

Actividad antihelmíntica de la vaina de *Leucaena leucocephala* sobre nematodos gastrointestinales de ovinos (*in vitro*)

Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod on gastrointestinal nematodes of sheep (*in vitro*)

 **Nallely Rivero-Perez** nallely_rivero@uaeh.edu.mx^{1*}, **Agapito Jaramillo Colmenero** agapo28_agapo@hotmail.com²,  **Armando Peláez-Acero** pelaeza@uaeh.edu.mx¹,  **Marco Rivas-Jacobo** marco.rivas@uaslp.mx²,  **Gilberto Ballesteros-Rodea** ballesteros@uaslp.mx²,  **Adrián Zaragoza-Bastida** adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx^{1**}

¹Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México. ²Universidad Autónoma de San Luis Potosí, Facultad de Agronomía y Veterinaria, México. *Autor responsable: Rivero-Perez Nallely. **Autor de correspondencia: Adrián Zaragoza-Bastida, Rancho Universitario Av. Universidad km 1, A.P. 32 CP.43600. 01771717 2000 ext. 2440. Ex-Hda. de Aquetzalpa, Hidalgo, México. E-mail: adrian_zaragoza@uaeh.edu.mx

RESUMEN

Debido a la resistencia que han adquirido a fármacos convencionales, actualmente se buscan estrategias novedosas para controlar el ciclo de los parásitos asociados a problemas sanitarios en animales de producción. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antihelmíntica del extracto hidroalcohólico de vaina de *Leucaena leucocephala* (VLL) sobre nematodos gastrointestinales de ovinos. Se preparó un extracto hidroalcohólico de VLL y se evaluaron las concentraciones 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/mL, para determinar la actividad sobre la inhibición de la eclosión de los huevos de los nematodos gastrointestinales de ovinos y la mortalidad sobre larvas L3 de los nematodos. Se determinó que el extracto hidroalcohólico de VLL a una concentración de 50 mg/mL inhibe la eclosión de los huevos de los nematodos en un 20% y a 6.25 mg/mL mató al 22% de las larvas L3 de los nematodos. El extracto hidroalcohólico de VLL contiene metabolitos activos que actúan en la inhibición de la eclosión de huevos de nematodos de campo y sobre la larva infectiva L3. El extracto hidroalcohólico de VLL puede ser una alternativa no convencional para la prevención y control de las parasitosis de pequeños ruminantes a nivel de campo.

Palabras clave: Extracto hidroalcohólico, vainas de *Leucaena leucocephala*, antihelmíntico, nematodos de campo.

ABSTRACT

Due to the resistance that parasites have acquired to conventional drugs, new strategies are currently being sought to control the cycle of parasites associated with health problems in animal production. The objective of the study was to determine the anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* pod (LLP) hydroalcoholic extract on gastrointestinal nematodes of sheep. A hydroalcoholic extract of LLP was prepared and the concentrations 50, 25, 12.5 and 6.25 mg/mL were evaluated to determine the activity on eggs hatching inhibition of gastrointestinal nematodes in sheep and the mortality on larvae of nematodes (L3). It was determined that the hydroalcoholic extract of LLP at 50 mg / mL inhibited the eggs hatching of nematode (20%) and at 6.25 mg/mL killed 22% of the larvae of nematodes (L3). The hydroalcoholic extract of LLP contains active metabolites that act in inhibition eggs hatching on field nematodes and on infective L3. The hydroalcoholic extract of LLP can be an unconventional alternative for the prevention and control of parasites in small ruminant at field level.

Keywords: Hydroalcoholic extract, *Leucaena leucocephala* pods, anthelmintic, field nematodes.

INTRODUCCIÓN

La ovinocultura es una de las actividades agropecuarias de mayor importancia económica en la República Mexicana, debido a la aceptación de su carne y subproductos por parte de la población; el sistema de producción que predomina en esta especie es el extensivo, sistema en el cual son frecuentes las parasitosis, debido a que existen especies de nematodos gastrointestinales que cumplen con su ciclo biológico en los pastizales ([González et al., 2012](#); [Roeber et al., 2013](#)).

