosta y Hoste, 2008).

Al analizar los resultados obtenidos, se encontró que el extracto etanólico de la vaina del mezquite cubre dos de los ejes del manejo integrado parasitario: el control del agente causal ya que hubo diferencias significativas a partir de la dilución 150 µg/mL y un probable aumento de la respuesta inmune del huésped por la calidad de sus macronutrientes, sin embargo, en este eje se necesitan más estudios.

Realizando más estudios y teniendo la certeza de que tiene una buena respuesta antihelmíntica *in vivo*, se puede integrar en los sistemas de producción ovina donde la vaina esté disponible. Un ejemplo, sería conocer la región, época del año e identificar en que meses hay más cargas parasitarias en los animales. Una vez

realizando un análisis se podría integrar a la vaina del mezquite dentro de un manejo integrado parasitario, es decir en épocas donde la carga parasitaria sea mayor se puede utilizar un tratamiento antihelmíntico comercial, pero en épocas de estiaje o de menor carga parasitaria se podría utilizar la vaina del mezquite para aumentar la respuesta inmune de los animales y de esta forma cada individuo tendrá la capacidad de mantener sus niveles aceptables de producción sin la necesidad de utilizar un fármaco, esta estrategia nos ayudará a conservar las moléculas que aún son efectivas y a retardar el fenómeno de la Resistencia Antihelmíntica, aparte de que la vaina del mezquite serviría como un complemento en la dieta de los animales en épocas donde el alimento en pastoreo es escaso.

La ventaja de utilizar la vaina del mezquite en los sistemas de producción es que es un ingrediente que se puede secar y almacenar durante varios meses, solo se deberá tener cuidado en el control de insectos.

11. Referencias

Aguilar-Caballero, A.J.; Torres-Acosta, J.F.; Cámara-Sarmiento, R.; Sandoval-Castro, A. 2013. Suplementación alimenticia para el control de los nematodos gastrointestinales en ovinos bajo pastoreo en México. XL. Reunión de la asociación mexicana para la producción animal y seguridad alimentaria A.C. (AMPA). Y IX. Seminario internacional de ovinos en el trópico.

Aguilar-Marcelino, L. 2012. Microorganismos con uso potencial contra el nematodo de ovinos *Haemonchus contortus*. Tesis presentada para obtener el grado de doctor en ciencias. Texcoco, México: Colegio de Posgraduados, Universidad Autónoma de Chapingo.

Alonso-Díaz, M. A.; Torres-Acosta, J. F.; Sandoval-Castro, C. A.; Hoste, H.; Aguilar-Caballero, A. J.; Capetillo-Leal, C. M. 2009. Sheep preference for different tanniniferous tree fodders and its relationship with in vitro gas production and digestibility. *Anim. Feed Sci. Tech.* 151 (1-2):75-85.

Armijo-Nájera, M.G.; Moreno-Reséndiz, A.; Blanco-Contreras, E.; Borroel-García, V. J.; Reyes-Carrillo, J. L. 2019. Vaina de Mezquite (*Prosopis spp.*) alimento para el ganado caprino en el semidesierto. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. Vol. 10. N°1.

Bobadilla-Soto, E.; Flores-Padilla, J.P.; Perea-Peña, M. 2017. Comercio exterior del sector ovino mexicano antes y después del Tratado de Libre Comercio con América del Norte Economía y Sociedad, vol. XXI, núm. 37, julio-diciembre, pp. 35-49 Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo Morelia, México.

Bobadilla-Soto, E.; Pera-Peña, M. 2017. Evolución de la ovinocultura en México. Revista de divulgación: Saber más. Disponible en: <https://www.sabermas.umich.mx/archivo/articulos/323-numero-38/583-evolucion-de-la-ovinocultura-en-mexico.html>

Bobadilla-Soto, E.; Ochoa-Ambriz, F.; Perea-Peña, M. Dinámica de la producción de carne ovina en México 1970 a 2019. 2021. Agronomía Mesoamericana. Volumen 32(3):963-982.

Bowman, DD. 2020. Georgi's Parasitology for Veterinarians. 11th ed., W.B. Saunders, Philadelphia. USA.

