

**EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON SEMILLA DE *Canavalia ensiformis*
SOBRE PARÁMETROS SANGUÍNEOS DE OVINOS TROPICALES
CON INFECCIONES PARASITARIAS GASTROINTESTINALES**

***Effect of Supplementation with Canavalia ensiformis Seeds on Blood Variables
of Parasitised Tropical Lambs***

Luisana Guerrero*, Mario Rossini**, Angélica Bethencourt**, Omar Colmenares****, Emma Rueda de Arvelo***** y Leyla Ríos de Álvarez*****,¹

*Cátedra de Microbiología e Inmunología, **Cátedra de Patología y ***Cátedra de Parasitología, FCV, UCV.
****Universidad Rómulo Gallegos, San Juan de Los Morros. *****Laboratorio de Enzimología y Toxicología, Cátedra de Bioquímica, FCV, UCV. ***** Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación Tibaitatá, Salud y Bienestar Animal

Correo-E: lriosdea@corpoica.org.co

Recibido: 16/01/16 - Aprobado: 00/00/16

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de la suplementación con semilla molida de *Canavalia ensiformis* sobre la hematología y la química sanguínea, se distribuyeron al azar 21 corderas West African, balanceadas por peso y carga parasitaria gastrointestinal en tres grupos homogéneos (n=7). Los animales pastorearon 6 h/d, luego de la suplementación con uno de los tres tratamientos: T (sin canavalia), C (2,5g de canavalia/kg PV) y C+ (5g de canavalia/kg PV). Las variables sanguíneas se determinaron a través de muestreos bisemanales y se analizaron a través de un ANAVAR. Los resultados indicaron que C+ causó anemia debido a los valores menores de hematocrito (25,6%) en comparación con T (28,3%) y C (26,2%) (P=0,0003); y con valores de hemoglobina menores en C+ (8,8 g/dL), en comparación con T (9,8 g/dL) y C (9,15 g/dL) (P=0,0006). Los valores de alanina transaminasa, glucosa y colesterol, de todos los animales, se encontraron dentro de los rangos referenciales. En conclusión, la suplementación con 5 g/kg PV de semillas molidas de *Canavalia ensiformis*, puede provocar signos

ABSTRACT

The purpose of this investigation was to evaluate the effect of supplementation with *Canavalia ensiformis* ground seeds on hematology and blood chemistry of West African lambs. For that, a total of 21 lambs (grouped by similar weights and parasite load) were randomly divided into three homogeneous groups of seven animals each (n=7). The animals grazed 6 hours/day, after supplementation with one of the following three treatments: T (not supplemented with canavalia); C (supplemented with 2.5g canavalia/kg BW); and C+ (supplemented with canavalia 5g/kg BW). Blood variables were determined through sampling biweekly and analyzed through ANOVA. The results of the investigation showed that the C+ group caused anemia, as reflected by a lower hematocrit value (25.6%), when compared to T (28.3%) and C (26.2%); (P=0.0003). Furthermore, hemoglobin levels were also lower for C+ (8.8 g/dL), as compared to T (9.8 g/dL) and C (9.15 g/dL); (P=0.0006). Alanine transaminase, glucose and cholesterol values of all animals were within reference ranges for the species. In conclusion, supplementation with a higher amount

¹ A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

de anemia en corderas tropicales en crecimiento. En menor proporción (2,5 g/kg PV) no afecta la hematología ni la química sanguínea.

(Palabras clave: Corderas; hemoglobina; hematocrito; células blancas; ALT; AST; glucosa; colesterol)

of canavalia seeds (5g/kg BW), can cause signs of anemia in growing tropical lambs. In contrast, a lesser proportion of this substance (2.5g/Kg BW) did not affect hematology and blood chemistry.

(Key words: lambs; hemoglobin; hematocrit; white cells; ALT; AST; glucose; cholesterol)

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas que afecta la productividad en rebaños de pequeños rumiantes, es la infección con parásitos gastrointestinales, debido a que ocasiona disminución de la fertilidad, muerte de animales jóvenes y efectos negativos sobre la tasa de crecimiento, la producción de leche y lana [1, 2]. Entre los principales causantes de las parasitosis, se encuentran los nematodos gastrointestinales [3, 4], que afectan la salud de los animales y ocasionan pérdidas económicas en todo el mundo [5].

Las infestaciones parasitarias pueden ocasionar cambios en la concentración de algunos constituyentes sanguíneos [6], como en el caso de los estróngilos digestivos. En infecciones con *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei* y, en menor grado, *Teladorsagia circumcincta*, se han observado cuadros de anemia, en los cuales el porcentaje del volumen total de la sangre compuesto por los glóbulos rojos (hematocrito) (Hto) y los valores de hemoglobina (Hb) disminuyen, como consecuencia de la pérdida de sangre, insuficiencia de la hematopoyesis, carencia de hierro y perturbación de la absorción intestinal de nutrientes [7]. Se ha planteado que las referencias de valores hematológicos normales en ovinos reflejan la influencia del parasitismo gastrointestinal debido a que los ovinos sufren parasitosis con mucha frecuencia [8].

Se ha reportado pérdida de proteína por el animal, debido a la salida de plasma al tracto digestivo, al aumento en la producción de moco y a la proliferación de células caliciformes, como respuesta a la irritación causada por el parásito [9]. Adicionalmente, los parásitos hematófagos como *Haemonchus contortus* pueden producir pérdida de proteínas plasmáticas como consecuencia de sus hábitos hematófagos. La pérdida de proteína se equilibra con el incremento de la síntesis de albúmina, que posteriormente declina, provocando hipoproteinemia [10].

A nivel inmunológico, los linfocitos T, activados por los antígenos de los parásitos, elaboran factores que estimulan la producción y liberación de eosinófilos [11], provocando, en los corderos en crecimiento, pérdida de peso y de lana, anorexia, mucosas y conjuntivas pálidas, apatía, diarreas intermitentes, edema submandibular y, en algunos casos, incluso la muerte [12].

La severidad de la infección varía de acuerdo al número de parásitos presentes en el animal y su estado nutricional. Asimismo, diferencias de susceptibilidad a las infecciones parasitarias han sido señaladas tanto interraciales como entre individuos de una misma raza [1].

En algunas circunstancias, los parásitos tienen pequeños refugios, como ocurre en el sobrepastoreo, desarrollándose resistencia de éstos hacia los productos antihelmínticos utilizados con mayor frecuencia [12], lo que ha motivado al estudio de terapias alternativas para el tratamiento y control de las parasitosis. En este sentido, es conocido el uso de algunas especies de plantas en el control de las parasitosis gastrointestinales [13]. Al respecto, las semillas de *Canavalia ensiformis* contienen una lectina llamada Concanavalina A, cuya acción como antiparasitario ha sido reportado [14]. En el presente estudio, se plantea evaluar el efecto de la suplementación con semillas de *Canavalia ensiformis*, sobre parámetros sanguíneos de ovinos tropicales en crecimiento, como parte de una investigación de mayor amplitud que abarca su potencial uso como antihelmíntico en rumiantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación del Experimento

El presente experimento se desarrolló en las instalaciones del Laboratorio-Sección de Ovinos de la Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela, ubicada en la ciudad de Maracay, estado

Aragua, en un área de Bosque Seco Tropical a 10° 16' 20" N y 67° 36' 35" O y una altura de 450 msnm. La precipitación media anual es de 1188 mm, con un período de lluvias comprendido entre mayo y octubre, de sequía entre noviembre y abril, con humedad relativa comprendida entre 67 y 78% [15].