Algunos de los nematodos que afectan a los pequeños rumiantes con mayor prevalencia en México son: *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia curticei* y *Oesophagostomum columbianum* ([González et al., 2012](#)). Las parasitosis afectan directamente a la economía de los productores de ovinos, debido a que provocan pérdidas asociadas a reducción en las tasas de crecimiento en animales jóvenes, bajas condiciones corporales, reducción de la fertilidad, aumento de susceptibilidad a enfermedades de diferentes orígenes e incremento en la mortalidad ([Hernández-Alvarado et al., 2018](#); [Zapata et al., 2016](#)).

Actualmente el control de los nematodos gastrointestinales es un reto en los sistemas extensivos de producción de pequeños ruminantes, debido a que algunas poblaciones de nematodos gastrointestinales han desarrollado resistencia a antihelmínticos comerciales ([Torres-Costa et al., 2012](#); Muchiut et al., 2018). Una alternativa de control es a través del uso de metabolitos secundarios extraídos a partir de plantas, como terpenos, alcaloides, las saponinas, antraquinonas y taninos; se ha demostrado que algunos de estos compuestos intervienen en funciones vitales de los nematodos como movilidad, nutrición y posiblemente su reproducción ([Hernández-Alvarado et al., 2018](#)).

Leucaena leucocephala es una arbórea tropical, nativa de Centro América, con propiedades medicinales; que van desde el control de enfermedades estomacales hasta actividad anticonceptiva ([Nehdi et al 2014](#)). Estudios realizados por [Ademola y Idowu en 2006](#), determinaron el efecto nematicida que tienen las semillas de *Leucaena leucocephala* sobre la larva infectiva de *Haemonchus contortus* ([Ademola y Idowu, 2006](#)); al respecto Hernández y colaboradores determinaron la actividad antihelmíntica del extracto hidroalcohólico de *Leucaena leucocephala*, sobre nematodos de pequeños rumiantes ([Hernández et al., 2014](#)).

El objetivo del estudio fue determinar la actividad antihelmíntica del extracto hidroalcohólico de vaina de *Leucaena leucocephala*, sobre algunos nematodos gastrointestinales de ovinos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Se recolectó 1 kg de vainas de *Leucaena leucocephala* (VLL) en el municipio de Soledad de Graciano Sánchez, ubicado en las coordenadas 100°56' de longitud oeste y 22°11' de latitud

norte en el Estado de San Luis Potosí, México. Las vainas fueron colectadas en el mes de julio de 2017, durante la mañana y de por lo menos 10 árboles.

Obtención del extracto

Las vainas de *Leucaena leucocephala* fueron secadas a la sombra a temperatura ambiente, después del proceso de secado se maceraron y mezclaron 240 g de la vaina seca con 2000 ml de una solución hidroalcohólica (30 % metanol y 70% de agua destilada); la filtración, eliminación de solventes y concentración de los metabolitos secundarios se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Rivero y colaboradores ([Rivero-Pérez et al., 2016](#)).

Se realizaron diluciones del extracto con agua destilada estéril para obtener concentraciones de 50, 25, 12.5 y 6.25 mg/ml, de acuerdo a la metodología descrita por Olmedo-Juárez y colaboradores ([Olmedo-Juárez et al 2017a](#)); las cuales fueron evaluadas para determinar la actividad antihelmíntica sobre la inhibición de la eclosión de huevo y mortalidad de larvas de nematodos gastrointestinales *in vitro*.

Inhibición de la eclosión de huevos de nematodos

Se colectaron aleatoriamente 20 muestras, con aproximadamente 30 gramos de heces de ovinos (Suffolk- Hampshire), directamente del recto de cada animal, de una unidad de producción ovina ubicado en el municipio de Tepeapulco en el Estado de Hidalgo. Las muestras fueron identificadas y transportadas a temperatura de refrigeración, en el laboratorio se les realizaron las técnicas de flotación y Mac Master, para identificar la presencia de nematodos gastrointestinales y la cantidad de huevos por gramo de heces, de acuerdo a la metodología descrita por Rivero-Pérez en el 2018. ([Rivero-Pérez et al., 2018](#)).

