



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

EFFECTO DE *Artemisia cina* 30 CH Y *Artemisia cina* EN EXTRACTO ETANÓLICO  
CONTRA LA INFECCIÓN NATURAL E INDUCIDA POR *Haemonchus contortus*  
en ovinos.

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**ROSA ISABEL HIGUERA PIEDRAHITA**

TUTOR:  
M en C JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

COMITÉ TUTORAL:  
Dra. MARIA EUGENIA LÓPEZ ARELLANO  
Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias

Dra. RAQUEL LÓPEZ ARELLANO  
Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

MÉXICO, CUAUTITLÁN IZCALLI, OCTUBRE, 2015



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.

El trabajo se realizó con el equipo e instalaciones del Laboratorio 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM, el Laboratorio de Helmintología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias CENID, PAVET y el Laboratorio de Química del Centro de Investigación Científica de Yucatán.

Parte del financiamiento se obtuvo del proyecto PAPIIT: IN222814-2: *El uso de explantes abomasales en el estudio de la infección y actividad antihelmíntica contra Haemonchus contortus en ovinos.*

Rosa Isabel Higuera Piedrahita es alumna becaria del CONACYT (2013- 2015)

## **Agradecimientos.**

Mtro. Jorge Alfredo Cuéllar por su confianza en mi capacidad y su constante apoyo como maestro y amigo.

Al proyecto PAPIIT 222814 que financió y apoyó este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología quien apoyó mi trabajo con una beca.

Dra. María Eugenia López Arellano por su confianza en el trabajo, en mi y apoyo.

Dra. Raquel López Arellano por su continua disposición y colaboración.

M en C. César Cuenca Verde por su ayuda continua en este proceso de aprendizaje.

MVZ Israel Villegas por su constante apoyo.

A los profesores que me dieron clase: Dra. Patricia Ramírez, Dra. Gabriela Bárcenas, Dr. Héctor Quiroz, Dra. Angélica Terrazas, Dr. Alfredo Medrano y Dr. Miguel Galina.

A los jurados que me encaminaron y enriquecieron mi trabajo con sus comentarios: Dra. Evangelina Romero, Dr. Héctor Quiroz, Dr. Pedro Mendoza de Gives, Dr. Jorge Tórtora.

Al Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán por todo el apoyo, enseñanza paciencia y grandes amistades que hice allí: Dra. Rocío Borges, técnica Mirbella Cáceres, M en C Tahné Rodríguez y M en C Lourdes Tamayo.

A mi mamá por su apoyo incondicional en este proceso, por creer en mí y ayudarme a ser mejor persona, a mi abuelita por ser la persona que alienta mis sueños, a mi abuelito quien me muestra el camino cada mañana, a mi hermano por ser la luz de mis ojos y el sentido de seguir, a mi cuñada favorita por su confianza y respeto.

A mi novio Héctor Alejandro de la Cruz por estar a mi lado y confiar en mí.

A mis amigos que confiaron en mí y me dieron apoyo incondicional: M en C Elizabeth Aguirre, M en C Rosario Martínez, M en C Felipe Bedoya, M en C Camila Rendón, MV Daniel Pulido, MV Bibiana Beltrán y MV Daniela Salas.

## **Dedicatorias.**

A Dios por mostrar mi camino y darme la luz y determinación de levantarme cada día.

A mi abuelito por estar siempre a mi lado y ayudarme en cosas que parecían imposibles: tú me mostraste que todo en la vida es talento y ganas. Te amo.

A mi abuelita por ser la consentidora del equipo y por apoyarme en todas las decisiones que tomo.

A mi mami por ser aquel motor que no me deja decaer en ninguna circunstancia.

A mi gordi hermoso por ser la luz de mi vida y la razón para continuar.

A mi novio por ser aquella persona que admiro y que amo. Gracias por todo tu apoyo.

A mis amigos por sus consejos y ayuda en esto.

A México por recibirme con los brazos abiertos.

A la FES Cuautitlán quien es mi segunda alma máter.

