



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Efecto de las fracciones obtenidas a partir del extracto etanólico de *Artemisia cina* en jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados con *Haemonchus contortus*.

T e s i s

**Que para obtener el título de:
Médico Veterinario Zootecnista**

P r e s e n t a :

José Antonio González Torres



**Asesor: Mtro. Jorge Alfredo Cuéllar Ordaz
Coasesor: M en C Rosa Isabel Higuera Piedrahita**

**Cuautitlán Izcalli, Estado de México
2019**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 mis padres por darme la oportunidad de recibir una educación y formación cívica basada en el respeto hacia mis semejantes. Además de su apoyo incondicional tanto física, psicológica y económicamente.

A mis hermanos por ser también un gran apoyo desde pequeños y hasta la fecha y dios quiera seguiremos como siempre apoyándonos entre nosotros sin importar lo que venga por delante.

A Brenda Jiménez, compañera, amiga, novia y la persona que me ha acompañado en estos últimos años, dándome aliento y motivos para poder superarme día con día.

A mis amigos Gustavo Montiel, Jesús Castro y Antonio Luna por ser una pieza importante en mi carrera universitaria, pues me han sabido apoyar y guiar de una forma única de ellos, ya sea en el aspecto académico o personal.

A los maestros Jorge Alfredo Cuellar, Rosa Higuera y Héctor de la Cruz por su gran apoyo en la realización de éste trabajo, las largas horas de atención que me dedicaron y su buen trato.

A la FES Cuautitlán por ser mi casa de estudios y darme la oportunidad de formarme como profesionista.

A la UNAM por que le debo muchísimo, me ha formado como una persona de bien, me ha dado una carrera, amigos, me ha hecho fortalecer los lazos con mi familia, me ha dado más familia, un trabajo, experiencias inolvidables y una vida para que me siga desarrollando. Orgullosamente UNAM.

AGRADECIMIENTOS.

- A mis padres
- A mis hermanos
- A la MVZ Brenda Guadalupe Jiménez Herrera
- A la M. en C. Rosa Isabel Higuera Piedrahita
- Al M. en C. Héctor Alejandro de la Cruz Cruz
- Al M. en C. Jorge Alfredo Cullar Ordáz
- A mis sinodales
- A la Doctora María Eugenia López Arellano
- Al Doctor Pedro Mendoza de Gives
- A la Doctora Liliana Aguilar Marcelino
- A la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán campo 4
- Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias.
- Al Instituto Nacional de Salud Pública
- Al proyecto PAPIIT: Efecto Antihelmíntico y toxicidad celular de *Artemisia cina*, semilla de papaya (*Carica papaya*) y taninos condensados sobre *Haemonchus contortus*, por solventar los gastos generados de la investigación científica.

Índice.

Introducción.....	6
Ciclo biológico de <i>Haemonchus contortus</i>	7
Patogenia de la hemoncosis.....	8
Resistencia antihelmíntica.....	9
Herbolaria.....	11
Plantas de la familia de Asteraceae.....	14
Objetivo.....	18
Hipótesis.....	18
Material y métodos.....	19
Localización.....	19
Animales.....	19
Diseño experimental.....	20
Inmunosupresión de los jerbos.....	20
Larvas infectantes de <i>Haemonchus contortus</i>	21
Infección experimental de los jerbos <i>Haemonchus contortus</i>	21
Tratamiento de los jerbos.....	22
Sacrificio de los jerbos.....	23
Recuperación de L ₄ de <i>Haemonchus contortus</i>	23
Análisis de resultados.....	24
Bibliografía.....	31

Índice de figuras.

Figura 1. <i>Artemisia cina</i>	15
Figura 2. Jerbo (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	16
Figura 3. Alojamiento de los jerbos.....	19
Figura 4. Inmunosupresión del jerbo.....	21
Figura 5. Técnica de Corticelli Lai.....	21
Figura 6. Infección con L ₃ desenvainadas de <i>Haemonchus contortus</i>	22
Figura 7. Tratamiento con extracto hexánico de <i>Artemisia cina</i>	22
Figura 8. Desnucamiento cervical de jerbo.....	23
Figura 9. Recuperación y observación de L ₄ de <i>Haemonchus contortus</i>	24
Figura 10. Cantidad promedio de larvas de cuarto estadio de <i>Haemonchus contortus</i> encontradas en estómago de jerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>) postratamiento.....	25

Índice de cuadros.

Cuadro 1. Comparación de herbolaria y productos farmacéuticos.	13
Cuadro 2. Características biológicas y fisiológicas de los jerbos	17
Cuadro 3. Diseño experimental utilizado en lo jerbos (<i>Meriones unguiculatus</i>).....	20
Cuadro 4. Porcentaje de reducción de L4 <i>Haemonchus contortus</i> en jerbos tratados con fracciones de <i>Artemisia cina</i> e ivermectina.....	26

Resumen.

El parásito *Haemonchus contortus* es el principal nematodo en las infecciones gastrointestinales en clima tropical y subtropical, tiene una alta prevalencia y virulencia en ovinos y caprinos. Sin embargo, hay muchos informes sobre la resistencia de parásitos a los medicamentos antihelmínticos, representando un gran problema económico para la ovinocultura y se crea la necesidad de nuevas estrategias para su control. El uso de las plantas medicinales con efecto antihelmíntico surge como un campo de estudio. El objetivo del trabajo fue evaluar el efecto antihelmíntico de la fracción hexánica, acetato de etilo y metanólica obtenida a partir del extracto etanólico de *Artemisia cina* en jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*. Se utilizaron jerbos de 21 días de edad, se inmunosuprimieron con dexametasona a una dosis de 0.5mg/kg de peso vivo y se infectaron con aproximadamente 10,000 larvas tres (L₃) de *H. contortus* desenvainadas, posteriormente se trataron cuatro de los cinco grupos con lo siguiente: fracción hexánica de *A. cina* 4mg/kg PV (grupo 1); fracción de metanólica de *A. cina* 4mg/kg PV; fracción de acetato de

etilo de *A. cina* 4mg/kg PV (grupo 3); ivermectina al 1% (control positivo) 0.02mg/kg PV (grupo 4); el quinto grupo actuó como grupo testigo el cuál no se trató. Los resultados obtenidos permitieron establecer el porcentaje de asociación al tejido y reducción de larva cuatro (L₄) encontradas en el estómago del jerbo. El porcentaje de reducción del grupo tratado con la fracción hexánica y el grupo tratado con ivermectina tuvo 95.4% y 99.2% respectivamente comparado con el control negativo, observando que entre el grupo tratado con la fracción hexánica y el control negativo tuvo una diferencia significativa ($p < 0.05$) y con el grupo tratado con ivermectina no existe diferencia significativa ($p > 0.05$) lo que indica que la fracción hexánica tiene un efecto nematocida comparándola con un antihelmíntico de referencia, con respecto a las fracciones de metanol y acetato de etilo no tuvieron reducción lo cual no tuvo diferencia significativa ($p > 0.05$) con el grupo testigo. Se concluye que la fracción hexánica de *A. cina* tiene efecto antihelmíntico, sin embargo, se hace necesario realizar más estudios y determinar la molécula o moléculas activas responsables de la actividad.

Introducción.