Recuperación de huevo de nematodos gastrointestinales

Las muestras con más de 1000 huevos por gramo de heces, fueron mezcladas vigorosamente para posteriormente tomar aproximadamente 30 gramos de heces que fueron lavadas en tamices de 200, 100, 75 y 37 micras; para recuperar, concentrar y obtener una solución de huevo limpio, se siguió la metodología descrita por Von Son-de Fernex y colaboradores en el 2015 ([von Son-de Fernex et al., 2015](#)). Se determinó y ajustó la concentración de huevos limpios entre 150-200 huevos en 50 µl.

Evaluación de la inhibición de la eclosión de huevo de nematodos

En una placa de 96 pozos se colocaron 50 µl de una solución previamente ajustada, más 50 µl del extracto a las diferentes concentraciones (50, 25, 12.5 y 6.25 mg/ml); se utilizó como control positivo Ivermectina (5 mg/ml) y como control negativo agua destilada. La placa fue incubada a 30° C por 48 horas; para la lectura de la placa se observaron 10 alícuotas de 10 µl en el microscopio con el objetivo 4x de cada pozo y se determinó la cantidad de huevos y larvas en cada alícuota. Para determinar el porcentaje de inhibición de la eclosión de huevo,

se utilizó la siguiente fórmula descrita por Castillo-Mitre y colaboradores ([Castillo-Mitre., et al 2017](#)):

$$\% \text{ de inhibición de la eclosión} = \frac{L1}{L1 + \text{Huevo}} * 100$$

Donde L1 es igual a larva 1.

Evaluación de la actividad sobre larvas L3 de nematodos Recuperación de larvas L3 de nematodos

Con las muestras de heces restantes de aquellos animales que presentaron más de 1000 huevos por gramo de heces, se realizó un coprocultivo; el cual consiste en mezclar las heces con agua destilada y espuma de poliuretano (1.5 x 1.5x 0.5 cm); para posteriormente incubarlas por 10 días a temperatura ambiente (15 a 20°C). Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a montar la técnica de Bearman para recuperar las larvas L3 de nematodos gastrointestinales, las cuales se lavaron con solución salina saturada, hasta eliminar la mayor cantidad de materia orgánica.

Las larvas limpias fueron desenvainadas en una solución de hipoclorito de sodio al 3%; para eliminar los restos de hipoclorito de sodio las larvas fueron lavadas 3 veces con 3 ml de agua destilada. Se determinó y ajustó la concentración de larvas entre 150-200 larvas en 50 µl.

Evaluación larvicida

En una placa de 96 pozos se colocaron 50 µl de una solución previamente ajustada, más 50 µl del extracto a las diferentes concentraciones (50, 25, 12.5 y 6.25 mg/ml); se utilizó como control positivo Ivermectina (5mg/ml) y como control negativo agua destilada. Se incubó a 30° C por 48 horas. Para la lectura de la placa se observaron 10 alícuotas de 10 µl en el microscopio con el objetivo 4X de cada pozo, y se determinó la cantidad de larvas vivas y muertas. Los datos obtenidos se utilizaron para determinar el porcentaje de mortalidad, y se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de mortalidad} = \frac{\text{Larvas muertas} * 100}{\text{Larvas totales}}$$

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño completamente al azar, los datos obtenidos fueron analizados mediante un análisis de varianza y una comparación de medias por Tukey a un nivel de confianza del 95 %, el paquete estadístico [SAS V9.0](#).

RESULTADOS

Los principales nematodos gastrointestinales observados en las muestras de los ovinos, fueron: *Haemonchus contortus*, *Cooperia spp*, *Ostertagia spp*, *Chavertia spp*, *Moniezia spp* y *Strongyloides spp*; siendo los más frecuentes *Haemonchus contortus* y *Cooperia spp*. Por medio de la técnica de Mc Mater se determinó un promedio de 1,795 huevos por gramo de heces en las muestras colectadas.