Rosita

## Índice.

	Pág.
Índice de figuras	8
Índice de cuadros	10
Índice de anexos	12
Resumen	13
Abstract	15
Introducción	16
Justificación	26
Hipótesis de investigación.	28
Objetivos de investigación.	29
Materiales y métodos	30
<u>Experimento I: Caracterización bioquímica de <i>Artemisia cina</i>.</u>	31
Materiales y métodos	31
Determinación de metabolitos de <i>Artemisia cina</i> .	31
Resultados y discusión	32
<u>Experimento II: Fraccionamiento derivado del extracto etanólico de <i>Artemisia cina</i> para obtener moléculas puras.</u>	40
Materiales y métodos	40
Resultados y discusión	40

<u>Experimento III: Evaluación del efecto letal de <i>Artemisia cina</i> 30CH y de las fracciones del extracto etanólico en la inhibición de la eclosión de huevos, desarrollo larvario, migración larvaria y explantes abomasales de <i>Haemonchus contortus</i></u>	45
Materiales y métodos	45
Resultados y discusión	47
<u>Experimento IV: Determinación del efecto de <i>Artemisia cina</i> 30CH en una infección natural con nematodos gastroentéricos.</u>	56
Materiales y métodos	56
Resultados y discusión	58
<u>Experimento V: Evaluación del efecto de <i>Artemisia cina</i> 30CH y el extracto etanólico de <i>A. cina</i> en una infección controlada con <i>Haemonchus contortus</i>.</u>	65
Materiales y métodos	65
Resultados y discusión	67
Discusión general	75
Conclusiones	77
Bibliografía	78
Anexos	92

## Índice de figuras.

	Pág.
Figura 1. Diferencia conformacional entre moléculas de Artemisia cina 30CH y agua.	32
Figura 2. Diferencia conformacional entre moléculas de <i>Artemisia cina</i> 30CH y agua en primera derivada.	34
Figura 3. Estimación de proteína de <i>Artemisia cina</i> por el método de Bradford.	35
Figura 4. Inhibición de <i>Haemonchus contortus</i> en el ensayo de eclosión de huevos (IEH) (EEM).	45
Figura 5: Inhibición de <i>Haemonchus contortus</i> en el ensayo de desarrollo larvario (IDL). EEM.	46
Figura 6: Inhibición de <i>Haemonchus contortus</i> en el ensayo de migración larvaria (IML). EEM.	46
Figura 7: Inhibición de <i>Haemonchus contortus</i> en el ensayo de migración con L <sub>3</sub> desnudas. EEM.	47
Figura 8: Penetración de larvas 3 de <i>Haemonchus contortus</i> en explantes abomasales.	48



- Figura 9: Dinámica de eliminación de huevos por gramo ME  $\pm$  EE de corderos tratados con Albendazol, *A. cina* 30 CH y grupo testigo. 49
- Figura 10: Volumen de paquete celular (%) ME  $\pm$  EE en ovinos Suffolk tratados con Albendazol y *A. cina* 30 CH. 50
- Figura 11: Dinámica de eliminación de huevos por gramo en heces (HPG) desde la infección con 5000 L3 hasta siete días después del tratamiento. Corderos tratados con *A. cina* (extracto etanólico), Albendazol, *A. cina* 30 CH y el grupo testigo. 65
- Figura 12: Ganancia de peso diaria (Kg) desde la infección con 5000 L<sub>3</sub> hasta siete días después del tratamiento. Corderos tratados con *A. cina* (extracto etanólico), Albendazol, *A. cina* 30 CH y el grupo testigo. 67

## Índice de cuadros.

	Pág.
Cuadro 1. Subfracciones colectadas de la separación de <i>Artemisia cina</i> por columna de gravedad de la fracción Ac2b.	40
Cuadro 2. Fracciones de <i>Artemisia cina</i> obtenidas por medio de la placa preparativa realizada de la fracción Ac3k y Ac3m.	41
Cuadro 3. Fracciones obtenidas de la separación de <i>Artemisia cina</i> por medio de partición líquido líquido en solvente metanólico	41
Cuadro 4. Promedio de pesos de los grupos tratados con Albendazol y <i>A. cina</i> 30 CH de treinta animales de raza Suffolk.	62
Cuadro 5. Promedios de FAMACHA para los 30 animales Suffolk tratados con Albendazol y <i>A. cina</i> 30 CH.	71
Cuadro 6. Promedios de FAMACHA de animales tratados con Albendazol, <i>A. cina</i> 30 CH y <i>A. cina</i> .	71
Cuadro 7. Promedios de huevos por hembra, número de hembras y promedio de medida de hembras para los 20 animales tratados con Albendazol, <i>A. cina</i> 30 CH y <i>A. cina</i> .	71
Cuadro 8. Promedios de número de machos, medida de machos y relación macho: hembra para los 20 animales tratados con Albendazol, <i>A. cina</i> 30 CH y <i>A. cina</i> .	

## Índice de anexos.

	Pág.
Anexo 1 Page- SDS.	90
Anexo 2 Ensayo de Bradford.	91
Anexo 3 Análisis de espectroscopia de masas de artemisininas	92
Anexo 4 Metodología para la separación de artemisininas de <i>Artemisia cina</i> .	95
Anexo 5 Ensayo de eclosión de huevos.	96
Anexo 6 Ensayo de desarrollo larvario.	97
Anexo 7 Ensayo de migración larvaria.	98
Anexo 8 Ensayo de inhibición de la migración larvaria con L3 desnudas.	99
Anexo 9 Ensayo de explantes abomasales.	