Las infecciones causadas por nematodos gastrointestinales tienen un impacto significativo en la producción de ovinos y caprinos; considerada una enfermedad multi-etiológica ocasionada por la acción conjunta de varios géneros y especies de parásitos, que comparten los bovinos, ovino y caprinos, debido a ello se considera un complejo parasitario causante de un síndrome de mala absorción y digestión. Entre los agentes etiológicos, *Haemonchus contortus* (o gusano en forma de “palo de barbería”), causante de la hemoncosis, es considerado el principal nematodo involucrado en las parasitosis gastrointestinales, principalmente en animales criados en clima tropical y subtropical, donde su prevalencia es elevada y causa efectos negativos sobre la producción y salud (Muñoz y col., 2015; Grandó y col., 2016), por mucho, es el parásito más virulento de los pequeños rumiantes; por sus hábitos hematófagos (Cuéllar, 2009), se considera el nematodo gastroentérico más importante de los ovinos en México y otras regiones del mundo (Muñoz y col., 2015; Goncalves, 2017).

Ciclo biológico de *Haemonchus contortus*.

El ciclo biológico de *H. contortus* es directo, se divide en una fase exógena y otra endógena; en la fase exógena, los huevos son excretados por las heces y después de un par de días, se forma y eclosiona la larva 1 (L₁) que muda a larva 2 (L₂), ambas permanecen en las heces, alimentándose de la materia orgánica y microorganismos presentes en las mismas. La L₂ muda para dar lugar el estadio infectante, la larva 3 (L₃), conservando la cutícula del estadio anterior que cubre completamente la larva en modo de vaina, aislándola del medio externo (Soulsby, 1988).

Después de que se han desarrollado las L₃ migra de manera vertical sobre las superficies húmedas de los pastos, presenta hidrotropismo y termotropismo positivo, fototropismo y geotropismo negativo, lo que la lleva a buscar la parte alta de los pastos cuando están húmedos y poco expuestos a luz solar (Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2012). El tiempo de la salida del huevo al exterior y la aparición de larvas infectantes puede ser de cinco a seis días, aunque el desarrollo puede retrasarse incluso varios meses si las condiciones de humedad y temperatura no son óptimas (Hernández, 2011). La mayoría de los casos se presentan al final de la primavera, en el verano y principios de otoño cuando las condiciones del medio permiten el desarrollo y persistencia de L₃. La humedad ambiental es esencial para el desarrollo y supervivencia de las larvas, la frecuencia y severidad de los brotes de la enfermedad están muy ligadas a las lluvias. En las áreas templadas, las larvas infectantes que se desarrollan de los huevos expulsados en las heces de los animales infectados en la primavera son ingeridas por las ovejas y los corderos al inicio del verano. La mayoría de ellas detienen su desarrollo (hipobiosis) en el abomaso como larvas 4 (L₄) y continua hasta la primavera siguiente (Taylor y col., 2007; González-Garduño y col., 2011).

Con la ingestión de las L₃ con el pasto inicia la fase endógena, es el ciclo parasitario; en el rumen se liberan de la vaina que las envuelve, posteriormente, en el abomaso, se introducen en las glándulas epiteliales de la mucosa para

continuar su desarrollo. Las L₄ aparecen en la superficie de la mucosa entre los cuatro y cinco días después de la ingestión de las L₃, tras una nueva muda se transforman en larva 5 (L₅) o preadulto, que maduran sexualmente dando lugar a los adultos que copulan y empiezan a producir huevos (Quiroz, 2012). El periodo de prepatencia oscila entre 15 y 21 días, a menos que se presente el fenómeno de hipobiosis (Hernández, 2011).

Un fenómeno observado en las ovejas durante la gestación, parto y lactación, que contribuyen en una alta contaminación de las praderas, es un aumento en la eliminación de huevos, denominado *incremento periparto* o *alza posparto* (Dunn, 2011), su importancia radica en una mayor exposición al rebaño, siendo los corderos quienes tienen mayor riesgo a contraer la infección, pues coincide con el inicio del consumo de pasto, esto es, poco antes del destete. El problema se agrava en los corderos que nacen al final de la época de partos, ya que se enfrentan a una pradera muy contaminada (Farías y col., 1998).

Puede presentarse otro fenómeno llamado *autocuración*, caracterizado una reducción en la excreción de huevos en las heces por la expulsión de la mayor parte de las poblaciones de vermes adultos, especialmente ocurre en áreas donde la hemoncosis es endémica y después de un periodo de fuertes lluvias (Sánchez, 2001).

Patogenia de la hemoncosis.

La principal característica de la hemoncosis es la anemia, tanto los adultos como las L₄ son hematófagos, además producen lesiones hemorrágicas en el abomaso (Martínez y col., 1987; Soca y col., 2005). Por cada verme se pierden 0.05 ml de sangre al día, tanto por lo que ingiere el parásito, como por lo que pierde la herida al sangrar, por lo que un animal con 5,000 adultos de *H. contortus* puede perder alrededor de 250 ml de sangre al día (Sánchez, 2001). Además se generan alteraciones digestivas, del desarrollo y disminución en la producción, la intensidad de la parasitosis varía con la edad de los animales y el sistema de producción (Quiroz, 2012).

Se ha demostrado que la anemia se produce en tres fases. La primera entre los 7 y 25 días posinfección. El volumen del paquete celular (VPC) de ovinos infectados desciende rápidamente de 33% al 22%, esta rápida caída se debe al periodo que transcurre entre la pérdida de sangre y la activación del sistema eritropoyético del hospedador para compensar la pérdida de sangre. En la segunda fase de la anemia que dura de 6 a 14 semanas, el VPC se mantiene estable, aunque más bajo de lo normal, se compensa con el incremento de la producción de eritrocitos. En la última fase, hay una rápida pérdida de VPC como resultado de la dishematopoyesis por la deficiencia férrica, los animales infectados pierden gran cantidad de proteínas séricas. Como consecuencia, la tasa catabólica fraccional de la albúmina se incrementa notoriamente, sin embargo, la concentración de albúmina sérica puede permanecer en su nivel normal durante varias semanas, puede estar asociado con un notable incremento de la síntesis albuminoidea que se produce hasta que las reservas metabólicas del animal se agotan (Martínez y col., 1987; Rojas-Hernández y col., 2007).

La hemoncosis genera pérdidas significativas en la producción ovina en todo el mundo, sus signos clínicos varían de acuerdo a la carga parasitaria, por lo general se presentan signos de anemia, con palidez de mucosas y debilidad, por la hipoproteinemia, edema submandibular y ascitis. Hay pobre estado de carnes, diarreas intermitentes y puede presentarse la muerte (Zárate-Rendón y col., 2017). En la necropsia se pueden llegar a encontrar vermes en la mucosa del abomaso que causan numerosas y pequeñas lesiones hemorrágicas. El contenido abomasal es de color pardo oscuro debido a la presencia de sangre digerida (Meana y Rojo, 1999; Taylor y col., 2007).

Resistencia antihelmíntica.

Con la finalidad de contrarrestar los efectos negativos de la hemoncosis, se han utilizado los antihelmínticos de manera para lograr un buen estado de salud de los animales, pero desafortunadamente por su uso excesivo y continuo, la aplicación

de dosis menores a las terapéuticamente recomendada de uno o más antihelmínticos, aunado a los tratamientos cuando los parásitos tienen refugios pequeños (sobrepastoreo) se ha desarrollado resistencia hacia esos productos. La resistencia es un fenómeno cosmopolita que disminuye gradualmente el efecto antihelmíntico sobre los parásitos de todas las especies (Jabbar y col., 2016). Además, es una capacidad heredable de los parásitos para sobrevivir a tratamientos que, a dosis terapéuticas, normalmente causan inhibición del crecimiento o la muerte de los individuos de una población normal o susceptible (Martínez, 2010).

Actualmente se encuentra en expansión un fenómeno de multiresistencia que consiste en que todas las familias de antiparasitarios disponibles en el mercado han perdido la eficacia ante varios géneros de NGI (Medina y col., 2014).