Corbett. C.J.; Love, S.; Moore. A.; Burden, F.A.; Matthews, J.B.; Denwood, M.J. 2014. The effectiveness of faecal removal methods of pasture management to control the cyathostomin burden of donkeys. Parasites & Vectors, 7:48.

Claerebout, E.; Geldhof, P. 2019. Helminth Vaccines in Ruminants From Development to Application. Vet Clin Food Anim 36.159–171

Cuéllar-Ordaz, J.A. 2003. Perspectivas de la ovinocultura en México. Memoria del Segundo Seminario sobre Producción Intensiva de Ovinos. Villahermosa, Tabasco.

Corticelli B y Lai M. Ricerche sulla tecnica di coltura delle larve infestive degli strongili gastro-intestinali del bovino. Acta Méd Vet. 1963.

De Jesús-Gabino, A.F.; Mendoza-de Givez, P.; Salinas-Sánchez, D.O.; López-Arellano, Ma.E.; Liébano-Hernández, E.; Hernández-Velázquez, V.M.; Valladares-

Cisneros, G. 2010. Efecto antihelmíntico del extracto n-hexánico de *Prosopis laevigata* en contra de *Haemonchus contortus* en gerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados artificialmente. CENID-PAVET. INIFAP. Cuernavaca, Morelos.

Delgado-Núñez, E. J. 2020. Actividad antihelmíntica in vitro de *Prosopis laevigata* contra huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus*. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias Naturales. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

Desdémona-Martínez, E. 2019. Características de las canales de ovinos en la región centro de México. Revista Mexicana de Agroecosistemas. Vol. 6. XLVI. Reunión Científica de la Asociación Mexicana para la Producción animal y Seguridad Alimentaria. Memorias de artículos en extenso y resúmenes.

Díaz-Batalla, L.; Hernández-Uribe, J.P.; Román-Gutiérrez, A.D.; Cariño-Cortés, R.; Castro-Rosas, J.; Téllez-Jurado, A.; Gómez-Aldapa, C.A. 2018. Chemical and nutritional characterization of raw and thermal-treated flours of Mesquite (*Prosopis laevigata*) pods and their residual brans. CYTA J Food. 16(1):444-451.

Felice, M. 2013. Condición corporal de ovinos. Instituto nacional de tecnología agropecuaria. INTA. Disponible en: https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_condicion_corporal.pdf

Figuroa-Castillo, J. A.; Méndez-Medina, R.D.; Berruecos-Villalobos, J. M.; Álvarez-León, J. A. 2000. Detección de resistencia de *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Figuroa-Castillo, J.A.; Jasso-Villazul, C.; Liébano-Hernández, E.; Martínez-Labat, P.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Zárate-Ramos, J.J. 2015. Capítulo 3: Examen coproparasitoscópico En: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia

en salud pública y veterinaria. Rodríguez-Vivas R.I. Editor. AMPAVE-CONASA. México, D.F. pp. 78-128.

Figuroa-Castillo, J.A.; Jasso-Villazul, C.; Liébano-Hernández, E.; Martínez-Labat, P.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Zárate-Ramos, J.J. 2015. Capítulo 5: Recuperación de helmintos a la necropsia. En: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. Rodríguez-Vivas R.I. Editor. AMPAVE-CONASA. México, D.F. pp. 162-163.

Figuroa-Castillo, J.A.; Jasso-Villazul, C.; Liébano-Hernández, E.; Martínez-Labat, P.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Zárate-Ramos, J.J. 2015. Capítulo 12: Diagnóstico de resistencia a los antiparasitarios en rumiantes. En: Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. Rodríguez-Vivas R.I. Editor. AMPAVE-CONASA. México, D.F. pp. 376.

Figuroa-Castillo, J.A.; Méndez-Medina, R.D.; Berruecos-Villalobos, J.M.; Álvarez-León, J. A. 2000. Detección de resistencia de *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino. Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Galaviz-Rodríguez, J.; Vargas-López, S.; Zaragoza-Ramírez, J.; Bustamante-González, A.; Ramírez-Bribiesca, E.; Guerrero-Rodríguez, J., Hernández-Zepeda, J. 2011. Evaluación territorial de los sistemas de producción ovina en la región norponiente de Tlaxcala. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. Vol. 2. N°1, pp 53-68.