## Resumen.

El daño inducido por parasitosis gastrointestinales en producciones ganaderas es muy alto. La baja eficiencia productiva y el constante tratamiento farmacológico sin cronograma sanitario permite tomar medidas de contingencia y buscar nuevos mecanismos de control con corrientes alternas como es la herbolaria y la homeopatía. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antiparasitario de *Artemisia cina* 30 CH y *A. cina* en extracto etanólico contra *Haemonchus contortus*. El presente estudio se llevó a cabo en cinco experimentos: en primera medida se realizó la caracterización bioquímica de la planta *A. cina* y del remedio homeopático *A. cina* 30CH. De acuerdo a la caracterización bioquímica de la planta se procedió al fraccionamiento y búsqueda de artemisininas (principio reportado como antihelmíntico). La evaluación de la eficacia de las fracciones, del extracto etanólico y del compuesto homeopático se llevó a cabo por ensayos in vitro (ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (IEH), desarrollo larvario, migración larvaria y explantes abomasales), e in vivo, durante una infección inducida e infección natural por *H. contortus*. Los resultados obtenidos mostraron que las fracciones obtenidas Ac3a, Ac3b, Ac3h, Ac3i, Ac4a obtuvieron picos congruentes con artemisininas comerciales, la presencia de picos a 244.89 m/z y a 261m/z, permiten que la fracción sea activa in vitro: es decir, que posea efecto letal. Además, el compuesto homeopático *A. cina* 30CH y Albendazol mostraron eficacia de 100% en el ensayo de IEH, la fracción Ac3h mostró eficacia menor, 70%, pero efectiva. Las fracciones Ac3e, Ac3h y el levamisol (antihelmíntico), mostraron inhibición de la migración larvaria (L<sub>3</sub>), el efecto es mayor cuando las larvas están sin la segunda vaina y las fracciones de artemisininas son activas (Ac3a, Ac3b, Ac3h y Ac3i). El efecto inhibitorio de las artemisininas comerciales fue evidente en larvas sin vaina.

En la infección natural se determinó que *A. cina* 30CH y ABZ mostraron eficacia antihelmíntica sobre reducción de HPG y sobre parámetros productivos como es el índice FAMACHA y el %VCA al día 7 y 14. En el caso del ABZ, éste mejora los parámetros y disminuye drásticamente la eliminación de huevos por gramo desde el día siete pos-tratamiento y se mantiene hasta el día 28. En la infección controlada, se observó efecto sobre la reducción de la eliminación de HPG en el grupo tratado

con *A. cina*, se observó efecto letal en el grupo tratado con albendazol. Se propone a *A. cina* como un antihelmíntico, sin embargo, se necesitan mas estudios para determinar dosis letal y concentraciones efectivas en animales.

## Abstract.

The damage induced by gastrointestinal parasites in livestock production is so high. Low production and constant medical treatment without medical schedule allows to take contingency measures and new alternative mechanisms of control currents such as herbology and homeopathy. The aim of this study was to evaluate the effect of *Artemisia cina* 30 CH and ethanolic extract of *A. cina* against *Haemonchus contortus*. This study was conducted in five experiments: a first step was the biochemical characterization of *A. cina* plant and homeopathic remedy. According to the biochemical characterization, we searched artemisinins (reported as an anthelmintic). The evaluation of the effectiveness of ethanolic extract fractions and homeopathic compound was carried out by in vitro assays (inhibition egg hatch assay (IEH), inhibition of larval development assay, inhibition larvae migration assay and abomasal explants) and in vivo: in a controlled infection and natural infection with *H. contortus*. The results showed that the fractions obtained Ac3a, Ac3b, Ac3h, Ac3i, Ac4a are the same as artemisinin *Sigma*®, the presence of peaks: at 244.89 m/z and 261 m/z allow fraction is active in vitro: and there had lethal effect. Besides homeopathic compound *A. cina* 30CH and ABZ showed 100% efficacy in the trial of IEH, the Ac3h fraction showed lower (70%) efficiency, however, accepted by the World Association of Parasitology. The Ac3e, Ac3h and levamisole fractions showed inhibition of larval migration (L3), the effect is greater when larvae are unshathed and fractions of artemisinins are active (AC3A, Ac3b, Ac3h and Ac3i). The inhibitory effect of artemisinin *Sigma*® was evident in unshathed larvae. In natural infection was determined that *A. cina* 30CH and albendazole showed anthelmintic efficacy on reduction of EPG and production parameters such as: FAMACHA and CPV index at day 7 and 14. In the case of ABZ, this improves the parameters and decreases drastically EPG from day seven post-treatment and is sustained over time until day 28. In the controlled infection effect was observed a reduction of EPG in the group treated with *A. cina*. Lethal effect was observed in the group treated with albendazole. *A. cina* is proposed as an anthelmintic, however, more studies are needed to determine lethal doses and concentrations effective in animals.