La resistencia a los antihelmínticos (RA) es un problema que tiene una gran repercusión económica, trayendo como consecuencia bajas utilidades al productor y favoreciendo el desaliento y abandono de la actividad pecuaria (Kaplan, 2004; Molento, 2009). En muchos lugares del mundo se han reportado casos de cepas de NGE con RA, siendo actualmente un problema frecuente y grave en el continente americano (Torres y col., 2012). En México se han desarrollado investigaciones aisladas para detectar el problema de RA, principalmente en los estados de la costa del Golfo de México, siendo escasas en el altiplano mexicano. Los estudios llevados a cabo en ecosistemas cálidos y húmedos han demostrado una alta frecuencia de rebaños con RA (Nuncio-Ochoa y col., 2005; Torres y col., 2007; Torres y col., 2013; Medina y col., 2014).

Para poder llevar a cabo medidas adecuadas de control de la RA se requiere de un diagnóstico para determinar su presencia o ausencia, esto se dificulta ante la falta de infraestructura necesaria para corroborar en el laboratorio los problemas sanitarios ocurridos a nivel de campo. Además, por parte del productor hay ausencia de comprensión o interés en el conocimiento del problema de la RA,

aunado al escaso apoyo para la investigación del problema de RA en salud animal, situación que se ha venido agravando en los últimos años y que cierra el círculo de la falta de opciones para disminuir la dependencia de fármacos (Besier, 1997; Torres y col., 2008).

Se ha acuñado el término Control Integrado de Parásitos (CIP), particularmente cuando existe RA y se pretende controlar. Para el CIP se requiere de componentes importantes, como la disponibilidad de técnicas para el diagnóstico de RA, una verificación de la calidad de los antihelmínticos, el conocimiento de la epidemiología parasitaria local y el cambio en la mentalidad al utilizar métodos menos dependientes de los antihelmínticos. Entre algunas de las opciones de control de nematodos en ovinos están el manejo del pastoreo, el uso de hongos con actividad nematófaga, la inmunización con vacunas, la herbolaria, administración de partículas de cobre, desparasitación selectiva y el uso de plantas con actividad antihelmíntica (Cuéllar, 2016).

Herbolaria.

Las plantas medicinales se han utilizado durante cientos de años contra los trastornos gastrointestinales, incluidas varias parasitosis, en todo el mundo, la mayoría de estos son utilizados de forma empírica. Varias plantas incluida la flora mexicana, posee un enorme potencial contra muchas enfermedades tanto en humanos como en animales (Gabino y col., 2009).

Se conoce como herbolaria a la práctica terapéutica que utiliza plantas medicinales muy accesibles a grandes núcleos de la población mexicana. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce el valor de esta práctica terapéutica y le otorga gran importancia en los esquemas o sistemas públicos para la salud (Huerta, 1997). Aproximadamente una cuarta parte de los medicamentos de origen vegetal son que se encuentran en el mercado (Mendoza y col., 2002).

El uso de plantas con fines terapéuticos es una práctica que se remonta al origen de la humanidad; está basada en la experiencia, forma parte de la tradición de los pueblos y generalmente se transmiten en forma oral, así, el uso de las plantas es una costumbre que se ha ido transmitiendo de generación en generación y la medicina empírica que se inicia con la mezcla de la cultura indígena y de los conquistadores, continúa siendo una práctica común en la actualidad (Basualdo y col., 1996).

En el siglo XIX en Sudamérica, debido a la falta de prevención zoonosaria ocasionada por la limitada atención científica, las enfermedades aisladas, más aún las epizootias y enzootias, resultaban catastróficas; no habiendo mucho que hacer para salvar los rebaños si estas se presentaban. En los hatos, haciendas o durante los arcos de traslado, los animales enfermos, tanto equinos como bovinos, comúnmente eran sacrificados aprovechándose solamente su cuero debido al temor de consumir carne de un animal afectado (Trujillo, 2013).

Bajo este ambiente de limitaciones, el uso de las purgas, unturas, emplastes y cataplasmas vegetales en su mayoría, fueron prácticas comunes en el ambiente ganadero, muchas de esas prácticas siguen siendo usadas en zonas rurales y remotas (Trujillo, 2013).

Huerta (1997) afirma que tanto la herbolaria como la medicina alopática son prácticas terapéuticas que coexisten en grandes núcleos de población, su aplicación oportuna y equilibrada puede ayudar a curar un grupo de enfermedades frecuentes (cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de herbolaria y productos farmacéuticos.

Medicina tradicional (herbolaria)	Medicina alopática (fármacos)
La administración oportuna y cuidadosa de la mayoría de las plantas no ocasiona efectos colaterales o secundarios.	La administración es segura, ya que está dosificada, pero con frecuencia provoca efectos secundarios.
Atiende al enfermo como un todo y no a la enfermedad.	Atiende la enfermedad.
Su costo es mínimo, accesible a la mayor parte de la población.	No siempre es accesible
Se basa en tradiciones orales.	Está fundamentada científicamente.
Se puede utilizar como atención primaria de la salud a bajo costo.	Se incorpora a la atención primaria a mayores costos.

Modificado de Huerta (1997).

En este sentido, para la clasificación y uso de las plantas, se deben considerar la opinión popular y los datos reportados de los componentes de las plantas estudiadas, para tal efecto, se han propuesto cuatro niveles (Schillhorn Van Veen, 1997; Mathias, 2004; Higuera, 2015):

1. Nivel mínimo: No existe información de la planta a estudiar.
2. Bajo nivel: No existe información de la planta como tal, sino de las plantas de la misma familia, puede validarla el hecho de que se use en otros ramos.
3. De nivel medio: Además de los datos etnobotánicos, hay información fitoquímica o farmacológica o farmacológica y de su eficacia.
4. De alto nivel: Si la etnobotánica y datos farmacológicos son consistentes con el uso popular de planta, su uso se clasifica en el nivel más alto de validez y es considerado eficaz.

La NOM-072-SSA-2012, *Etiquetado de medicamento y de remedios herbolarios*, define como medicamento herbolario, a los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de la planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica

y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional e internacional.

En el control de parásitos se han utilizado diversas plantas que contienen sustancias bioquímicas con efecto antihelmíntico. Los principales compuestos de estas plantas son los terpenos, los alcaloides, las saponinas, las antraquinonas, los flavonoides y los taninos; estos han sido usados por las comunidades indígenas de Latinoamérica en la herbolaria tradicional, como una práctica milenaria, actualmente se evalúan en estudios a nivel mundial con un concepto etnobotánico (Alonso y col., 2009; Hernández-Carlos y Gamboa-Angulo, 2019).

Plantas de la familia de Asteraceae.

Entre las plantas de la familia Asteraceae se encuentra las del género *Artemisia*, son una rica fuente de lactonas sesquiterpenoicas bioactivas y tienen una larga historia de control de parásitos en humanos y más recientemente, en animales. La *A. annua*, única fuente comercial de artemisininas, se ha utilizado durante siglos en China para tratar el paludismo y otras enfermedades como un té tradicional, los derivados semisintéticos, arteméter y artesunato son el tratamiento de primera línea contra la malaria (Ferreira, 2009).

Algunas especies del género *Artemisia* spp. son tradicionalmente usadas como vermífugos y algunos de sus extractos y componentes como agentes nematocidas de plantas y animales (Navarro y col., 2017). *A. absinthium* (ajenjo) se ha utilizado en medicina popular como antihelmíntico, pero solo recientemente ha surgido como un antihelmíntico para uso veterinario. La excreción de huevos en las heces se redujo significativamente en ovejas infectadas con *H. contortus* y tratadas con 1.0 ó 2.0 g de polvo de hoja o extracto crudo/kg de peso corporal (Tariq y col., 2008).