Diseño Experimental

Se utilizaron 21 corderas de alto mestizaje West African, destetadas en crecimiento, de 5 meses de edad aproximadamente y con peso promedio inicial de $20 \pm 4,9$ kg. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, en el cual se consideró el factor dosis de *C. ensiformis*, en tres niveles 0; 2,5 y 5 g/kg de peso vivo (PV). Los animales fueron asignados a uno de los siguientes tratamientos:

- Grupo control testigo (T): corderas suplementadas con 60% de residuo industrial (nepe) seco de cervecera y 40% fibra de maíz o grupo testigo.

- Grupo C: corderas suplementadas con 52,5% de nepe seco de cervecera, 35% fibra de maíz y 12,5% de semilla molida de *C. ensiformis* (2,5 g/kgPV).

- Grupo C+: corderas suplementadas con 45% de nepe seco de cervecera, 30% fibra de maíz y 25% de semilla molida de *C. ensiformis* (5 g/kg PV).

Los grupos se balancearon por peso y carga parasitaria inicial, tomando como carga mínima 150 huevos por gramo de heces (HPG). La duración del experimento fue de 77 d.

Manejo de los Animales

Los animales fueron sometidos a una semana de pre-ensayo, para el acostumbramiento a la *C. ensiformis*. Diariamente, en horas de la mañana (7:00 h), los animales pasaban de un corral colectivo a puestos individuales, previamente identificados, durante el cual se les suministró agua a voluntad y los respectivos suplementos. Posteriormente, fueron llevados en un solo grupo a pastoreo, entre las 9:00 y las 15:00 h, en potreros con predominio del pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), luego de lo cual regresaban al corral colectivo, donde permanecían estabulados con agua limpia y minerales *ad libitum*, hasta el día siguiente.

El suplemento fue ofrecido en función del 2% del PV, y el resto de la materia seca fue aportada por el pasto consumido durante las horas de pastoreo,

basado en lo propuesto por la NRC [16]. El suplemento suministrado a los animales del grupo testigo (T), fue el usado de rutina en el Laboratorio- Sección de Ovinos-UCV, constituido por nepe seco de cervecera (aportado por Empresas Polar) y fibra de maíz (residuo del procesamiento de maíz, aportado por la Empresa Indelma). Para los tratamientos C y C+ se usó el mismo suplemento anteriormente descrito, sustituyendo parte de sus componentes (nepe seco de cervecera y fibra de maíz), por semilla molida de *C. ensiformis* cuidando de mantener los tres suplementos aproximadamente isoproteicos. Semanalmente, posterior al pesaje de los animales y durante todo el periodo experimental, se ajustó el suplemento a ofrecer de manera individual.

Los tres suplementos fueron similares entre sí, variando en el porcentaje de inclusión de *C. ensiformis* pero no en la composición bromatológica, lo que eliminaría cualquier posible efecto de diferencias de composición de los suplementos en los resultados (T: 25,09; C: 26,15 y C+: 26,83 %PC).

Los animales recibieron el tratamiento sanitario de rutina, propio de la Sección de Ovinos, que incluye desinfección del cordón umbilical con solución yodada, un tratamiento preventivo pre-destete con coccidiostato al 5% (Baycox®, Laboratorios Bayer) y las vacunaciones un mes después del destete con bacterina clostridial (Covexin®, Laboratorios Intervet), antirábica (Ravax, Laboratorios Cala) y aftosa (Aftovac, Laboratorio Laverlam).

Al inicio del experimento, la carga parasitaria, expresada como cantidad de HPG, fue de 1357 ± 1232 , con predominio de los géneros *Bunostomum* (61%), *Haemonchus* (20%) y *Cooperia* (10%). El conteo de ooquistes de Eimeria, expresado en ooquistes/g de heces (OPG) fue de 1929 ± 1652 .

Pruebas Sanguíneas

Las muestras fueron tomadas entre las 8:00 y 10:00 h, cada dos semanas, a los animales en ayuno. Las muestras sanguíneas fueron extraídas por venopunción yugular, luego de la antisepsia de la zona de punción con alcohol isopropílico al 70% v/v.

1) **Hematología:** Para las evaluaciones hematológicas se utilizaron tubos Vacutainer® con anticoagulante (EDTA). Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Patología Clínica de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad

Central de Venezuela, en un lapso no mayor de 8 h después de su recolección. Se determinó: hematocrito (Hto) por el método de microhematocrito por centrifugación [17], hemoglobina (Hb) utilizando el método de cianometahemoglobina por espectrofotometría [18], proteínas totales (PT) por refractometría [8] y contaje diferencial de células blancas (neutrófilos, eosinófilos y linfocitos) en un frotis de sangre completa, teñido con hemacolor observado al microscopio con aumento de 40X [11]. Se determinó la concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) [(Hb/Hto)x100].

2) *Química sanguínea*: Se realizó a partir de muestras de sangre obtenidas con tubos Vacutainer® sin anticoagulante. Estas muestras fueron centrifugadas a 1500 g por 10 min para obtener el suero, que fue dividido en dos alícuotas en viales de 1,5 mL y almacenadas a 4°C hasta su procesamiento, en un lapso no mayor de 4 h. Se leyó la absorbancia en un equipo de química sanguínea de tipo húmeda (Stat Fax 1904), que cuenta con un sistema de aspirado tipo mosquito, para evaluar las variables alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), colesterol, urea, glucosa y bilirrubina total [17].

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico Statistix 8 [19]. La normalidad fue evaluada por el test de Wilk Shapiro, se aplicó estadística descriptiva paramétrica de tendencia central (media aritmética) y de dispersión (desviación estándar), para todos los análisis se consideró un nivel de significación de 5% ($\alpha=0,05$). Fueron analizados los supuestos del Anavar, aplicándose estadística paramétrica a las variables de hematología. En el caso de las variables de química sanguínea, se determinó que los datos de bilirrubina y urea no se distribuyen normalmente, por lo cual se eliminaron datos que estuvieran 3 desviaciones estándar por encima de la media; posteriormente, se le aplicó estadística paramétrica a todas las variables de química sanguínea. Cuando se encontró diferencia significativa, se aplicó la prueba de medias de Tukey. Se utilizó el siguiente modelo estadístico [20]:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + s_j + (\tau_i \times s_j) + \varepsilon_{ijk}$$

i = Niveles del factor dosis de *C. ensiformis* (1, 2, 3)

j = Niveles de semana (1,3,5,7,9,11)

k = Repeticiones (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7)

Donde:

y_{ijk} = Variable sanguínea de la cordera "k" sometida al tratamiento "i" medida en la semana "j"

μ = Media general

τ_i = Efecto del i-ésimo dosis de *C. ensiformis*

s_j = Efecto de la j-ésima semana

$(\tau_i \times s_j)$ = efecto de la interacción de primer orden del i-ésimo nivel del factor dosis de *C. ensiformis* y el j-ésimo nivel del factor semana.