Gómez-Alcalá, C. 2018. Situación global del sector de la carne de ovino. Subdirección General de Productos Ganaderos. (MAGRAMA). Euroganaderia.eu. http://www.euroganaderia.eu/sector-carne-ovino/reportajes/situacion-global-del-sector-de-la-carne-de-ovino_895_11_1472_0_1_in.html

Goncalvez-Lima, H.; Cavalcante-Gomes, D.; Silva-Santos, N.; Reis-Dias, E.; Borges-Botura, M.; Moreira-Batatinha, M.J.; Branco, A. 2017. *Prosopis juliflora* Pods Alkaloid-rich Fraction: In vitro Activity on Goat gastrointestinal Parasites and Its Cytotoxicity on Vero Cells. *Farmacogn Mag.* S684-S687.

González-Garduño, R. 2006. Estudios sobre el control biológico de nematodos gastrointestinales de ovinos de pelo con el hongo *Duddingtonia flagrans* en Teapa, Tabasco, México. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Veterinarias, Texcoco, México.

González-Garduño, R.; Córdova-Pérez, C.; Torres-Hernández, G.; Mendoza-De Gives, P.; Arece-García, J. 2011. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *SciELO. Vet. Méx.* Vol. 42. N°2.

Hernández-Barral, A. 2011. Estudio de la respuesta inmune frente a *Haemonchus contortus* en dos razas ovinas canarias. Tesis doctoral. Universidad de las Palmas de Gran Canaria. Facultad de Veterinaria. Arucas.

Herrera-Haro, J.G.; Álvarez-Fuentes, G.; Bárcena-Gama, R.; Núñez-Aramburu, J.M. 2019. Caracterización de los rebaños ovinos en el sur de Ciudad de México, México. *Acta Universitaria Multidisciplinary Scientific Journal.* Volumen 29. ISSN online 2007-9621.

Hoste, H.; Le Frieux, Y.; Pommaret, A. 2011. Distribution and repeatability of fecal egg counts and blood parameters in dairy goats naturally infected with gastrointestinal nematodes. *Res in Vet Sci.* 70(1):57-60.

Hoste, H.; Torres-Acosta, J. F. J.; Sandoval-Castro, C. A.; Mueller-Harvey, I.; Sotiraki, S.; Louvandin, H.; Thamsborg, S.; M. and Terrill, T. H. 2015 Tannin containing legumes as a model for nutraceuticals against digestive parasites in livestock. *Veterinary Parasitology*, 212 (12). pp. 517.

Jiménez-López, Pilar.; Tomás-Girbés, J. 2013. "Determinación del Contenido total de Polifenoles en Alimentos con el Reactivo de Folin-Ciocalteu", Nutrición y Bromatología; Facultad de Medicina; Universidad de Valladolid.

Kaplan, R. 2004. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. *Trends Parasitol* 20, 477-481.

Kotze, A.C., Le Jambre, L.F., O'Grady, J., 2006. A modified larval migration assay for detection of resistance to macrocyclic lactones in *Haemonchus contortus*, and drug screening with Trichostrongylidae parasites. *Veterinary Parasitology* 137, 294-305.

López-Aroche, U.; Salinas-Sánchez, D.O.; Mendoza-de-Gives, P.; López-Arellano, M.E.; Liébano-Hernández, E.; Valladares-Cisneros, G.; Arias-Ataide, D.M.; Hernández-Velázquez, M. 2008. *In vitro* nematicidal effects of medicinal plants from The Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos México, against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Helminthology*, 82. 25-31..

Luna-Palomera, P.; Santamaría-Mayo, E.; Berúmen-Alatorre, A. C.; Gómez-Vázquez, A.; Maldonado-García, N. M. 2010. Suplementación energética y proteica en el control de nematodos gastrointestinales en corderas de pelo. REDVET. *Revista Electrónica de Veterinaria*. 11 (7):1-13. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63614251006>.