La artemisinina comercial (conocida por los chinos como *qinghaosu*) es un sesquiterpenoide, componente del peróxido de lactona y flavonoides que también

podría tener actividad antihelmíntica con bajo riesgo de toxicidad en los mamíferos (Squires y col., 2010). Es un componente antimalárico y actualmente es de gran interés para la industria farmacéutica (Kong y Tan, 2015).

La *A. cina* es un arbusto resistente, perene y florece en otoño, crece en climas templados del norte y hemisferio sur, generalmente en árido o semiárido (fig. 1). Es un arbusto de hoja caduca, sus flores desarrollan típicamente en ocho a diez pétalos y es polinizada por el viento (Saxena, 2015).



Figura 1. *Artemisia cina*

Fuente: https://es.wikipedia.org/wiki/Artemisia_cina#/media/File:Artemisia_cina_-_K%C3%B6hler%E2%80%93s_Medizinal-Pflanzen-165.jpg

Jerbo (*Meriones unguiculatus*).

El jerbo de Mongolia (*Meriones unguiculatus*) (fig. 2), es considerado un buen modelo para el estudio de *H. contortus* porque los parásitos se establecen en un sitio anatómico similar a su sitio de predilección, el abomaso de los corderos (Conder y col., 1992, Grandó y col., 2016). El jerbo es un modelo económico, fácil y adecuado de estudios *in vivo* para evaluar compuestos para la eficacia o resistencia antihelmíntica; su uso permite la preselección de extractos con posibilidades terapéuticas en medicina veterinaria y la evaluación de su eventual actividad antihelmíntica (Ostlind y col., 2006, citado en Gabino, 2009).



Figura 2. Jerbo (*Meriones unguiculatus*)

El jerbo es originario de China y Mongolia, su domesticación se inició con fines de investigación debido a su alta eficiencia para sobrevivir bajo restricción hídrica, característica fisiológica que ha despertado el interés en la comunidad científica. Como resultado de esta adaptación, la cantidad de orina producida es mínima y un jerbo puede excretar un par de gotas al día. Sus camadas tienen un máximo de seis crías, la mortalidad de las crías es baja y las enfermedades propias de los jerbos son escasas, lo que significa una ventaja comparativa respecto a otros animales. Son curiosos y pacíficos, rara vez muerden, sin embargo, para manipularlos hay que extremar precauciones porque son muy temerosos e incluso se ha descrito el síndrome de *Postración temblorosa*, generado por cualquier estrés, donde se inmovilizan completamente al intentar tomarlos, pero se recuperan rápidamente (Raggi, 1999).

Algunas características biológicas y fisiológicas de los jerbos se resumen en el cuadro 2:

Cuadro 2. Características biológicas y fisiológicas de los jerbos (*Meriones unguiculatus*).

Peso corporal adulto (g)	
Machos	80 - 100
Hembras	70 - 135
Edad a la pubertad (días)	
Machos	70 - 85
Hembras	65 - 85
Aspectos reproductivos	
Madurez sexual (semanas)	12
Duración de gestación (días)	24 – 26
Duración de lactancia (días)	21- 22
Aspectos fisiológicos	
Temperatura rectal (° C)	38.1- 38.4
Frecuencia cardiaca (latidos/ min)	200 - 360
Frecuencia respiratoria (movimientos/min)	60 – 140

Modificado de Raggi (1999).

Gressler y col. (2018) citando a diferentes autores, menciona que se han realizado estudios con jerbos, demostrando ser muy prometedor con respecto a la reversión de la resistencia, evaluaciones antihelmínticas e investigaciones de nuevos compuestos antiparasitarios. Por otro lado, se ha demostrado que son susceptibles a infecciones causadas por nematodos, incluyendo al *H. contortus* (Conder y col., 1991).

Los jerbos destetados a una edad de aproximadamente cinco semanas, parecen ser una opción aceptable para su uso como modelo experimental, mostraron un buen desarrollo corporal, además a esa edad es susceptible a la inmunosupresión y/o infección (Gressler y col., 2018)

Objetivo.

Evaluar la actividad nematicida de las fracciones hexánica, acetato de etilo y metanólica a partir del extracto etanólico de *Artemisia cina* en jerbos (*Meriones unguiculatus*) infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

Hipótesis.

Existe efecto nematicida de las fracciones hexánica, acetato de etilo y metanólica a partir del extracto etanólico de *Artemisia cina* en jerbos infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

Material y métodos.

Localización.

El trabajo se realizó en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Unidad e Investigación Multidisciplinaria (UIM) y el Laboratorio 3 de la UIM en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la UNAM, en las instalaciones del Laboratorio de Helmintos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y en el bioterio del Instituto Nacional de Salud Pública, Cuernavaca Morelos.

Animales.

Se utilizaron 25 jerbos de 25 días de edad con un peso promedio de 50 g, provenían del bioterio convencional tipo 3 del Instituto Nacional de Salud Pública, que posee condiciones controladas de temperatura (entre 20 y 22° C), humedad (40 a 60%) y luz (12 por 12 horas con 290 lux); tenían acceso a agua 100% potable; cama mixta molida y estéril de madera con olote; ventilación forzada con 15 cambios por hora; el agua y el alimento (*Lab Diet*®) se ofrecían *ad libitum*, fueron desparasitados con fenbendazol (3 mg/kg) antes de la infección (fig. 3).



Figura 3. Alojamiento de los jerbos.

Diseño experimental.

Los 25 jerbos fueron ubicados aleatoriamente en cinco grupos con cinco animales cada uno.

Previo al tratamiento todos los animales fueron inmunosuprimidos durante tres días con dexametasona, después de un día de descanso se infectaron con 10,000 L₃ desenvainadas de *H. contortus*, al día siguiente recibieron (cuadro 3):

Cuadro 3. Diseño experimental utilizado en lo jerbos (*Meriones unguiculatus*)

Grupo	Dosis	Tratamiento
1	4 mg/kg	Fracción hexánica de <i>A. cina</i>
2	4 mg/kg	Fracción metanólica de <i>A. cina</i>
3	4 mg/kg	Fracción acetato de etilo de <i>A. cina</i>
4	0.02 mg/kg	Ivermectina
5	—	—

Los animales del grupo 4 fueron considerados como control al emplear un antiparasitario con reconocida eficacia contra *H. contortus*; los del grupo 5 no recibieron tratamiento, fue el grupo testigo.

Dos días postratamiento, todos los animales de los cinco grupos fueron sacrificados para la obtención de las larvas de cuarto estadio (L₄) de *H. contortus*.

Inmunosupresión de los jerbos.

Para la inmunosupresión se empleó, con algunas modificaciones, lo recomendado por Grandó y col. (2016). Se administró dexametasona a una dosis de 0.5 mg/kg durante tres días, la aplicación se realizó por inyección subcutánea en la región de la cruz, dando un masaje posterior en la zona (fig. 4).



Figura 4. Inmunosupresión del jerbo.

Larvas infectantes de *Haemonchus contortus*.

Los huevos de *H. contortus* se obtuvieron de un cordero donador infectado experimentalmente con 5,000 L₃ (cepa INIFAP). Las larvas infectantes se colectaron por medio de la técnica de Corticelli Lai (Niec, 1968) (fig. 5).



Figura 5. Técnica de Corticelli Lai.

Infección experimental de los jerbos *Haemonchus contortus*.

Se utilizaron 10,000 L₃ desenvainadas de *H. contortus* por jerbo. El proceso de desenvainamiento se efectuó de acuerdo a la metodología modificada de Niec (1968), las larvas se expusieron a una solución de cloro al 0.183%, después se

hicieron tres lavados continuos con agua destilada, se aforó a un volumen de 20 μ L e inmediatamente se infectaron los jerbos por vía oral (fig. 6).