ε_{ijk} = Efecto del error experimental normal e independientemente distribuido con media 0 y varianza σ^2 .

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas Sanguíneas

Hematología

Hematocrito (Hto)

Se encontró un efecto significativo del tratamiento ($P=0,0003$), teniéndose que en las corderas que consumieron *C. ensiformis* los valores de Hto fueron menores (Figura 1). El tratamiento C+ fue el de menor valor con $25,57 \pm 1\%$, y el único que se encuentra por debajo del rango referencial según Schalm *et al.* [8], seguido de C con $26,23 \pm 2\%$ y el tratamiento T, con el mayor valor de $28,28 \pm 1\%$. Posterior a la prueba de medias de Tukey, el promedio del tratamiento C+ resultó ser significativamente inferior al resto. Es importante resaltar que a pesar de las diferencias estadísticas, todas las medias obtenidas se encuentran dentro de los rangos referenciales citados por Medway *et al.* [21], aunque difieren de lo reportado por otros autores en un estudio realizado en el occidente venezolano, en ovinos de diferentes razas tropicales, entre las que se encuentra la West African, con valores de Hto de $30,12 \pm 5,75\%$ [22].

Hemoglobina (Hb)

Se observó un efecto del tratamiento sobre los valores de Hb ($P=0,0006$). Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 2. Los valores de Hb disminuyeron con el aumento de la dosis de *C. ensiformis*, resultando estadísticamente distintos los tratamientos T y C+ ($P<0,0001$). De estos resultados, se estima que el suplemento proporcionado a los animales tuvo efectos distintos entre los grupos,

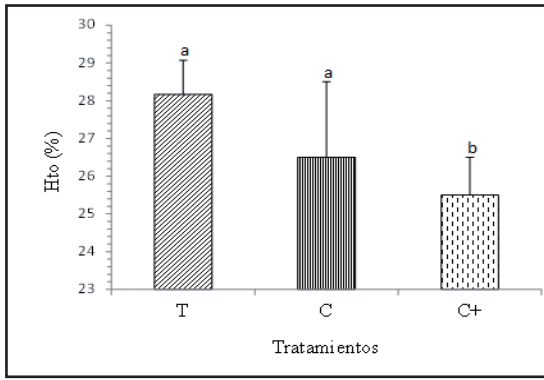


Figura 1. Valores de hematocrito (Hto; promedio \pm DE; %) en sangre periférica de corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

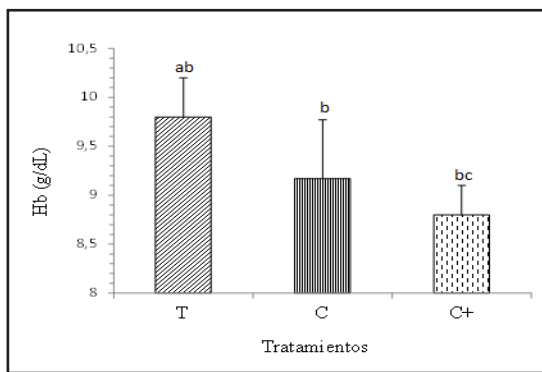


Figura 2. Valores de hemoglobina (Hb; promedio \pm DE; g/dL) en sangre periférica de corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

en este caso la media del tratamiento C+ es el menor valor ($8,80 \pm 0,3$ g/dL) y el único que está por debajo del valor de referencia señalado por Medway *et al.* [21], y todos a su vez están dentro de los rangos referenciales [8]. En la investigación mencionada anteriormente, llevada a cabo en el occidente venezolano, los valores de Hb se encontraron entre 9,11 y 9,33 g/dL [20], de este modo, el tratamiento C+ estaría por debajo de este rango. Tanto los valores de Hto como los de Hb se vieron afectados por los tratamientos y tuvieron una correlación altamente significativa (valor?) y positiva, lo que se considera un resultado pertinente, pues en esencia toda la hemoglobina está presente dentro de los eritrocitos, por lo que el Hto y el contenido de Hb están correlacionados [11]. No se observó ningún efecto sobre el CHCM, con valores de $34,79 \pm 0,6$; $34,62 \pm 1,4$ y $34,54 \pm 1,5$ para T, C y C+, respectivamente.

En un estudio realizado anteriormente, en un lote de

ovinos preseleccionado como reproductores de reemplazo, con la finalidad de relacionar los valores de Hto y Hb con los niveles de infestación por estrongilos digestivos, se reportó un efecto del nivel de infestación parasitaria sobre estos valores sanguíneos, que resultó, en general, inferior en las borregas con infestaciones altas, siendo la diferencia entre los tratamientos estadísticamente significativa [7].

Eosinófilos

Luego de 11 semanas de experimentación, el conteo de eosinófilos también fue afectado por los suplementos ofrecidos ($P = 0,0086$) (Figura 3). El tratamiento C resultó ser estadísticamente diferente y el más bajo con $6,19 \pm 2\%$, y siendo el único dentro de los rangos referenciales, es estadísticamente distinto a T y C+, los cuales se ubican por encima de los valores referenciales [17], siendo el grupo testigo el que evidenció un mayor conteo de estas células. De todos los animales experimentales, los tratamientos T y C+ presentaron eosinofilia, la cual pudo deberse a la parasitosis que padecían, ya que esta condición se presenta en animales infestados, especialmente por trematodos y nematodos [23]. Esta eosinofilia aparece con mayor frecuencia cuando los parásitos están migrando en el intestino, más que cuando se encuentran dentro de él [11]. Se ha señalado que los eosinófilos se incrementan en sangre como reflejo de hipersensibilidad en infestaciones parasitarias en las cuales los parásitos penetran el tejido del animal y producen daño por migración, produciéndose esta respuesta inmune cuando hay una sensibilización a las proteínas parasitarias que son liberadas al organismo [8, 17]. En una investigación con ovejas mestizas West

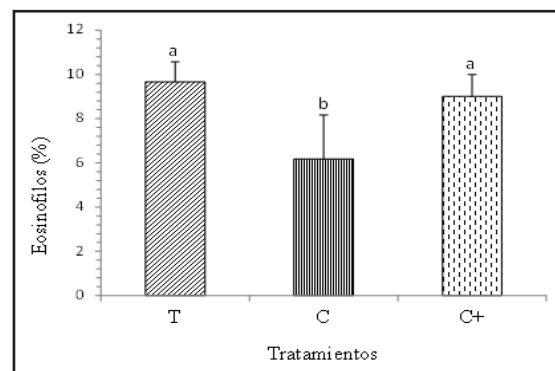


Figura 3. Valores de eosinófilos (promedio \pm DE ; %) en sangre periférica de corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P < 0,05$)

African en el estado Yaracuy, se estudió la influencia de la infestación parasitaria por nematodos digestivos sobre el comportamiento leucocitario de los animales y se determinó que el elevado contejo de eosinófilos fue producto de una estimulación inmunológica por parte de los antígenos de los parásitos, viéndose reflejado en el mayor valor de estas células en los grupos de animales con niveles negativos o moderados de HPG [24].