## Introducción.

Las nematodosis gastrointestinales son un problema evidente en los sistemas de producción ovino bajo pastoreo, se manifiestan de manera evidente en animales al destete, ya que la competencia de su sistema inmunológico se ve afectado por el estrés y cambio de alimentación (Santos y col., 2014).

El *Haemonchus contortus* es un nematodo que de acuerdo a Fader (2008) representa uno de los mayores problemas a nivel productivo en corderos al destete y en hembras con estado inmunológico comprometido. De acuerdo a Quiroz (2003), se clasifica de la siguiente forma:

- Filo: Nematelminto
- Clase: Nematoda
- Orden: Strongilidea
- Superfamilia: Trichostrongyloidea
  - Familia: Trichostrongylidae
  - Género: *Haemonchus*
  - Especie: *Haemonchus contortus*

El nematodo *H. contortus* tiene un ciclo directo, sus hembras son ovíparas prolíficas y los huevos son eliminados en las heces bajo condiciones ambientales de 18 a 26°C y 80 a 100% de humedad. Asimismo, se desarrollan en el pasto como larva tres (L<sub>3</sub>) ó infectante en aproximadamente cinco días; en condiciones frías puede extenderse por un mayor periodo, semanas o meses. Después de la ingestión y llegada al rumen, las larvas cambian de cutícula externa (muda) dos veces. Posteriormente, se inicia el desarrollo como estadio endoparasítico, formándose la lanceta oral, perforante que les permite la obtención de nutrientes a través de la sangre de los vasos que conforman la mucosa del abomaso. En aproximadamente 21 días, alcanza su estadio adulto, migrando a la luz del abomaso, donde se

mueven libremente en la superficie de la mucosa. El periodo prepatente es de dos a tres semanas (Quiroz, 2003).

Los adultos se identifican por su tamaño entre 1.1 a 2.7 cm de largo. Microscópicamente el macho presenta un lóbulo dorsal asimétrico y espículas con ganchos. En las hembras se observan los ovarios blancos enrollándose en espiral alrededor del intestino repleto de sangre. Además, puede presentar tres tipos de procesos vulvares, liso, botón y lingüiforme, o no presentar ninguno. El adulto forma papilas cervicales en forma lateral (Meana y Rojo, 1999; Quiroz, 2003).

Durante la infección aguda, los animales muestran diferentes grados de anemia, pérdida progresiva de peso, pueden llegar a presentar edema submandibular por extravasación de proteínas y hasta la muerte. En hemoncosis hiperaguda el animal puede morir súbitamente como consecuencia de una gastritis hemorrágica grave (Soulsby, 1987).

Debido a que la infección por nematodos gastroentéricos es uno de los problemas de salud más importante en los sistemas de producción de ovinos del país, su control se ha hecho principalmente con base en el uso de fármacos, algunos de los antihelmínticos más utilizados y sus mecanismos de acción son los siguientes:

Antihelmíntico	Mecanismo de acción
Lactonas macrocíclicas	Se aíslan de <i>Streptomyces avermitilis</i> . Su mecanismo de acción se describe como neuroactivo, en los receptores del ácido gama amino butírico (GABA), incrementan la permeabilidad de excitación de las membranas a iones cloruro (Turner y Schaeffer, 1989; Campbell, 1991; Gill y col., 1994).
Bencimidazoles	Actúan sobre la $\beta$ tubulina en la formación de microtúbulos, estos permiten la formación del huso mitótico, motilidad y secreción celular, absorción y



	transporte celular, los daños impiden la homeostasis e inducen la muerte del parásito. Se ha descrito que pueden inhibir al mismo tiempo la enzima fumarato reductasa en el transporte de la glucosa, afectando el metabolismo del parásito (Driscoll y col., 1989; Fonseca, 2005; Molento, 2013; Saunders y col., 2013).
Imidazotiazoles (Levamisol)	Induce parálisis espástica por la liberación de acetilcolina sobre receptores nicotínicos y muscarínicos, además induce la inhibición de la enzima fumarato reductasa y la oxidación del ácido succínico parasitario inhibiendo completamente el metabolismo de carbohidratos (Molento, 2013).
Salicilaníidas (Closantel)	Impiden la fosforilación oxidativa a nivel mitocondrial. El closantel se une a las proteínas plasmáticas para permitir su transporte y por esta misma razón su vida media en sangre es alrededor de 15 días (Saunders y col., 2013).