Inhibición de la eclosión de huevo de nematodos

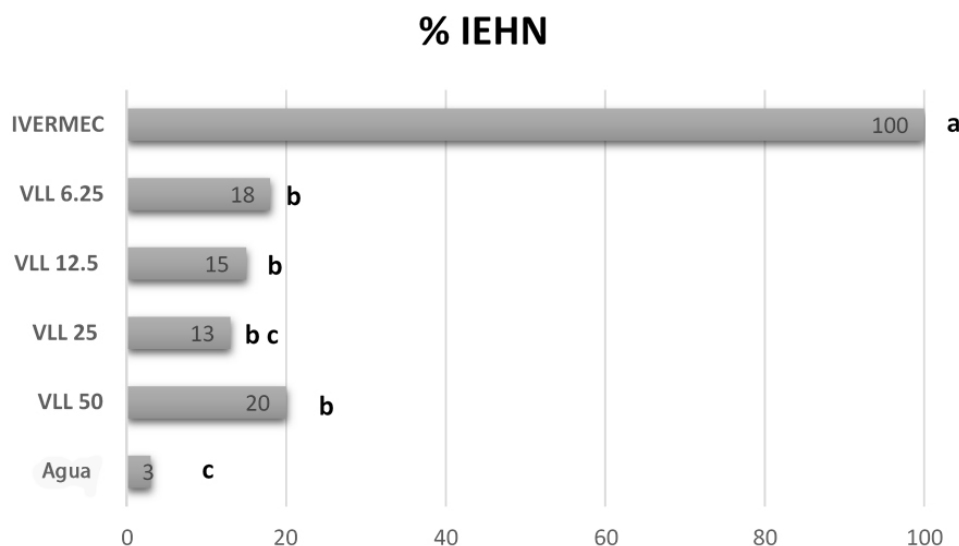
Se determinó un porcentaje de inhibición de la eclosión de 20, 13, 15, 18; para las concentraciones evaluadas 50, 25 y 12.5, 6.25 mg/ml respectivamente. De acuerdo al análisis estadístico no se observaron diferencias significativas entre ellas ($P=0.0001$), la eclosión de los huevos fue inhibida en un 100% por Ivermectina, y el control con agua inhibió la eclosión en un 3%, como se observa en la [Figura 1](#).

Evaluación de la actividad sobre larvas L3 de nematodos

Se determinó un porcentaje de mortalidad larvaria de nematodos gastrointestinales identificados de 10, 16, 20 y 22; y para las concentraciones evaluadas 50, 25 y 12.5, 6.25 mg/ml respectivamente. No se observaron diferencias estadísticas significativas ($P=0.0001$) entre las concentraciones 25 y 12.5, 6.25 mg/ml; la concentración de 50 mg/ml, no mostró diferencias estadísticas significativas con el control de agua y la concentración de 50 mg/ml, como se observa en la [Tabla 1](#). Por su parte la Ivermectina a una concentración de 5 mg/ml, mató al 97% de las larvas.

DISCUSIÓN

Los nematodos gastrointestinales identificados en el presente estudio, corresponden con los identificados en el estudio de prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México; realizado por [González et al., 2012](#), mismos



%IEHN; porcentaje de Inhibición de la eclosión de huevos de nematodos

VLL; extracto hidroalcohólico de vaina de *Leucaena leucocephala*

IVERMEC; Ivermectina a 5 mg/mL

Diferentes literales en las barras indican diferencias estadísticas significativas ($P\leq 0.05$)

Figura 1. Porcentaje de inhibición de la eclosión de huevo de nematodos gastrointestinales de ovino con el uso de extracto hidroalcohólico de vaina de *Leucaena leucocephala*.

Tabla 1. Porcentaje de mortalidad de larvas de nematodos gastrointestinales de ovino con la aplicación de extracto hidroalcohólico de vaina de *Leucaena leucocephala*.

Tratamiento	Concentración	% Mortalidad $\pm$ DE
Agua	0	5 ^d (± 1.7)
VLL	50 mg/mL	10 ^{cd} (± 1.6)
VLL	25 mg/mL	16 ^{bc} (± 1.5)
VLL	12.5 mg/mL	20 ^b (± 2.0)
VLL	6.25 mg/mL	22 ^b (± 0.9)
Ivermectina	5 mg/mL	98 ^a (± 1.5)

VLL; extracto hidroalcohólico de vaina de *Leucaena leucocephala*Diferentes literales indican diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$)

DE; Desviación estándar

que fueron asociados a pérdidas económicas en la producción de pequeños rumiantes de Colombia ([Zapata et al., 2016](#)).