Linfocitos

El nivel de linfocitos no fue afectado por los suplementos ofrecidos ($P=0,1918$); pero los valores en las diferentes semanas fueron estadísticamente diferentes ($P=0,0265$), con un comportamiento variable a lo largo del período experimental (Figura 4). Los muestreos de las semanas 9 y 11 resultaron estadísticamente diferentes entre sí. Con respecto a las demás semanas, las medias se mantuvieron entre 57,61 y 68 %, todas dentro de los rangos normales [17].

Neutrófilos

Las medias de neutrófilos, luego de 11 semanas de experimentación, se vieron afectadas por los suplementos suministrados a los animales ($P=0,0087$), así como también los promedios semanales ($P=0,0029$) (Figura 5), manteniéndose durante el ensayo las medias de

los tratamientos, dentro de los rangos referenciales [17]. Las semanas 3 y 9 resultaron estadísticamente diferentes.

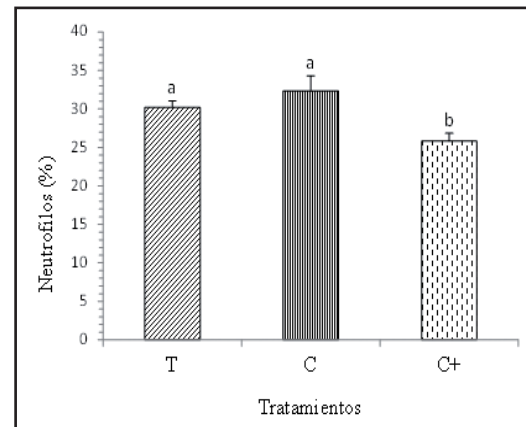


Figura 5. Valores de neutrófilos expresados (promedio \pm DE; %) en sangre periférica de corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas. Letras diferentes indican diferencias significativas ($P<0,05$).

Los valores de linfocitos y neutrófilos en la investigación llevada a cabo por Sandoval [25], no presentaron mayores variaciones durante el período de observación, lo cual coincide con nuestros resultados, en los cuales, según se puede ver en las Figuras 4 y 5, los valores se mantienen dentro del rango referencial, con un comportamiento variable debido a que la función primaria de estas células, no está directamente relacionada con el proceso parasitario.

Proteínas Totales (PT)

Los valores de PT se comportaron diferente a través de las semanas del muestreo (Figura 6), siendo diferentes estadísticamente ($P=0,0353$), sin efecto de los tratamientos sobre los valores de PT ($P=0,3283$), los cuales aumentaron durante las 11 semanas de duración del experimento, en todos los tratamientos, lo que pudo estar relacionado con la edad de los animales.

Los valores referenciales de PT van de 5,9 a 7,8 g/dL [26], de esta manera se consideran dentro del rango todos los valores de este experimento, por lo que se estima que ninguno de los animales presentó hipoproteïnemia, lo que difiere de otros resultados en estudios con animales altamente parasitados.

La hipoproteïnemia puede ocurrir por la pérdida de sangre que ocasionan ciertos parásitos hematófagos, o por una condición nutricional, debida a la disminución del consumo de agua y alimento [8,

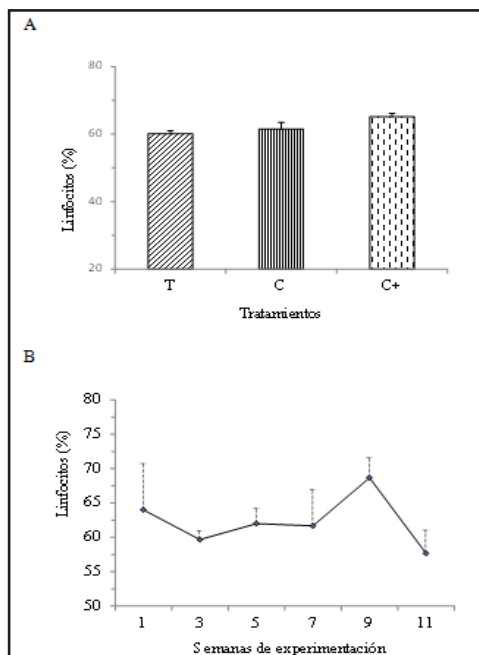


Figura 4. Valores de linfocitos (promedio \pm DE; %) en sangre periférica de corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas. A. Promedio de las once semanas. B. Promedios semanales incluyendo todos los tratamientos. No se observó efecto de tratamientos.

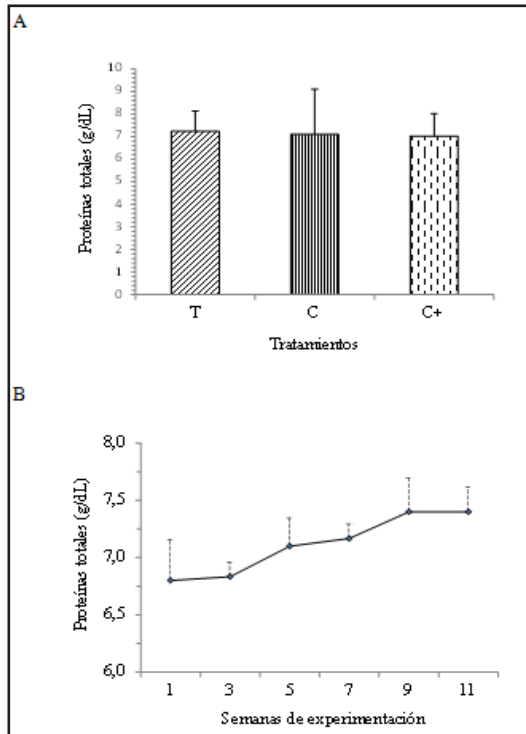


Figura 6. Valores de proteínas (promedio \pm DE; g/dL) en sangre periférica de corderos West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas. A. Promedio de las once semanas. B. Promedios por semana. Las barras verticales indican las desviaciones estándar. No se observaron efectos del tratamiento

25], asociada también a animales con problemas hepáticos que se refleja en hipoalbuminemia [8, 17]. La disminución de las PT a causa de las parasitosis fue reportada en corderos West African, en las cuales las PT se incrementaron después de recibir un tratamiento simultáneo con antianémico y antihelmíntico [25].

Al estudiar la influencia de la nutrición proteica sobre la patogenicidad de una infestación de *H. contortus* alimentando a los animales con dos niveles proteína, bajo y alto, y, posteriormente infectando a 4 corderos de cada grupo a los 4 meses de edad, con 350 larvas/kg PV, y un grupo control sin infectar, se observó que, los animales infectados presentaron anemia e hipoproteinemia, con mayor severidad en el grupo con bajo nivel de proteína [27]. Sin embargo, ambos grupos infectados respondieron bien ante la pérdida sanguínea gástrica, aumentando la tasa de producción de eritrocitos. Los niveles normales de PT en las corderos de todos los tratamientos, en el presente estudio, pueden ser consecuencia del contenido de proteína suministrado en la dieta.