El uso excesivo e indiscriminado de los antiparasitarios químicos ha favorecido la aparición de parásitos con resistencia a los antihelmínticos (RA), en México. La RA en ovinos referente a *Haemonchus contortus* se ha reportado por varios investigadores (Campos y col, 1990; Campos y col., 1992; González y col., 2003; Torres y col., 2003a; Torres y col., 2003b; Nuncio y col., 2005; Montalvo y col., 2006; Torres y col., 2007; González y col., 2014) en diferentes entidades del país como Morelos, Puebla, Veracruz, Yucatán, Estado de México; esta problemática obliga a utilizar otras opciones de control que sean eficaces, económicas, rentables y con menor impacto al ambiente, éstas involucran el manejo del pastoreo, uso de razas resistentes, control biológico a través de hongos nematófagos y nematodos de vida libre como posibles depredadores, la aplicación del sistema FAMACHA, la administración de partículas de cobre, la herbolaria y homeopatía (Knox y col., 2006;

Martínez y col., 2007; Torres y col., 2008; Rocha y col., 2008; Molento, 2009), que si bien de manera individual no muestran mayor impacto que el sólo uso de los fármacos, es de recalcar que el uso de dos o más opciones en conjunto muestran efectos positivos sobre la disminución en la eliminación de huevos del parásito (Torres y col., 2008).

Una de las opciones disponibles comercialmente en el mercado es la homeopatía, en este sentido, en 2013, la Ley General de Salud de México, título décimo segundo, Control Sanitario de Productos y Servicios y de su Importación y Exportación, define un compuesto homeopático como *toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio y que sea elaborado de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en la Farmacopea homeopática de los Estados Unidos Mexicanos, en las de otros países u otras fuentes de información científica nacional e internacional*, a los recursos herbolarios como *Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyos ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una 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 o internacional*.

La medicina homeopática es un recurso terapéutico que apareció en Europa a finales del siglo XVIII, anterior a la introducción del método experimental en farmacología y fisiología, la teoría microbiana, celular, atómica, de la evolución y el positivismo. Este método se originó a partir de los trabajos y observaciones del médico alemán Samuel C. Hahnemann quien vivió de 1755 a 1843 (De Sagreda, 2006).

En una publicación relacionada con la primera estrategia global sobre la medicina tradicional, la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002), se informa que en muchos países desarrollados, las denominadas medicinas complementarias (MCA) son muy populares; señala diversos informes gubernamentales y no

gubernamentales donde la proporción de la población que ha utilizado la MCA es de 46% en Australia, 49% en Francia y 70% en Canadá; asimismo, encuestas realizadas a 610 médicos suizos demostró que 46% había utilizado homeopatía.

La palabra homeopatía proviene del griego *ornals*=igual y *pathos*= pasión, catástrofe, paso, sentimiento, enfermedad; es un método terapéutico con base científica que persigue la curación de las personas a través de determinadas sustancias de origen natural (Ballester y col., 1999). La homeopatía plantea tres principios básicos:

1. Ley de semejanza o similitud (origen hipocrático, *los semejantes se han curados por lo semejante*). Esta regla se utiliza como principio de tratamiento ya que se aplica un remedio que induce los mismos síntomas de la enfermedad, lo más similar posible. Ballester y col. (1999) plantean que este principio crea una reacción de hipersensibilidad al cuadro inicial y permite un reinicio del sistema inmune y su defensa.
2. Individualización del enfermo y no de la enfermedad. Como lo plantean Ballester y col. (1999) con la homeopatía no se trata la enfermedad como tal, es medicina para individuos, de esta manera puede haber varios medicamentos para una misma enfermedad pero para diferentes individuos. Este postulado plantea que para una terapia homeopática sólo se debe administrar un medicamento a la vez, ya que si se induce daño o cura no se sabrá cuál es el responsable.
3. Dosis infinitesimales o microdosis de la sustancia activa: Con este principio todos los medicamentos homeopáticos tienen una dosis única de administración en escala decimal, centesimal o milesimal. Este proceso se llama potenciación y se plantea, que entre más potenciada sea una sustancia, es más eficaz y su efecto será más duradero (Ballester y col., 1999).