Figura 6. Infección con L₃ desvainadas de *Haemonchus contortus*.

Tratamiento de los jerbos.

Se calendarizaron los días de tratamiento con las fracciones obtenidas de *A. cina*, las cuales se llevaron a cabo durante tres días seguidos vía oral (fig. 7), de acuerdo con los análisis probit obtenidos en los bioensayos según lo reportado por Higuera y col. (2017); grupo 4 recibió ivermectina al 1%, a una dosis de 0.02 mg/kg peso. Se dejaron descansar a los jerbos durante dos días.

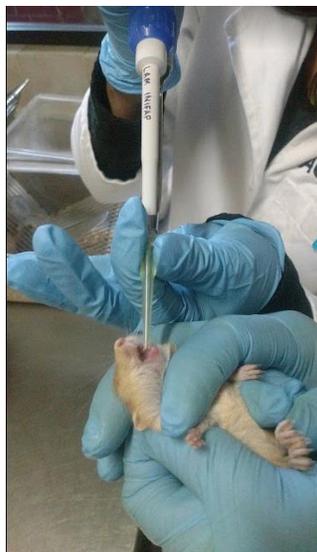


Figura 7. Tratamiento con extracto hexánico de *Artemisia cina*.

Sacrificio de los jerbos.

El sacrificio humanitario de los jerbos se llevó a cabo en el laboratorio de helmintología del INIFAP por medio de dislocación cervical, en apego a la normatividad correspondiente (NOM-062-ZOO-1999, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio*). El animal se aisló en una caja de polietileno con éter para insensibilizarlo, posteriormente, con una mano, se sujetó de la cola para sacarlo de la caja, sin soltarlo se colocó en una plancha de acero, con la ayuda de una rejilla se presionó la región cervical del jerbo (fig. 8), sin dejar de sujetar la cola, se efectuó un movimiento fuerte hacia atrás para dislocar la vértebras cervicales, con la precaución de no desprender completamente la cabeza del cuerpo, ni la piel de la región caudal.



Figura 8. Desnucamiento cervical de jerbo

Recuperación de L₄ de *Haemonchus contortus*.

Se empleó la técnica modificada de Squires y col. (2011), el jerbo se incidió con un bisturí por la parte media ventral para extraer el estómago, se lavó empleando PBS con ácido de sodio, se incidió por su curvatura mayor. El contenido gástrico y el interior del estómago se lavaron con PBS, raspando ligeramente la mucosa, esto se efectuó dos veces. Posteriormente, se realizó el raspado y desintegración del estómago para recuperar las larvas que estuviesen en el tejido (fig. 9).

Las larvas encontradas en los lavados y raspados de la mucosa se recuperaron en una caja de Petri con PBS a 37° C para su posterior revisión, identificación y comparación con lo reportado por otros autores.

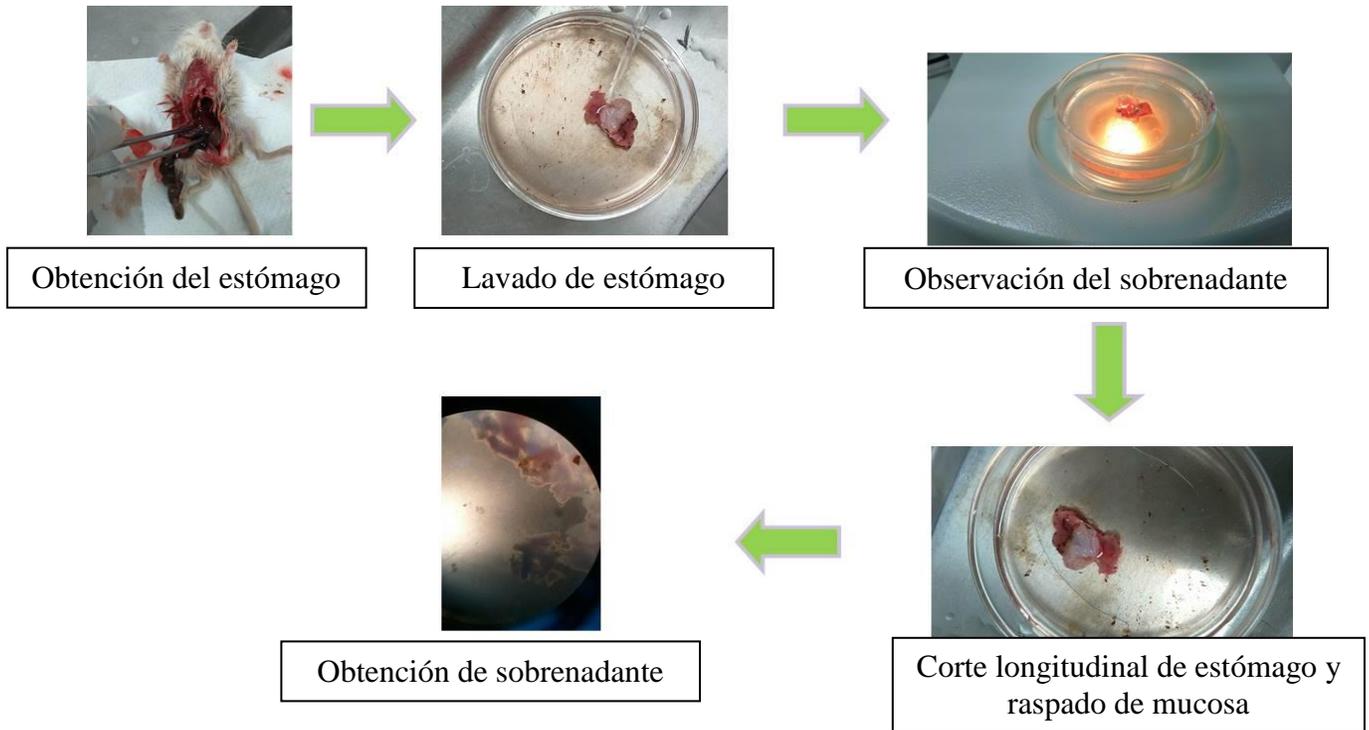


Figura 9. Recuperación y observación de L₄ de *Haemonchus contortus*

Análisis de resultados.

El porcentaje de reducción de la población de larvas de *H. contortus* en el estómago se calculó utilizando la fórmula estándar:

$$\% \text{ reducción} = \frac{\text{Testigo} - \text{Tto}}{\text{Testigo}} \times 100$$

Dónde:

% reducción= Porcentaje de reducción de larvas con respecto al grupo testigo

Testigo= Cantidad de larvas encontradas en grupo testigo

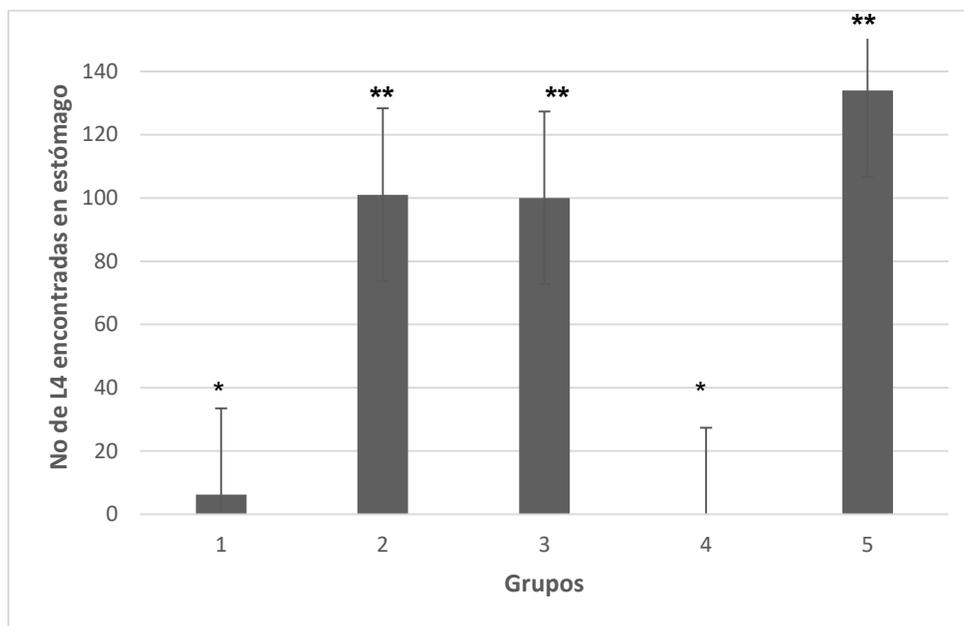
Tto= Cantidad de larvas encontradas después de cada tratamiento por grupo

Se realizó la prueba de análisis de varianza utilizando el programa *Statgraphics*® para conocer las diferencias entre los grupos que recibieron tratamiento.