Química Sanguínea

Bilirrubina total

La interacción entre el efecto tratamiento y semana fue significativa ($P=0,0519$). La bilirrubina total fue variable en todos los tratamientos en el tiempo de muestreo. En la primera semana, se observaron diferencias con valores más altos en los animales del tratamiento C+ (Figura 7). Los rangos de referencia van de 0,1 a 0,5 mg/dL [26]. En el presente experimento, en la semana 1, todos los animales estaban por encima de este rango, y los animales de los tratamientos que consumieron *C. ensiformis* presentaron los mayores valores. En el siguiente muestreo, todos los tratamientos experimentaron un descenso abrupto para entrar dentro de los valores citados como normales, y, en líneas generales, los animales presentaron esta tendencia hacia la normalidad a medida que avanzaba el ensayo y se mantuvieron así hasta el final del mismo.

Estos resultados demuestran el efecto hepático que podrían tener los suplementos suministrados en los animales, ya que según estos resultados hubo una reacción del hígado, aumentando los niveles de bilirrubina en la primera semana de muestreo. Se estima que la inclusión de *C. ensiformis* pudo causar esta reacción ya que a medida que se incrementó la

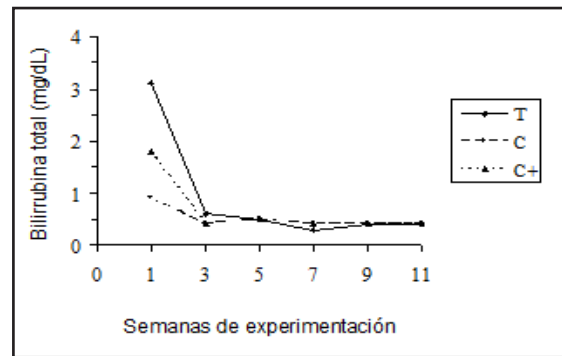


Figura 7. Interacción tratamiento-semana en el contenido de bilirrubina (promedio \pm DE; mg/dL) en corderos West African suplementados (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas

dosis, el valor sérico de bilirrubina total fue mayor.

Se ha reportado que el consumo de taninos en ovinos puede provocar aumento de la bilirrubina total, inclusive a medida que transcurre el tiempo, con moderada degeneración vacuolar de los hepatocitos [28], lo que indica que ante el daño hepático, la bilirrubina total aumenta de manera continua.

Por ser la bilirrubina un producto del catabolismo del grupo hemo presente en la hemoglobina, estos resultados concuerdan con los obtenidos en las mediciones de Hb y Hto. Los menores valores de Hb y Hto pueden estar asociados a una mayor degradación de hemoglobina y, por ende, mayor bilirrubina sérica, tal como se observó en los animales que recibieron el tratamiento C+.

Alanina aminotransferasa (ALT)

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ($P=0,0277$), así como también sus medias semanales ($P=0,0039$) (Figura 8). El rango normal de ALT reportado para ovinos se ubica entre 14,8 y 43,8 U/L [26]. En el presente estudio, se obtuvieron valores de $22,37 \pm 3,9$ U/L para los animales del grupo testigo (T), seguido del grupo C con $19,02 \pm 3,1$ U/L y por último, el grupo C+ con $18,40 \pm 2,9$ U/L, aunque todos los promedios se encuentran dentro de los rangos normales para esta especie, hay una diferencia estadística entre los tratamientos que puede ser explicada por los componentes de las semillas de *C. ensiformis* que se suministró a los animales de los tratamientos C y C+, en los cuales disminuyó significativamente la actividad de la enzima ALT en el suero, lo que puede estar relacionado con el efecto antiparasitario de la concanavalina A, una lectina contenida en esta leguminosa, que a su vez repercute en la reducción del daño hepático causado por algunos géneros de parásitos [14].

Colesterol

Se encontró un efecto significativo del tratamiento ($P<0,0001$) y de la semana ($P<0,0001$) sobre esta variable, lo que indica que el colesterol sérico en ovinos puede verse modificado por el consumo de diferentes niveles de *C. ensiformis*. Los valores encontrados se

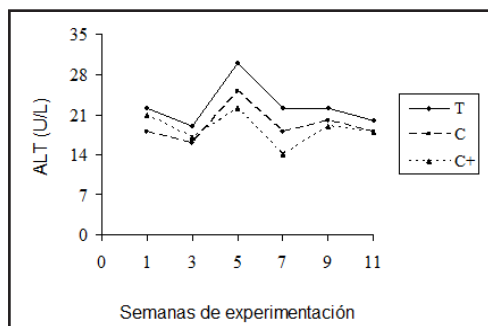


Figura 8. Valores de la actividad de la enzima alanina aminotransferasa (ALT) expresados en promedio \pm DE (U/L) en corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas

encuentran dentro de los rangos señalados como normales para ovinos, que van desde 44,1 hasta 90,1 mg/dL [26]. Los resultados obtenidos en el presente estudio se presentan en la Figura 9. El tratamiento C+ resultó ser estadísticamente inferior a los otros dos tratamientos.

Se ha señalado que la presencia de *Bunostomum* en el íleon y yeyuno de rumiantes produce anemia, hipoproteinemia e hipocolesterolemia [29], y, tanto el tratamiento T como C+ presentaron elevados contajes de este género parasitario, no obstante, ninguno de los animales fue calificado en condición

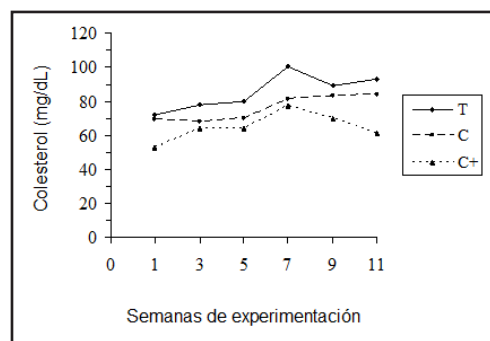


Figura 9. Valores de colesterol sérico (promedio \pm DE; mg/dL) en corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas

de hipocolesterolemia. Este parámetro también es considerado un indicador de la integridad celular y necrosis hepática, aporta detalles del estatus energético del animal por ser un componente de los indicadores lipídicos [30] y de alguna manera del balance energético del animal [31], por estas razones el hecho de que todos los valores se encuentren dentro de los rangos referenciales, sugiere que en ninguno de los tratamientos del experimento ocurrió daño hepático.

Glucosa

En este caso las medias semanales fueron estadísticamente diferentes ($P<0,0001$) (Figura 10), mientras que los tratamientos presentaron valores similares ($P=0,0572$), por lo que se plantea que los suplementos no influyeron a través de las semanas de muestreo. El promedio de este valor fue de $59,30 \pm 16,11$ mg/dL, el cual se considera dentro de los valores normales reportados en ovinos, que van desde 44,0 hasta 81,2 mg/dL [26].