*Diluciones homeopáticas.* La homeopatía requiere que el producto homeopático sea diluido para el máximo efecto. En este sentido, está por debajo del número de Avogadro (número de partículas elementales: átomos o moléculas en una mol de sustancia:  $6.02 \times 10^{23}$ ) a su vez, se han desarrollado técnicas para controlar la concentración, o disolución, de las sustancias para crear los remedios homeopáticos (Gebauer, 2002). Los productos homeopáticos parten de una base mineral, vegetal o animal, pasan a una base alcohólica por un mes y a esto se llama una solución madre, en 1819 Hahnemann tomó una gota de esta solución madre y la diluyó en 99 gotas de alcohol puro, la dinamizó 100 veces y obtuvo la primera centesimal (1 CH), así continuó las sucesiones, actualmente de esta manera se potencia una sustancia homeopática (López, 1999) Estas sucesiones se utilizan de igual forma para humanos y animales.

Existen remedios homeopáticos que consisten de pequeñas pastillas blancas de azúcar de leche que han absorbido la solución potenciada, llamadas glóbulos y microglóbulos (en dilución C-200). Otros remedios se encuentran en forma de solución para gotas e inyectables, comprimidos y cremas para usar externamente (Cuesta, 1998).

Existen dos tipos de remedios, los isopáticos y los nosodes. Los isopáticos se hacen de la sustancia real que causa la enfermedad, por ejemplo, una solución homeopáticamente preparada (conteniendo cero moléculas de pelos de gato), podría usarse para tratar la alergia a los gatos (Gebauer, 2002). Los remedios nosodes, que se elaboran de tejidos de animales infectados o secreciones corporales o del agente etiológico (Barros, 1977).

*Posibles mecanismos de acción.* Existe gran controversia acerca del mecanismo de acción de los remedios homeopáticos, entre ellos el componente inmunológico: es decir, el producto homeopático se convierte en un antígeno que estimula la respuesta inmune del individuo y genera sus propios anticuerpos para protección (Barros, 1977). Se asume que la primera línea de defensa monocitos/macrófagos

ligan al complejo mayor de histocompatibilidad y se hacen reconocibles a los linfocitos y se convierten en Th3 reguladoras y favorecen la formación de inmunoglobulinas (Ballester, 1999). Esta teoría sólo se puede aplicar para diluciones que van desde la 1 CH hasta la 14 CH porque de ahí en adelante ya no existe presencia de principio activo (Gebauer, 2002).

Otra teoría admitida son las propiedades físicas y electromagnéticas del agua que permiten tener memoria de un principio, aunque se encuentre en altas diluciones, sin embargo, este principio no ha sido demostrado más que admitiendo que las sucesiones están por debajo del número de Avogadro (Calleja, 2002).

Por otra parte, la medicina tradicional basada en la herbolaria se ha pasado entre generaciones y se han hecho pocos estudios de la actividad real de las plantas. En este sentido, se debe combinar la opinión popular con los datos reportados de componentes de plantas estudiadas; la clasificación del uso de una planta se divide en cuatro niveles (Schillhorn van Veen, 1997; Mathias, 2004):

1. Nivel mínimo: No existe información de la planta a estudiar.
2. Bajo nivel: No existe información de la planta como tal, sino de 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 y de su eficacia.
4. De alto nivel: Si la etnobotánica y datos farmacológicos son consistentes con el uso popular de la planta, su uso se clasifica en el nivel más alto de validez y es considerado eficaz.

Por medio de un estudio transdisciplinario, pues en su marco teórico-práctico se busca instaurar vínculos de las partes con el todo, Lans y col. (2007) mencionan que *Artemisia cina*, *A. vulgaris*, *A. annua*, *Echinacea purpurea* y la *Mentha piperita* poseen efecto antihelmíntico para su uso en medicina etnoveterinaria.

Lans (2011) revisó plantas utilizadas como antihelmínticos en pequeños rumiantes como el ajo, la cebolla, menta, nueces, eneldo y perejil, todo utilizado para parasitismo gastrointestinal. Van der Gaag y col. (2005) y Lans (2011) muestran que *Artemisia* spp. se utiliza para el tratamiento de los animales infectados con parásitos en sangre, tales como *Plasmodium* sp. y *Trypanosoma* sp.

Por su parte, Bhakuni y col. (2011) y Ferreira y Janick (2009) mostraron que después del aislamiento de diferentes partes de la planta, los compuestos responsables de la actividad de *A. annua* (planta de la misma familia que *A. cina*): son los sesquiterpenoides, flavonoides, cumarinas, triterpenoides, compuestos esteroides, fenoles, purinas, lípidos y alifáticos, que confieren una alta actividad antioxidante. Entre esos metabolitos, la artemisinina (qinghaosu: medicamento antimalárico de origen chino), una lactona sesquiterpena que es considerada como el principal componente activo de la planta (Klayman, 1985), contiene el grupo peróxido esencial para su actividad. Esa lactona es fácilmente metabolizada formando dihidroartemisinina, su principal derivado con mayor actividad (Van Agtmael y col., 1999). De acuerdo a lo informado por Cala (2010), otros derivados de artemisinina, con estructura bastante semejante, como la deoxiartemisinina son completamente inactivos.