Resultados.

En la fig. 10 se muestra la cantidad promedio de larvas de cuarto estadio (L₄) de *Haemonchus contortus* recuperadas en el estómago de jerbos infectados experimentalmente y tratados con fracciones de *Artemisia cina* o ivermectina. En los animales de los grupos 1 (fracción hexánica) y 4 (ivermectina) se colectó la menor cantidad de larvas, con un promedio de diez y una fase evolutiva, respectivamente; entre estos dos grupos no se encontraron diferencias significativas ($p>0.05$).

Figura 10. Cantidad promedio de larvas de cuarto estadio de *Haemonchus contortus* encontradas en estómago de jerbos (*Meriones unguiculatus*) postratamiento.



*, ** Diferencia estadística $p<0.05$

Grupo 1: Fracción hexánica, Grupo 2: Fracción metanólica, Grupo 3: Fracción acetato de etilo, Grupo 4: Ivermectina, Grupo 5: Testigo sin tratamiento. (ME \pm DS)

En el grupo 5 (testigo) se encontraron un promedio de 134 L₄ de *H. contortus*, cifra similar a los tratados con la fracción metanólica (grupo 2) y de acetato de etilo de *A. cina* (grupo 3), en estos grupos, no se observaron diferencias significativas entre ellos ($p>0.05$).

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre la cantidad de L₄ de *H. contortus* del bloque de grupos 2, 3 y 5 en relación a los grupos 1 y 4.

En el cuadro 4 se exponen los resultados del porcentaje de reducción de L₄ de *H. contortus* en jerbos tratados con fracciones de *A. cina* o ivermectina.

Cuadro 4. Porcentaje de reducción de L₄ *Haemonchus contortus* en jerbos tratados con fracciones de *Artemisia cina* e ivermectina.

Grupo	Tratamiento	Reducción (%)
1	Fracción hexánica de <i>Artemisia cina</i>	95.4
2	Fracción metanólica de <i>Artemisia cina</i>	24.6
3	Fracción acetato de etilo de <i>Artemisia cina</i>	25.3
4	Ivermectina	99.2

En los jerbos del grupo 4, que recibieron con ivermectina, se presentó una reducción del 99.2% en la población de L₄ de *H. contortus* con respecto al testigo (grupo 5), la diferencia fue estadísticamente significativa ($p < 0.05$), una situación similar (95.4%) ocurrió en el grupo 1; no hubo diferencias estadísticas entre los grupos 1 y 4 ($p > 0.05$).

En caso de los grupos 2 y 3, tratados con las fracciones de *A. cina* en metanol y acetato de etilo, no se encontró reducción de larvas en cuarto estadio.

Discusión.

El jerbo (*Meriones unguiculatus*) es un modelo animal muy eficaz para llevar a cabo experimentos *in vivo*, su tamaño, fácil manejo y susceptibilidad a enfermedades, lo demuestran. Se ha empleado en ensayos inoculándolos con larvas de *Haemonchus contortus* (Gressler y col., 2018), logrando mejores resultados al inmunosuprimirlos con dexametasona (Grando y col., 2016), recuperando un promedio de 44 larvas a los 12 días de la infección con 2,000 L₃ de *H. contortus*. En el presente estudio se recolectaron del grupo testigo un promedio de 134 L₄ a los siete días posinfección.

Conder y col. (1990 y 1991) citados por Squires y col. (2010) al justificar el empleo de los jerbos, mencionan que en ensayos realizados en ovejas y cabras infectadas con *H. contortus* hay una amplia variación en las condiciones experimentales, a menudo por la restricción en la cantidad de animales, pudiendo ser útil para la evaluación de plantas específicas en una región en particular, pero no puede usarse fácilmente para identificar los componentes activos de las plantas o su mecanismo de acción. Además, los extractos de plantas o compuestos activos putativos pueden ser difíciles de producir en cantidades necesarias para ensayos en los hospedadores naturales, por lo tanto el uso de los jerbos permite determinar eficacias preliminares, curvas de dosis–respuesta, se utilizan dosis bajas para determinar porcentajes de reducción y en algunos casos, posibles efectos tóxicos, cuando se tiene moléculas puras, realizar estudios de farmacocinética y farmacodinamia.

Cuando Goncalves y col. (2017) evaluaron el uso de extractos vegetales contra *H. contortus*, concluyeron que el efecto de los extractos hidroalcohólicos obtenidos a partir de hojas de melón amargo (*Momordica charantia*) y *Lepidium didyimum* son potencialmente útiles para el tratamiento de ese parásito de los ovinos y proponen realizar nuevos experimentos con otros solventes para extracción y administración a dosis más altas.

En consecuencia, Bashtar y col. (2010), realizaron pruebas *in vivo* con un extracto bruto de la planta cruda de *A. cina* (2 g/Kg), para el control de *Moniezia expansa*; durante 15 días consecutivos, se efectuó diariamente el examen fecal de ovejas tratadas y testigo, resultando eficaz el extracto de la planta en las concentraciones probadas. Por microscopía electrónica encontraron que se afectaron algunas estructuras de *M. expansa*, particularmente el escólex y las microvellosidades de la superficie tegumentaria externa. Por otra parte, Higuera y col. (2015), trabajaron con extracto etanólico de *A. cina* y lo fraccionaron identificando artemisininas por medio de cromatografía de capa fina y así conocer el efecto de éstas sobre la capacidad de asociación de las L₃ de *H. contortus* en explantes abomasales no encontrando diferencias significativas entre las fracciones de *A. cina* y artemisinina comercial ($p > 0.05$), asimismo, no existió efecto de las artemisininas obtenidas del extracto etanólico de *A. cina* sobre la capacidad de asociación de las L₃ de *H. contortus* al tejido abomasal, sin embargo, en este estudio el extracto hexánico mostró una acción favorable en la reducción de larvas en el tejido estomacal.

En este estudio, la fracción hexánica de *A. cina* exhibió un efecto contra la L₄ de *H. contortus* similar a la ivermectina, que ha demostrado ser un poderoso antihelmíntico, no obstante, se deben continuar los estudios para determinar la molécula responsable del efecto. Grandó y col. (2007) utilizaron jerbos infectados experimentalmente con L₃ de *H. contortus* para evaluar la actividad antihelmíntica del aceite esencial de *Malaleuca alternifolia*, nanocarreador de lípidos sólidos y terpen-4-ol, fueron capaces de reducir un 46.4%, 48.6%, y 43.2%, respectivamente, siendo seguros y eficaces. Al utilizar moléculas puras la eficacia fue mayor, sin embargo, en el presente trabajo se utilizó un extracto completo.