La concentración de glucosa sérica se usa en perfiles metabólicos como un estimador nutricional para indicar el balance proteico y energético del

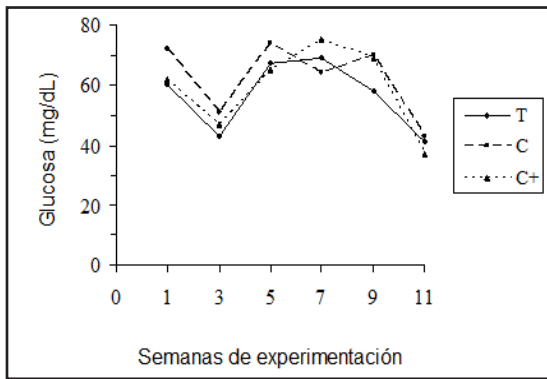


Figura 10. Valores de Glucosa sérica (promedio \pm DE; mg/dL) en corderas West African suplementadas (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas

animal, al igual que los cuerpos cetónicos y los ácidos grasos no esterificados, esta afirmación es apoyada por los resultados de autores [32], que obtuvieron mayores valores de glucosa sérica en animales de los grupos que consumieron más proteína. Se ha reportado que, en animales sanos, la disminución de la concentración de glucosa en sangre sólo se presenta cuando existe un marcado déficit energético [33]. En el presente experimento, los resultados indican que los animales de todos los tratamientos consumieron dietas adecuadas, con un buen balance nutricional, durante el tiempo de muestreo.

Urea

Los valores de urea no resultaron estadísticamente diferentes para los distintos tratamientos ($P=0,9866$), ni semanas ($P=0,0723$). El rango referencial es de 10,3 a 26,0 mg/dL [26] y en el caso del presente experimento todos los valores estuvieron fuera del rango y por encima de los valores referenciales anteriormente mencionados. Los niveles de urea en sangre están influenciados por factores como el consumo de proteínas, el nitrógeno no proteico en la dieta, el catabolismo tisular (aumentado en el ayuno prolongado) y los niveles de energía en la dieta, este último por la estrecha relación que existe entre ambos metabolismos [34].

El contenido de urea en sangre, es reflejo del consumo de proteína. Se plantea que, en animales que consumen niveles adecuados de proteínas, se mantienen dentro de los rangos referenciales [35]. El daño renal, toxemias y dietas hiperproteicas aumentan los valores de urea sanguínea [36]. Este aumento en la uremia se debe a una mayor absorción de amoníaco en el rumen y por consiguiente aumento de la síntesis de urea en

el hígado [34], lo que podría explicar por qué en el presente experimento la uremia de todos los animales se mantuvo por encima de los valores referenciales, ya que todos los grupos consumieron dietas consideradas altas en proteína.

La presencia de taninos en la dieta puede, también, modificar la concentración de urea sérica, tal como fue reportado en una investigación [28] en la cual las ovejas que recibieron dietas con mayores contenidos de taninos presentaron menores concentraciones de urea sanguínea, pudiendo estar relacionado con la disminución de la degradación de proteína consumida producida por efecto de los taninos a nivel ruminal.

En los rumiantes, la urea no es solo un producto final del catabolismo de las proteínas y los aminoácidos, sino también un producto de la detoxificación del amoníaco resultante del direccionamiento de aminoácidos hacia la gluconeogénesis, la cual se encuentra permanentemente activa, aún en estado de buena nutrición, por lo que los animales con alta capacidad de detoxificar grandes cantidades de amoníaco son capaces de generar altos niveles de urea en sangre. Un efecto aditivo se produce cuando los rumiantes reciben suplementación con nitrógeno no proteico, provocando concentraciones de urea sanguínea que pueden ubicarse por encima del rango referencial [31].

Se ha planteado que la administración, en exceso, de proteína, en vacas próximas al servicio, podría alterar el ambiente ruminal, generando un aumento de amoníaco a este nivel, con posterior aumento del nitrógeno ureico sanguíneo una vez realizado el ciclo de la urea en el hígado [37], y en cabras en lactancia, la uremia aumentó en el pico de lactancia posiblemente como consecuencia de un excesivo aporte de proteína en el alimento concentrado, sumado al catabolismo de las proteínas corporales para satisfacer los requerimientos de los animales durante este período [33]. En otro orden de ideas, a diferencia de lo reportado por otros autores [38], en el presente trabajo no se encontró una correlación positiva significativa entre las concentraciones séricas de urea y colesterol.

Aspartato aminotransferasa (AST)

La actividad de la enzima AST fue estadísticamente diferente en el transcurso de las semanas de muestreo ($P<0,0001$) (Figura 11). Los distintos tratamientos no afectaron significativamente los valores de AST ($P=0,0738$) y hubo una correlación significativa ($P=0,0097$) y positiva (0,2423) con los valores de urea.

En el caso de la estadística descriptiva aplicada, se observa que el promedio de casi todas las semanas para todos los tratamientos se alejan de los valores referenciales, que van desde 49,0 hasta 123,3 U/L [26], la semana 5 está por debajo y el resto por encima, solo la semana 7 está dentro del rango con 64,91 U/L.

Tomando en cuenta que en la mayoría de las semanas el valor de AST estuvo más elevado del valor normal en todos los animales, se podría pensar que en todos los grupos hubo un factor común que logró modificar el valor de la AST, que no sería el contenido de *C. ensiformis* en la dieta, pues el grupo T también se mostró afectado a medida que transcurría el ensayo, como se observa en la Figura 11, que expresa el comportamiento de los tres grupos a través de las semanas de muestreo. Además, se observa que no hubo tendencia definida en los valores en el transcurso del tiempo.

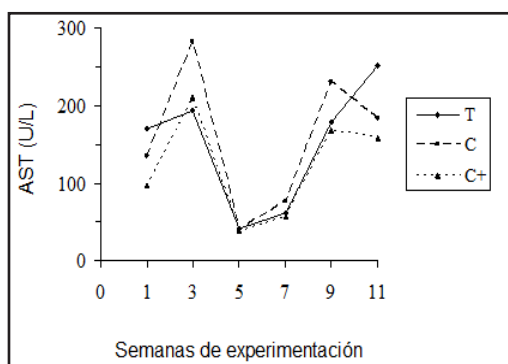


Figura 11. Valores de la actividad de la enzima aspartato aminotransferasa (AST) sérica (promedio \pm DE; U/L) en corderos West African suplementados (C, C+) o no (T) con *C. ensiformis* durante 11 semanas

La AST es considerada la enzima hepática más sensible para expresar lesiones hepatocelulares en grandes especies, también es producida en el intestino y en el músculo estriado tanto esquelético como cardíaco [36], por lo que un aumento de su actividad en el suero sanguíneo puede también indicar degradación muscular, intoxicaciones, hipovitaminosis E y ciertas afecciones intestinales [36]. Se han reportado parámetros referenciales entre 47,63 y 122,13 U/L, en ovejas adultas tropicales semi-estabuladas [30].

Los autores que han asociado la AST con la salud y funcionalidad hepática, consideran que es de esperar que animales que tengan la capacidad de detoxificar grandes cantidades de amoníaco y,

por ende, de generar altos niveles de urea en sangre, tengan una buena funcionalidad hepática y presenten valores más bajos de AST [31]. En nuestros resultados no se reflejó esta afirmación, pues todos los grupos experimentales presentaron elevada, tanto la uremia, como la actividad de la enzima AST sérica, con una correlación positiva y significativa entre sí, sugiriendo que el factor que está modificando estos indicadores metabólicos es común para todos los grupos, descartando así que puedan ser afectados por los suplementos del experimento.