El nivel de concentración de artemisinina en la planta puede variar dependiendo de las condiciones de cultivo, variación estacional y geográfica. En general artemisinina está presente entre el 0.01 y 0.4% en hojas y flores de la planta seca (Van Agtmael y col., 1999). La artemisinina es considerada una potente droga antimalárica contra *Plasmodium falciparum* y otros parásitos causantes de malaria humana resistentes a cloroquina y quinina (Heppner y Ballou, 1998; Cala, 2010).

Avalando la actividad antihelmíntica, Iqbal y col. (2004) observaron que en ovinos con una infección mixta por nematodos gastroentéricos (*H. contortus*, *Teladorsagia* spp.) hubo una reducción del 67.2% en la excreción de huevos a los 14 días después de haber recibido un extracto acuoso de *A. brevifolia* en dosis de 3.0 g/kg

de peso vivo (pv). En evaluaciones *in vitro* sobre adultos de *H. contortus*, Iqbal y col. (2004) verificaron una parálisis completa y mortalidad seis horas después de la exposición de los extractos acuosos y metanólicos de *A. brevifolia*. En 2009 Tariq y col. mostraron la eficacia antihelmíntica del extracto bruto acuoso y extracto bruto etanólico de las partes aéreas de *A. absinthium*, contra nematodos gastrointestinales en ovinos. Asimismo, con otra prueba *in vitro* observaron un 73.6% y 94.7% de inhibición de la motilidad de adultos de *H. contortus* para los dos extractos, respectivamente. Constataron que el extracto etanólico es tan eficaz como el albendazol, hubo una reducción del 90.5% en la eliminación de huevos en las heces de ovinos, con una dosis de 2.0 g/kg pv a los 15 días postratamiento. A la dosis de 1.0 g/kg pv la reducción fue de 82.8% en el mismo periodo postratamiento, demostrando que el extracto bruto acuoso tiene una menor actividad en comparación con el extracto bruto etanólico con las mismas dosis, con una máxima eficacia en la reducción de huevos por gramo en heces de 80.5%.

Según Golenser y col. (2006), los mecanismos de acción atribuidos a la artemisinina incluyen interferencia en las proteínas de transporte en la función mitocondrial del parásito, modulación de la función inmune del hospedador e inhibición de la angiogénesis.

El estudio farmacocinético de la artemisinina en caprinos realizado por Cala (2010) muestra que la dihidroartemisinina es el principal metabolito activo de la artemisinina, ésta es detectada en el plasma cuatro horas después de la administración oral de la dosis de 23 mg de artemisinina/kg pv, con un pico 12 horas después. En las heces, la concentración no absorbida de artemisinina en las primeras 24 horas fue de 2.4 µg/g y disminuyó rápidamente 30 horas después. Se observó que la mayor parte de la artemisinina fue eliminada en las heces: este hecho probablemente impidió que la artemisinina administrada por vía oral lograra los niveles sanguíneos deseados.

La administración de dihidroartemisinina por vía oral a las dosis de 10, 20 y 30 mg/kg pv en conejos y 20 mg/kg de peso vivo en perros, no presentó toxicidad en ninguno de los experimentos (Zhao y Song, 1990). Boareto y col. (2008) mostraron el efecto de artemisinina en dosis crecientes de 7.3 y 70 mg/kg pv/día sobre diferentes períodos de la gestación en ratas *Wistar* (7 a 13 y de 14 a 20 días), se observó la toxicidad para todos los periodos de tratamiento, con menos sensibilidad en estadios más avanzados de gestación. A dosis de 35 e 75 mg/kg causaban porcentajes elevados de pérdidas después de la implantación, se concluyó que la administración oral de la artemisinina puede afectar estos estadios y el propio desarrollo gestacional en ratas. Así muestra que la toxicidad y la eficacia de la artemisinina y de dihidroartemisinina dependen del tiempo de exposición y de su concentración en sangre (Zhao y Song, 1990; Boareto y col, 2008).

Normas Mexicanas para la administración de herbolarios y homeopáticos.

La norma Oficial Mexicana NOM-012-ZOO-1993 rige las especificaciones para la regulación de productos químicos, farmacéuticos, biológicos y alimenticios para uso en animales o consumo por estos.

## **Justificación.**



El panorama actual de resistencia antihelmíntica en ovinos, mostrada por varios autores desde 1990 en México a diferentes familias de bencimidazoles, lactonas macrocíclicas, levamisol, closantel impiden el control eficaz de las nematodiasis gastroentéricas.