Martínez-Ortiz-de-Montellano, C. 2010. Mecanismo de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. Tesis en cotutela presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Agropecuarias. Francia: Université de Toulouse.

Martínez-Ortiz-de-Montellano, C.; Guerrero-Molina, C.; Galicia-Velázquez, G.; Rodríguez-Vivas, R.I.; Rosado-Aguilar, A. 2017. Uso de compuestos secundarios de las plantas como nutracéuticos en équidos. Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Nacional Autónoma de México.

Martínez-Ortiz-de-Montellano, C.; Torres-Acosta, J.F. de J. 2011. Control de nematodos gastrointestinales en rumiantes Situación del control NGI. Reun. Cons. Nac. Salud Anim. 1–9.

Medina, P.; Guevara, F.; La O, M.; Ojeda, N.; Reyes, E. 2014. Resistencia Antihelmíntica: una revisión de informes el sureste de México y alternativas disponibles para el control de nematodos gastrointestinales. Pastos y Forrajes. Vol. 37. N°3.

Munguía-Xóchihua, J.A.; Valenzuela-Medrano, W.; Leyva-Corona, J.C.; Morales-Pablos, M.I.; Figueroa-Castillo, J.A. 2013. Potencial de orégano como alternativa natural para controlar *Haemonchus contortus* en ovinos de pelo. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales 9 (1): 150-154.

Nari, A. 2011. Towards sustainable parasite control practices in livestock production with emphasis in Latin America. *Vet. Parasitol.* 180 (1-2):2-11.

Palacios-Romero, A.; Rodríguez-Laguna, R.; Hernández-Flores, M. de la L.; Jiménez-Muñoz, E.; Tirado-Torres, D. 2016. Distribución potencial de *Prosopis laevigata* (Humb. et Bonpl. ex Willd) M. C. Johnston basada en un modelo de nicho ecológico. Revista Mexicana de Ciencias Forestales. Vol.7 N°34.

Pérez-Leonard, H. 2006. Nutracéuticos: componente emergente para el beneficio de la salud. ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar, vol. XL. N°3. La Habana, Cuba.

Rechab, S.O.; Kareru, G.P.; Kutima, L.H.; Nyagah, C. G.; Njonge, K.F.; Waithaka, W. R. 2014. Evaluation of In Vitro Ovicidal Activity of Ethanolic Extracts of *Prosopis juliflora* (Sw.) DC (Fabaceae). IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS) e-ISSN: 2278-3008, p-ISSN:2319-7676. Volume 9, Issue 3 Ver. II, PP 15-18.

Rodríguez-Sauceda, E. N.; Rojo-Martínez, G.E.; Ramírez-Valverde, B.; Martínez-Ruiz, R.; Cong-Hermida, M. de la C.; Medina-Torres, M.; Piña-Ruiz, H. 2014. Análisis técnico del árbol del Mezquite (*Prosopis laevigata* Humb.& Bonpl. ex Willd.) en México. Ra Ximhai. Revista de sociedad, cultura y desarrollo sustentable.

Román-Pérez, H. 2016. Bromatología de la vaina de mezquite (*Prosopis spp*) como alternativa para el consumo sustentable en la Comarca Lagunera. Monografía para obtener el título de Ingeniero en Agroecología. Universidad Autónoma Antonio Narro. Torreón, Coahuila.

Ruiz-Tavares, D.R. 2011. Tesis para obtener el grado de maestría en ciencias ambientales. Uso potencial de la vaina del mezquite para la alimentación de animales domésticos del Altiplano Potosino. San Luis Potosí.

Sánchez-Sánchez, H. 2005. Coevolución genética de la interacción parásito-hospedero. Cienc. Ergo Sum. 12(2):144-148.

Smith, E.R.; O'Brien, A.; Zhang, Q.; Burnsteel, C.; McLean.; Messenheimer, J. R.; Phillippi-Taylor, A.; Regmi, P.; Volker, B. 2015. Ruminant and Equine Antiparasitic Drug Use and Resistance Survey. Center for Veterinary Medicine, FDA.