La arbórea *Leucaena leucocephala*, ha sido estudiada debido a su potencial farmacológico por diferentes investigadores, en el caso de la actividad antihelmíntica frente a nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes, se han obtenido diferentes resultados; por su parte Hernández y colaboradores al evaluar en un estudio *in vivo* el extracto de *Leucaena leucocephala* a una dosis de 30 ml por día, determinando una reducción del 54% en la eliminación de huevos y parásitos adultos en corderos Katahdin-Pelibuey ([Hernández et al., 2014](#)).

Sin embargo en el presente estudio el extracto hidroalcohólico de la vaina de *Leucaena leucocephala* a una concentración de 50 mg/ml, inhibe la eclosión del 20% de los huevos; resultados que no coinciden con lo publicado con [Ademola y Indowu \(Ademola and Idowu, 2006\)](#), quienes determinaron que el extracto acuoso de semillas de *Leucaena leucocephala* no afectan la eclosión de los huevos de *Haemonchus contortus*; coincidiendo solo en que el extracto sí afectó la viabilidad de las larvas L3, actividad que fue dependiente en la concentración evaluada. Al respecto, a una concentración de 6.25 mg/ml, se observó el mejor efecto frente a larvas L3, con una mortalidad del 22%; superando a estudios similares, quienes reportan una actividad larvívora a una concentración de 100 mg/ml del extracto de hojas de *Acacia cochliacantha*, frente a los nematodos *Haemonchus contortus* (25%), *Cooperia punctata* (8.5%) y *Haemonchus placei* (16%) ([Olmedo-Juárez., et al 2017b](#)).

Por su parte Von Son-de Fermex y colaboradores realizaron una elucidación de las hojas de *Leucaena leucocephala*, logrando aislar e identificaron un metabolito con actividad frente a *Cooperia* spp a una concentración de 0.06 mg/ml ([von Son-de Fernex et al., 2015](#)). De acuerdo a lo mencionado anteriormente se sugiere realizar una elucidación del extracto de vaina hidroalcohólico de *Leucaena leucocephala* para aislar e identificar la molécula o las

moléculas responsables de la actividad, frente a la inhibición de la eclosión de los huevos y mortalidad larvaria frente a nematodos de campo.

Respecto a lo anterior, Cala y colaboradores mencionan que es necesaria la búsqueda de estrategias novedosas para eliminar y controlar del ciclo de los parásitos asociados a problemas sanitarios en especies de producción como los ovinos, que sean accesibles en cuanto a economía, para que puedan ser utilizados por productores de zonas rurales con bajos recursos ([Cala et al., 2012](#)).

La evaluación de la resistencia antihelmíntica no fue parte del objetivo del presente estudio, sin embargo se determinó que la Ivermectina a una concentración de 5mg/ml, inhibe al 100% la eclosión de huevos y elimina al 98% de las larvas infectantes de los nematodos de campo evaluados en la presente investigación.

CONCLUSIÓN

El extracto hidroalcohólico de vaina de *Leucaena leucocephala*, actúa inhibiendo la eclosión de huevos de nematodos de campo y afectando la viabilidad de las larvas infectivas L3. El extracto evaluado puede ser una alternativa no convencional para la prevención y control del ciclo de las parasitosis de pequeños rumiantes a nivel de campo.

AGRADECIMIENTOS

Los resultados de la presente investigación son parte del proyecto de investigación autofinanciado con número de registro UAEH/DI/ICAp/MVZ/7, así mismo se extiende un agradecimiento a los alumnos y profesores de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

LITERATURA CITADA

ADEMOLA IO, Idowu SO. 2006. Anthelmintic activity of *Leucaena leucocephala* seed extract on *Haemonchus contortus* infective larvae. *Veterinary Record*. 158:485-486. DOI:10.1136/vr.158.14.485.

CALA AC, Chagas ACS, Oliveira MCS, Matos AP, Borges LMF, Sousa LAD, Souza FA, Oliveira GP. 2012. In vitro Anthelmintic effect of *Melia azedarach* L. and *Trichilia clausenii* C. against sheep gastrointestinal nematodes. *Experimental Parasitology*. 130:98-102. DOI:10.1016/j.exppara.2011.12.011.