El trabajo de Squires y col. (2010) sobre el efecto de artemisinina y extractos de *Artemisia* en *H. contortus* en jerbos; consistió en evaluar la artemisinina derivada de *A. annua*, la única disponible comercialmente (Sigma Aldrich), se emplearon un extracto acuoso, extracto etanólico, aceite esencial y un extracto etanólico de *A.*

absinthium, en todos los casos se usaron jerbos infectados con 600 L₃ de *H. contortus*, no se encontraron efectos significativos ($p= 0.37$), en este estudio el extracto hexánico mostró diferencias significativas respecto al extracto metanólico y de acetato de etilo; sin embargo, no mostró diferencias significativas respecto al grupo tratado con ivermectina, lo cual permite intuir que *A. cina* tiene compuestos diferentes a *A. annua* y *A. absinthium*, lo que obliga a dilucidar el compuesto activo.

Conclusiones.

La fracción hexánica a partir del extracto etanólico de *Artemisia cina* tuvo un efecto nematicida en los jerbos infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

Las fracciones de acetato de etilo y metanólica de *A. cina* no exhibieron efecto nematicida alguno en los jerbos infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*.

Es importante hacer más estudios para poder identificar la o las moléculas responsables del efecto antihelmíntico, así como la evaluación de dicho compuesto en el hospedador definitivo de *H. contortus*.

Bibliografía.

1. Alonso MA, Torres JF, Sandoval CA, Hoste H, Aguilar AJ, Capetillo CM. Sheep preference for different tanniniferous tree fodders and its relationship with in vitro gas production and digestibility. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2009. 151(1-2): 75-85.
2. Bashtar AR, Hassanein M, Ghaffar FA, Rasheid KA, Hassan S, Mehlhorn H, Mahdi A, Morsy K, Ghamdi AA. Studies on monieziasis of sheep I. Prevalence and anthelmintic effects of some plants extracts a light and electron microscopic study. *Parasitol. Res.* 2011.108(1): 177-186.
3. Basualdo I, Soria N. Farmacopea herbolaria paraguaya: especies de la medicina folclórica utilizadas para combatir enfermedades del aparato respiratorio (Parte 1). Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción. *Rojasiana* 1996: 197-238.
4. Besier RB. Ecological selection for anthelmintic resistance: re-evaluation of sheep worm control programs. En: *Managing anthelmintic resistance in endoparasites. Décima Sexta Conferencia Internacional de la W.A.A.V.P.* Sun City, South Africa. 1997: 30-80.
5. Chartier C, Pors I, Hubert J, Rocheteau D, Benoit C, Bernard N. Prevalence of anthelmintic resistant nematodes in sheep and goats in Western France. *Small Rum. Res.* 1998.29: 33-41.
6. Coles GC, Bauer C, Borgsteede FHM, Geerts, Klei TR, Taylor, Waller PJ. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. *Vet. Parasitol.* 1992.44: 36-44.
7. Conder GA, Johnson SS, Hall AD, Flemingt MW, Mills MD, Guimond PM, Growth and development of *Haemonchus contortus* in jirds, *Meriones unguiculatus*. *J. Parasitol.* 1992.78(3): 492-497.

8. Conder GA, Johnson SS, Guimond PM, Geary TG, Lee BL, Winterrowd CA, Lee BH, DiRoma PJ. Utility of *Haemonchus contortus*/jird (*Meriones unguiculatus*) model for studying resistance to levamisole. Am. Soc. Parasitol. 1991.77(1): 83-86.
9. Cuéllar OJA. La nematodiasis gastrointestinal ovina, una enfermedad que causa retraso en el crecimiento y mortandad. Serie: Sanidad. Fortalecimiento del Sistema Productor Ovinos. Tecnologías para Ovinocultores. 2009: 245-249.
10. Cuéllar OJA, Higuera PRI. El papel de los nemátodos para medir la degradación de los suelos. En: El modelo de *Latte Nobile*, otro método de producción de alimentos funcionales. Edit. por Galina HMA. Primera edición. Puerta Abierta Editores. México. 2018: 119-126.
11. Cuéllar OJA. Resistencia de nematodos a los antihelmínticos: mitos, realidades y posibles soluciones. (Revista Argentina de Producción Animal, Memorias del X Congreso de ALEPRYCS. Punta Arenas, Chile. 2016.
12. De Jesús-Gabino AF, Mendoza-de-Gives P, Salinas-Sánchez DO, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Hernández-Velázquez VM, Valladares-Cisneros G. Anthelmintic effects of *Propis laevigata* n-hexánic extract against *Haemonchus contortus* in artificially infected gerbils (*Meriones unguiculatus*). J. Helminthol. 2010.84(1): 71-75.
13. Dunn MA Helminthología veterinaria. Editorial El Manual Moderno, México DF. 2011: 361.
14. Farias-Saldaña FU, Vázquez VM, Campos V. Determinación del incremento en la eliminación de huevos de nematodos gastroentéricos posparto en ovejas. Téc. Pec. Méx. 1988.28(3): 259-266.
15. Ferreira JFS. *Artemisia* species in small ruminant production: their potential antioxidant and anthelmintic effects. Conference: Appalachian Workshop and Research Update: Improving small ruminant grazing practices. 2009: 53–70.
16. Ferreira LE, Benincasa BI, Fanchin AL, Franca SC, Contini SSHT, Chagas ACS, Belebóni RO. *Thymus vulgaris* L. essential oil and its main component

- thymol: Anthelmintic effects against *Haemonchus contortus* from Sheep. *Vet Parasitol.* 2016.15(228): 70-76.
17. Flores-Acevedo S, Sarmiento N, Martínez GS. Patrones de alimentación, sueño y actividad reproductiva de los jerbos de Mongolia (*Meriones unguiculatus*), *Suma Psicología* 2010.17(2): 201-208.
 18. García-Flores A, Vázquez-Prats V, López-Arellano ME, Liébano-Hernández E, Mendoza-de-Gives P. *In vitro* and *in vivo* diagnosis of anthelmintic resistance in *Haemonchus contortus* infected sheep in México. In: *Proceedings of V International Seminary of Animal Parasitology*, Mérida, México. 2003.
 19. Goncalves MD, Xavier TB, Costa JF, Rodríguez TL, Ormachea SL, Silva FA, Akisue G. Avaliação do uso de extratos vegetais para controle da hemoncose em ovinos naturalmente infectados. *Rev. Ambient. Agua.* 2017.12(2): 331-339.
 20. González-Garduño R, Córdova-Pérez C, Torres-Hernández G, Mendoza de Gives P, Arece-García J. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. *Vet. Méx.* 2011.42(2): 125-135.
 21. González-Garduño R, Torres-Hernández G, Nuncio-Ochoa MGJ, Cuéllar-Ordaz JA, Zermeño-García ME. Detección de eficiencia antihelmíntica en nematodos de ovinos de pelo con la prueba de reducción de huevos en heces. *Livestock Res. Rural Develop.* 2003. 15 (12): 12. Retrieved July 11, 2013, from <http://www.lrrd.org/lrrd15/12/gonza1512.htm>
 22. Grando TH, Bakdissera MD, Graser LT, Facco de SM, Bortouzzi BN, Schafer AS, Ebling RC, Raffin RP, Santos R, Stefani LM, Vaucher R, Real M, Monteiro SG. *Malaleuca alternifolia* antihelmintic activity in gerbils experimentally infected by *Haemonchus contortus*. *Exp. Parasitol.* 2016.170: 177-183.
 23. Gressler LT, Grando TH, Carmo G, Machado G, Vaucher RA, Stefani LM, Monteiro SG. *Meriones unguiculatus* infected by *Haemonchus contortus*: evaluation of different experimental protocols. *J. Helminthol.* 2018.19: 1–6.