Soulsby, E.J.L. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. México, D.F. *McGraw Hill Interamericana*.

Sréter, T.; Molnár, V.; Kassai, T. 1994. The distribution of nematode egg counts and larval counts in grazing sheep and their implications for parasite control. Int J Parasitol. 24(1): 103-108.

Thomson, J. N. 1984. Interacciones and Coevolution. Department of Zoology. University of Iowa. Pp. 463-464.

Torres-Acosta, J .F.; Villarroel-Álvarez, M. S.; Rodríguez-Arévalo, F.; Gutiérrez-Segura, I.; Alonso-Díaz, M. A. 2003. Diagnóstico de nemátodos gastrointestinales resistentes a benzimidazoles e imidazotiazoles en un rebaño caprino de Yucatán, México. Rev. Biomed. 14 (2):75-81.

Torres-Acosta, J. F.; Chán-Pérez, J. I. 2015. Capítulo 4. Recuperación de helmintos a la necropsia. Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/284180087_Capitulo_4_Recuperacion_de_Helmintos_a_la_necropsia_En_Tecnicas_para_el_diagnostico_de_parasitos_con_importancia_en_salud_publica_y_veterinaria

Torres-Acosta, J.F.J y Hoste, H. 2008. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rumin. Res.* 77: 159-173.

Torres-Acosta, J.F.J.; Cámara-Sarmiento, R.; Aguilar-Caballero, A.J.; Canul-Ku, H.L.; Pérez-Cruz, M. 2009. Estrategias de desparasitación selectiva dirigida. Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/301356894_Estrategias_de_desparasitacion_selectiva_dirigida_En_Avances_en_el_control_de_la_parasitosis_gastrointestinal_de_ovinos_en_el_tropico

Van-Houtert, M. F. J.; Barger, I. A.; Steel, J. W. 1995. Dietary protein for young grazing sheep: Interactions with gastrointestinal parasitism. *Veterinary Parasitology*, 60(3-4), 283-295.

Van-Wyk, JA. 2001. Refugia - Overlooked as perhaps the most potent factor concerning the development of anthelmintic resistance. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*. 2001. 68: 55-67.

Vásquez-Hernández, M.; González-Garduño, R.; Torres-Hernández, G.; Mendoza-de Gives, P.; Ruiz-Rodríguez, J. M. 2006. Comparación de dos sistemas de pastoreo en la infestación con nematodos gastrointestinales en ovinos de pelo. *Vet. Mex.* 37 (1):15-27.

Vázquez-Martínez, I.; Jaramillo-Villanueva, J.L.; Bustamante-González, A.; Vargas-López, S.; Calderón-Sánchez, F.; Torres-Hernández, G.; Pittroff, W. 2018. Estructura y tipología de las unidades de producción ovinas en el centro de país. *Agricultura, sociedad y desarrollo*. Vol. 15 N°1.

Vega-Martínez, V. 2003. El mejoramiento genético como alternativa para impulsar y mejorar la competitividad en producción de carne de ovino: Importancia de las evaluaciones genéticas. Memorias 1er Simposio internacional de ovinos de carne. Pachuca Hidalgo, México.

Vial, H.J.; Traore, M.; Failamb & Ridley R.G. 1999. Renewed strategies for drug development against parasitic diseases. *Parasitology Today* 15: 393-394.

Wallace, D. S.; Bairden, K.; Duncan, J. L.; Fishwick, G.; Gill, M.; Holmes, P. H.; Stear, M. J. 1995. Influence of supplementation with dietary soyabean meal on resistance to haemonchosis in Hampshire down lambs. *Research in Veterinary Science*, 58(3), 232–237.

Waller, P.J.; Thamsborg, S.M. 2004. Nematode control in “Green” ruminant production systems. *TRENDS in parasitology*. Vol. 20. N°10.

Wolstenholme, A.J.; Fairweather, I.; Prichard, R.; Samson-Himmelstjerna, G.; Sangster, N.C. Drug resistance in veterinary helminths. *TRENDS in Parasitology* Vol.20 No.10 October 2004.