Contrario a los autores anteriormente mencionados, otros investigadores [30] plantean que, además de ser un indicador de daño hepático, altas concentraciones séricas de la enzima AST pueden ser indicativas de excesos de proteína en la dieta y déficit energético, es decir, circunstancias en las cuales existe poca disponibilidad energética para metabolizar el exceso de proteína, provocando un desequilibrio energético-proteico. Esto es apoyado por investigadores [39] que plantean que, en las dietas de los rumiantes con elevado contenido de proteína rápidamente degradable en el rumen, aumenta la producción de amonio ruminal, el cual se absorbe y es metabolizado en el hígado a urea, lo que aumentaría los niveles de urea sérica, como ya se mencionó anteriormente. La síntesis de urea está controlada por enzimas ureogénicas y la AST es una de las enzimas auxiliares en este proceso, por lo que la detoxificación del amoníaco aumenta por el incremento de la actividad enzimática ureogénica, debido al incremento de metabolitos para la síntesis de urea, o ambos y, cabe recordar, que la AST es considerada una enzima de este proceso, por lo que se estima que, si se aumenta la detoxificación de urea, esta enzima aumentaría en sangre como en el caso de nuestros resultados [38-40].

CONCLUSIONES

La suplementación de corderos tropicales en crecimiento, con semillas molidas de *Canavalia ensiformis*, en dosis de 2,5 g/kg PV, no afectó parámetros sanguíneos como la proteína total y no provocó daño hepático, demostrado por la disminución del valor de bilirrubina en el transcurso del tiempo. El suministro de 5 g/kg PV disminuyó el hematocrito y la hemoglobina en animales sin desparasitar.

AGRADECIMIENTOS

Al Laboratorio-Sección de Ovinos, Instituto de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Laboratorio de Patología Clínica, Facultad de Ciencias Veterinarias-UCV. Laboratorio de Nutrición Animal INIA-CENIAP. Cátedra de Parasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, UCV. La presente investigación fue financiada por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV (CDCH, PG 01-7584-2009).

CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores mencionan no tener conflictos de intereses.

APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

LG: Mediciones realizadas con los animales, suplementación, pesajes de animales y alimento y coprológicos semanales. Escritura de la tesis. MR: Análisis de laboratorio de hematología y química sanguínea. AB: Mediciones parasitológicas. OC: Análisis estadísticos. ER de A: Redacción y revisión de los artículos. LR de A: Colaboración diaria a la tesista con las mediciones realizadas durante el experimento, revisión de la tesis y redacción y revisión de los artículos.

REFERENCIAS

- Morales G, Pino L, León E, Rondón Z, Guillén A, Balestrini C, Silva M. Niveles de infección parasitaria en ovinos de reemplazo naturalmente infectados. *Vet Trop.* 2002; 27(2):127-35.
- Quijada J, Bethancourt A, Sulvarán D, Salcedo P, Aguirre A, Vivas I, et al. Estrongilidos digestivos en caprinos: contajes fecales de huevos y valores de la escala FAMACHA en un rebaño infectado naturalmente. *Rev Cient Fac Cien Veter.* 2012; 12(5):418-25.
- Cuéllar J. Control no farmacológico de parásitos en ovinos -Nematodos gastroentéricos. 2007; [en línea]. [acceso 5 de abril de 2016]. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_ovinos/02-cuellar.pdf.
- Mireles E, Valencia M, Gutiérrez I. Parasitosis gastrointestinal natural y la ganancia diaria de peso en corderos lactantes en el trópico seco de Guerrero, México. *Rev Elect Vet.* 2012; 11: 1-9.
- González R, Torres G, Nuncio M, Cuéllar J, Zermeño M. Detección de eficiencia antihelmíntica en nemátodos de ovinos de pelo con la prueba de reducción de huevos en heces. *Livest Res Rural Dev.* 2003; 15(12) [en línea]. [acceso 5 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.lrrd.org/lrrd15/12/gonza1512.htm>.
- Reverón A. *Temas Ovinos y Caprinos*. 3^{era} Edición. Espansade S.R.L Editores. Maracay. Venezuela. 1996. pp. 223-25.
- Morales G, Pino L, León E, Rondón Z, Guillén A, Balestrini C, Silva M. Relación entre los parámetros hematológicos y el nivel de infestación parasitaria en ovinos de reemplazo. *Vet Trop.* 2002; 27(2): 87-98.
- Schalm O, Jain N, Carroll E. *Hematología Veterinaria*. Editorial Hemisferio. Primera Edición. Buenos Aires. Argentina. Capítulo IX. El eritrocito en la enfermedad. 1981; pp. 437- 41 .
- Basabe J, Eiras DF, Romero JR. Nutrition and gastrointestinal parasitism in ruminant production. *Arch Zootecnia.* 2009; 58:131-44.
- Salas B. Identificación de poblaciones de *Haemonchus contortus* resistentes a antihelmínticos por medio de técnicas de biología molecular. *Temas selectos de parasitología.* 2000. 1:181-88; [en línea]. [acceso 7 de abril de 2013]. Disponible en: http://fmvzlinea.fmvz.unam.mx/file.php/60/Material_lectura/Temas_Selectos.pdf.
- Meyer D, Harvey J. Evaluación de anomalías eritrocitarias. Capítulo 3. El laboratorio en medicina veterinaria: interpretación y diagnóstico. En: *El Laboratorio en Medicina Veterinaria. Interpretación y diagnóstico*. Segunda Edición. Editorial Inter-médica. Buenos Aires, Argentina. 2000. pp. 45-88.
- Cuéllar J. Nuevas opciones para el control de parásitos en la ovinocultura tropical. En: *Primer Simposio de Ovinocultura Tropical*. Chiapas. México. 2009. pp 1-21.
- Medina R, Sanchez A. Efecto de la suplementación con follaje de *Leucaena leucocephala* sobre la ganancia de peso de ovinos desparasitados y no desparasitados contra estrongilidos digestivos. *Zootec Trop.* 2006; 24(1):55-68.
- Ríos-de Álvarez L, Jackson F, Greer A, Bartley Y, Bartley D, Grant G, et al. *In vitro* screening of plant lectins and tropical plant extracts for anthelmintic properties. *Vet Parasitol.* 2011; 186(3): 390-398.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, (INIA). *Históricos de datos climatológicos. Reporte de Estación Agroclimática CENIAP* [Revista en línea] 2012; [acceso 16 de octubre de 2013]. Disponible en: http://estaciones.inameh.gob.ve/estaciones/estaciones_home.