24. Hernández–Barral Á. Estudio de la respuesta inmune frente a *Haemonchus contortus* en dos razas ovina canarias. Tesis Doctoral, Universidad de las Palmas de Gran Canaria. 2011.
25. Higuera-Piedrahita RI. Efecto de *Artemisia cina* en extracto etanólico contra la infección e inducida por *Haemonchus contortus* en ovinos. Tesis que para optar por el grado de maestra en ciencias. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM. 2015.
26. Huerta C. La herbolaria: mito o realidad. Boletín nacional CONABIO. Biodiversidad. 1997.12: 1-7.
27. Jabbar AZ., Iqbal Z, Kerboeuf D., Muhammad G, Khan M, Afaq M. Anthelmintic resistance: the state of play revisited. Life Sci. 2006.79(26): 2413-2431.
28. Kaplan RM. Drug resistance in nematodes of veterinary importance: a status report. Trends Parasitol. 2004.20: 477-481.
29. Kong LY, Tan RX. Artemisinin: a miracle of traditional Chinese medicine. Nat. Prod. Rep. 2015.32(12): 1617-1621.
30. Martínez AR, Rojo FA. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7ª edición. Editorial Panamericana. México. 1987: 232-238.
31. Martínez OMC. 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. 2010.
32. Meana A, Rojo FA. Parasitosis de los rumiantes. Tricostrogilidosis y otras nematodosis. En: Cordero del Campillo M. y col. Parasitología Veterinaria. Madrid. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Segunda edición. 2000.
33. Medina P, Guevara F, La O M, Ojeda N, Reyes E. Resistencia antihelmíntica en ovinos: una revisión de informes del sureste de México y alternativas disponibles para el control de nemátodos gastrointestinales. Pastos y forrajes. 2014. 37(3): 257-263.

34. Mendoza N, Rodríguez JL, Figueroa JL. Herbolaria. Rev. Fac. Med. UNAM. 2005. 48(6): 248-250.
35. Molento MB. Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. Vet. Parasitol. 2009.163: 229–234.
36. Montalvo-Aguilar X, López-Arellano ME, Vázquez-Prats VM, Liébano-Hernández E, Mendoza-de-Gives P. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a fenbendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. Tec. Pecu. Mex. 2006. 44: 81-90.
37. Muñoz GMA, Sánchez VH, Revilla VA, Abd HA, Cuenca C, Cuéllar OJA, Alba F. Efecto de la hemoncosis experimental sobre las concentraciones séricas de sodio, potasio y cobre en dos razas ovinas. Quehacer científico en Chiapas. 2016.11(2): 68-75.
38. Navarro RJ, Burillo J, González CA. Efectos insecticidas y antifúngicos de una nueva variedad de ajeno (*Artemisia absinthium* L.). Ensayos preliminares. Boletín SEEA. 2017.2: 1-3.
39. Niec R. Cultivo e identificación de larvas infectantes de nemátodos gastroentéricos del bovino y del ovino. Instituto de Patología Animal, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Secretaría de Estado de Agricultura y Ganadería de la Nación, República de Argentina. 1968: 1-28.
40. NOM-072-SSA-2012. Etiquetado de medicamento y de remedios herbolarios. Diario oficial de la Federación. México. 2012.
41. Nuncio-Ochoa GJ, Escobedo-Amezcuca F, Morteo-Gómez R, Magaña-Damian M, González-Garduño R. Resultados preliminares de la resistencia antihelmíntica de parásitos gastrointestinales en ovinos de Tabasco. En: IV Seminario de Producción de ovinos Tropicales. Villahermosa, Tabasco, México. 2005.
42. Quiroz H. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa. Tercera edición. 1999: 876.
43. Raggi L, Thénot M. Fisiología y terapéutica para la clínica de pequeños mamíferos y reptiles (hámster, cobayo, conejo, hurón, jerbo, tortuga e

- iguana verde). Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias. Universidad de Chile. Primera edición. 1999: 1-82.
44. Roeber F, Jex AR, Gasser RB. Advances in the diagnosis of key gastrointestinal nematode infections of livestock, with an emphasis on small ruminants. *Biotechnol.* 2013.31: 1135–1152.
 45. Rojas-Hernández S, Gutiérrez-Segura I, Olivares-Pérez J, Valencia-Almazán M. Prevalencia de nemátodos gastrointestinales en ovinos en pastoreo en la parte alta del Municipio de Cuetzala del Progreso, Guerrero, México. *REDVET. Rev. Electrónica de Vet.* 2007;8(9): 1-7.
 46. Sánchez C, Cacho E, Quiroz J, López F. *Parasitología veterinaria*, Editorial Acribia, España. Segunda edición. 2001: 1-935.
 47. Sangster N. Managing parasiticide resistance. *Vet. Resist.* 2001.98: 89-109.
 48. Saxena RB. Entirely gone out useful plant –*Artemisia cina*. *Indo American J. Pharm. Sci.* 2015.2(3): 648-663.
 49. Soca M, Roque E, Soca M. Epizootiología de los nemátodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes. *Pastos y forrajes.* 2005: 28(3): 175-185.
 50. Squires J, Ferreira J, Lindsay D, Zajac A. Effects of artemisinin and *Artemisia* extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Vet. Parasitol.* 2010.175: 103-108.
 51. Tariq KA, Chishti MZ, Ahmad F, Shawl AS. Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Vet. Parasitol.* 2008.160(1–2): 83–88.
 52. Taylor MA, Hunt KR, Goodyear KL. Anthelmintic resistance detection methods. *Vet. Parasitol.* 2007.103(3): 183-194.
 53. Torres-Acosta FJ, Mendoza-de-Gives P, Aguilar-Caballero AJ, Cuéllar-Ordaz JA. Anthelmintic resistance in sheep farms: Update of the situation in the American continent. *Vet. Parasitol.* 2012.189: 89-96.
 54. Torres-Acosta JFJ, Dzul-Canché U, Aguilar-Caballero AJ, Rodríguez-Vivas RI. Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol.* 2003.114: 33-42.

55. Torres-Acosta JFJ, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Rum. Res.* 2008. 77: 159-173.
56. Torres-Acosta JFJ, López-Cervantes C, Martínez-Ortiz-de-Montellano C, Cámara-Sarmiento R, Rodríguez J, Canul-Ku HL, Tirado-Muñoz F, Aguilar-Caballero AJ, Roberts B. Prevalence of sheep farms with anthelmintic resistant nematodes in two states of tropical México. In: *Proceedings of First North American Parasitology Congress, Mérida, México.* 2007.
57. Trujillo N. Elementos de etnomedicina veterinaria en la Historia de Venezuela. *Revista del Colegio del Estado Lara.* 2013.6(2): 6-18.
58. Van Wyk JA, Van der Merwe JS, Vorster RJ, Viljoen PG. Anthelmintic resistance in South Africa: surveys indicate an extremely serious situation in sheep and goat farming. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1999.66 (4): 273-284.
59. Waller PJ. Anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 1997.72: 391-412.
60. Zacharias F, Guimara JF, Araujo RR, Almeida MAO, Ayres MCC, Bavia ME, Mandonca-Lima FW. Effect of homeopathic medicines on helminth parasitism and resistance of *Haemonchus contortus* infected sheep. *Homeopathy.* 2008.97(3): 145- 151.
61. Zárate-Rendón D, Rojas-Flores J, Segura-Hong A. Validación del método FAMACHA para dosificación antihelmíntica selectiva en rebaños caprinos lecheros. *Rev. Inv. Vet. Perú.* 2017;28(1): 150-159.