CASTILLO-MITRE GF, Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, González-Cortázar M, Mendoza-de Gives P, Hernández-Beteta EE. 2017. Caffeoyl and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 204:125-31. DOI: 10.1016/j.jep.2017.04.010

GONZÁLEZ GR, 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. Veterinaria México. 42:125-35. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42319744003>

HERNÁNDEZ-ALVARADO JL, Zaragoza-Bastida A, López-Rodríguez G, Peláez-Acero A, Olmedo-Juárez A, Rivero-Perez N. 2018. Actividad antibacteriana y sobre nematodos gastrointestinales de metabolitos secundarios vegetales: enfoque en Medicina Veterinaria. *Abanico veterinario*. 8:14-27. ISSN: 2448-6132. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322018000100014&nrm=iso.

HERNANDEZ PM, Salem AZM, Elghandour MMY, Cipriano-Salazar M, Cruz-Lagunas B, Camacho LM. 2014. Anthelmintic effects of *Salix babylonica* L. and *Leucaena leucocephala* Lam. extracts in growing lambs. *Tropical Animal Health and Production*. 46:173-178. ISSN: 1573-7438. DOI: 10.1007/s11250-013-0471-7.

NEHDI IA, Sbihi H, Tan CP, Al-Resayes SI. 2014. *Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit seed oil: Characterization and uses. *Industrial Crops and Products*. 52:582-587. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.11.021>

OLMEDO-JUAREZ A, Rojo Rubio R, Mendoza-de Gives P, Vázquez-Armijo JF, Albarran-Portillo B, Garcia-Hernandez C. 2017a. Ovicidal effect of the fruit and leaf of *Caesalpinia coriaria* against *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei*. *Journal of Animal Science*. 4(1):15-22, <https://doi.org/10.2527/asasann.2017.030>.

OLMEDO-JUÁREZ A, Rojo-Rubio R, Zamilpa A, Mendoza de Gives P, Arece-García J, López-Arellano ME. 2017b. *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Veterinary Research Communications*. 41(3): 227-32. DOI: 10.1007/s11259-017-9687-8

RIVERO-PEREZ N, Ayala-Martinez M, Zepeda-Bastida A, Meneses-Mayo M, Ojeda-Ramirez D. 2016. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of spent *Pleurotus ostreatus* substrates in mouse ears treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Indian Journal of Pharmacology*. 48:141-144. DOI: 10.4103/0253-7613.178826.

RIVERO-PEREZ N, Zaragoza-Bastida A, Vega-Sánchez V, Olave-Leyva I, Vega-Angeles J, Peña-Jiménez F. 2018. Identificación de los principales parásitos gastrointestinales en burros del Valle de Tulancingo. *Abanico veterinario* . 8: 47-52. ISSN: 2448-6132. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2448-61322018000100047&nrm=iso.

ROEBER F, Jex AR, Gasser RB. 2013. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnology Advances*. 31:1135-1152. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.008.

SAS Institute. 2010. Statistical Analysis Software SAS/STAT®. version 9.0.2, Cary, N.C., USA: SAS Institute Inc., ISBN: 978-1-60764-599-3, Disponible: http://www.sas.com/en_us/software/analytics/stat.html#.

TORRES-ACOSTA JFJ, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Caballero AJ, Cuéllar-Ordaz JA. 2012. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Veterinary Parasitology*. 189(1):89-96. DOI: 10.1016/j.vetpar.2012.03.037

VON SON-DE FERNEX E, Alonso-Díaz MT, Mendoza-de Gives P, Valles-de la Mora B, González-Cortazar M, Zamilpa A, Castillo-Gallegos E. 2015. Elucidation of *Leucaena leucocephala* anthelmintic-like phytochemicals and the ultrastructural damage generated to eggs of *Cooperia* spp. *Veterinary Parasitology* . 214:89-95. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.10.005.

ZAPATA-SALAS R, Velásquez-Vélez R, Herrera-Ospina LV, Ríos-Osorio L, Polanco Echeverry DN. 2016. Prevalencia de Nematodos Gastrointestinales en Sistemas de Producción Ovina y Caprina bajo Confinamiento, Semiconfinamiento y Pastoreo en Municipios de Antioquia, Colombia. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*. 2016 (27):11-19. ISSN: 1682-3419. DOI: 10.15381/rivep.v27i2.11647