- php.
16. National Research Council (NRC). Nutrient Requirements of Small Ruminant. Sheep, Goats, Cervids and new world camelids. The National Academies Press. Washington, DC. 2007. 256 p.
 17. Hansen J, Perry, B. Packed cell volume determination (PCV, Haematocrit). Capítulo 5. Supplementary diagnosis procedure. En: The Epidemiology, Diagnosis and Control of Helminth Parasites of ruminants. International Laboratory for Research on Animal Diseases, Nairobi, Kenya. 1994: 171 p.
 18. Coles, E. Erythrocytes. Capítulo 4. En: Veterinary Clinical Pathology. Segunda edición. W. B. Saunders Company Philadelphia. Estados Unidos. 1974. pp. 99- 141.
 19. Statistix. Analytical Software. Version 8.0. Copyright. 2003.
 20. Chacín F. Diseño y Análisis de Experimentos I. (1^{era} ed.). Impreso en los talleres FEPUVA- Universidad Central de Venezuela. Caracas. 2000. pp. 150-52.
 21. Medway W, Prier J, Wilkinson J. Patología clínica veterinaria. Primera Edición en español. Editorial Hispano Americana. México. 1973. pp. 208-51.
 22. Ramírez L, Torres D, León P, Azuaje K, Sánchez F, Díaz A. Observaciones hematológicas en rumiantes tropicales. Rev Cient Fac Cien Veter. 1998; 3(2): 105-12.
 23. Couto A. Caracterización genética y perfil hematológico y bioquímico de la raza "criolla lanada serrana" del Panalto Serrano Catarinense-Santa Catarina, Brasil. Tesis presentada como requisito para optar por el título de Doctor en Veterinaria. Facultad de Veterinaria. Universidad de León. 2010; [en línea]. [acceso 1 de abril de 2016]. Disponible en: <https://buleria.unileon.es/bitstream/handle/10612/827/2009COUTO%20HACK%2c%20KARINA.pdf?sequence=1>.
 24. Balic A, Cunningham C, Meeusen N. Eosinophil interactions with *Haemonchus contortus* larvae in the ovine gastrointestinal tract. Parasite Immunol. 2006; 28:107-15.
 25. Sandoval E. Evaluación del comportamiento leucocitario en ovejas a pastoreo como un criterio para determinar la susceptibilidad a la infección con estróngilos digestivos. Rev Elect Vet. 2007; 8(9):1-7.
 26. Fraser C, Mays A, Amstutz, H, Archibald J, Armour J, Blood D, et al. Valores y Procedimientos clínicos. Parte III. En: El Manual Merck de Veterinaria. Tercera Edición en español. Merck y Co., INC. Madrid, España. 1988. pp. 1011-55.
 27. Holmes P. Interactions between parasites and animal nutrition: the veterinary consequences. P Nut Soc. 1993; 52: 113-20.
 28. Hervás G. Los taninos condensados de quebracho en la nutrición de ovejas. Efecto sobre la fermentación en el rumen y la digestibilidad, toxicidad y utilización como protectores frente a la degradación ruminal. Tesis presentada para optar al título de Doctor. Departamento de Producción animal. Universidad de León. 2001; [en línea]. [acceso 5 de abril de 2016]. Disponible en: [http://digital.csic.es/bitstream/10261/5114/1/Herv%C3%A1s_2001%20\(Tesis%20doctoral\).pdf](http://digital.csic.es/bitstream/10261/5114/1/Herv%C3%A1s_2001%20(Tesis%20doctoral).pdf).
 29. Valdéz E. Estudio observacional de las parasitosis gastrointestinales en ovinos y caprinos del Municipio Tiquicheo, Michoacán. Trabajo de grado presentado para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 2006; [en línea]. [acceso 5 de junio de 2013]. Disponible en <http://www.vetzoo.umich.mx/phocadownload/Tesis/2006/Octubre/estudio%20observacional%20de%20las%20parasitosis%20gastrointestinales%20en%20ovinos%20y%20caprinos%20del%20municipio%20de%20tiquicheo,%20michoacan.pdf>.
 30. Aguilar E. Variaciones en la enzima AST y colesterol en hembras ovinas de tres sistemas de producción de ganadería tropical. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Veracruzana. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Veracruz. México. 26p. 2012; [en línea]. [acceso 5 de abril de 2016]. Disponible en: <http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/30152/3/AguilarHdz.pdf>
 31. Galvis R, Correa H, Ramírez N. Interacciones entre el balance nutricional, los indicadores del metabolismo energético y proteico y las concentraciones plasmáticas de Insulina e IGF-1 en vacas en lactancia temprana. Rev Colomb Cienc Pec. 2003; 16(3):237-48.
 32. León E, Olmos M, Rodríguez A, Fonseca Y, Labrada A. Variación del crecimiento e indicadores hematoquímicos en reproductoras Pelibuey cubana suplementadas con Leucaena durante el período de cubriciones. Pastos y Forrajes. 2003; 26 (1): 61-5.
 33. Bücher D. 1998. Caracterización del balance metabólico energético y proteico en el período de ordeño de ovejas Latxa Cara Rubia a pastoreo. Tesis de Grado presentada como parte de los requisitos para optar al Grado de Licenciado en Medicina Veterinaria. Facultad de Ciencias Veterinarias. Instituto de Zootecnia. Universidad Austral de Chile. [en línea] [acceso 5 de abril de 2016]. Disponible en: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/1998/fvb919c/sources/fvb919c.pdf>.
 34. León J. Perfil metabólico e inicio de la actividad ovárica post-parto en vacas doble propósito. Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de Magister Scientiarum en Reproducción Animal y Tecnología

- de la Inseminación Artificial. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Ciencias Veterinarias. Postgrado en Reproducción Animal y Tecnología de la Inseminación Artificial. 2012; [en línea]. [acceso 5 de abril de 2016]. Disponible en: http://saber.ucv.ve:8080/jspui/bitstream/123456789/3293/1/T026800002637-0-Tesis_Final_Jhonny_Leon-000.pdf.
35. León E, Rodríguez A, Olmos M, Fonseca Y, Labrada A. Inclusión de follaje fresco de leucaena y miel-urea en dietas de ovejas reproductoras Pelibuey Cubana lactantes explotadas en pastos naturalizados. *Zoot Trop.* 2008; 26(3):367-70.
36. Coppo N, Coppo J, Revidatti M, Capellari A, Navamuel J, Fioranelli S. Influencia de la suplementación con pulpa de citrus sobre parámetros indicadores de efectos indeseables en vaquillonas de cría. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen V-007.* 2003 [en línea]. [acceso 4 de abril de 2016]. Disponible en: <http://www.revistacyt.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/2003/comunicaciones/04-Veterinarias/V-007.pdf>.
37. Ortiz W, Pacheco A, Quirino R. Evaluación del nitrógeno ureico sanguíneo y pH uterino en vacas suplementadas con pollinaza como fuente proteica. *Revista Electrónica Veterinaria.* 2013;14(6). [en línea]. [acceso 12 de junio de 2013]. Disponible en: <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n060613/061303.pdf>.
38. Noro M, Scandolo D, Wittwer F. Respuesta metabólica en ovinos suplementados con alto contenido de nitrógeno no proteínico en la dieta. *Zoot Trop.* 2012; 30(3):225-35.
39. Noro M, Wittwer F. Interrelaciones entre ureagénesis y gluconeogénesis hepática en rumiantes alimentados con elevado contenido de nitrógeno. *Vet México.* 2012;43(2): 143- 54.
40. Chalupa W, Clark J, Opliger P, Lavker R. Detoxication of ammonia in sheep fed soy protein or urea. *J Nutr.* 1970; 100: 170-76.