Este problema se ha tratado de mitigar con la investigación y uso in vitro e in vivo de moléculas de origen vegetal como las plantas: derivado de ellas: flavonoides, cumarinas, terpenoides; recurriendo también a plantas de medicina tradicional: epazote, *Artemisia mexicana*, papaya; minerales: como partículas de cobre; depredadores naturales como hongos nematófagos (*Arthrobotrys oligospora*., *Duddingtonia flagrans*), nematodos caníbales como Dorylaimidos, Monónquidos y Diplogastéridos, bacterias antagonistas de nematodos (*Bacillus thuringiensis*, *Pasteuria penetrans*).

Debido a esta panorámica el uso de la homeopatía: concebida como medicina tradicional y extractos en diferentes solventes es indispensable. Este trabajo mostrará el efecto de *Artemisia cina* en preparación homeopática como antihelmíntico sobre huevos, larvas y adultos observando de manera completa la eficacia sobre todos los estadios de desarrollo del parásito mas importante en producciones ovinas: *Haemonchus contortus*.

Además se realizará el extracto etanólico de *Artemisia cina* y se fraccionará en moléculas, para determinar cuál es eficaz sobre huevos y larvas de *Haemonchus contortus*, abriendo un panorama de posibles moléculas puras antihelmínticas con eficacia mínima del 80%.

## **Hipótesis de investigación.**

Existe efecto antihelmíntico de *Artemisia cina* en extracto etanólico y en preparación homeopática 30CH a infecciones por *Haemonchus contortus* en ovinos.

## Objetivos de investigación.

Objetivo general.

Evaluar el efecto antiparasitario de *Artemisia cina* 30 CH y *A. cina* en extracto etanólico contra *Haemonchus contortus* (huevos, larvas y adultos) en ovinos.

Objetivos específicos.

- ✓ Cuantificar artemisininas en el extracto etanólico de *A. cina* y en el preparado de *A. cina* a la 30CH.
- ✓ Fraccionar el extracto etanólico de *A. cina* para obtener moléculas puras.
- ✓ Evaluar la eficacia de *A. cina* 30CH y de las fracciones del extracto etanólico de la misma planta en las pruebas *in vitro* de eclosión de huevos, desarrollo larvario, migración larvaria y explantes abomasales con *H. contortus*.
- ✓ Evaluar el efecto de *A. cina* 30 CH en una infección natural con nematodos gastroentéricos (*Haemonchus contortus* y *Teladorsgia* spp.).
- ✓ Evaluar el efecto de *A. cina* 30CH y el extracto etanólico de *A. cina* en una infección controlada con adultos de *H. contortus*.

## **Materiales y métodos**

Localización.

Los experimentos se llevaron a cabo en los Laboratorios 3 y 5 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, además en el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán.

## **Experimento I: Caracterización bioquímica de *Artemisia cina*.**

El producto homeopático *Artemisia cina* 30CH fue caracterizado bioquímicamente para determinar la presencia de posibles proteínas o fracciones con potencial antihelmíntico. A continuación se describen las técnicas realizadas.

### **Materiales y métodos.**

#### **Determinación de metabolitos de *A. cina*.**

Se utilizaron cuatro técnicas:

##### Técnica de espectrofotometría infrarrojo cercano (Near InfraRed, NIR).

La técnica de NIR, puede mostrar diversas bandas de moléculas comprendidas entre 700 y 3,500 nm, La técnica de NIR, se utiliza para la determinación de moléculas en agua, alcoholes, aminas e hidrocarburos.

En el presente estudio, se tomaron muestras de *A. cina* 30CH en el contenedor del espectroscopio y se colocó en el rayo de infrarrojo cercano NIR (FOS NIR SYSTEM modelo 6500 II), se utilizó un software (Vision, 3.0) para analizar las siguientes muestras: agua, alcohol, *A. cina* 30CH, se determinaron las bandas de diferencias a nivel de 270 y 290 nm y se compararon con los metabolitos notificados de artemisininas a 270 nm (López y col., 2009).

##### Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas es una técnica que detecta bandas a muy baja longitud de onda desde 0 a 400 nm. Determina estructuras orgánicas, además de ello, obtiene iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos los iones, se separan de acuerdo con su masa y su carga. Una imagen de espectrometría de masas es una información bidimensional que representa un

parámetro relacionado con la abundancia de los diferentes tipos de iones en función de la relación masa/carga de cada uno.

El extracto etanólico, la presentación homeopática y las fracciones obtenidas de *A. cina* se mezclaron con un vehículo de ácido fórmico y metanol grado HPLC (High Performance Liquid Chromatography- fase reversa) para determinar la presencia de artemisininas, se colocaron en el espectrómetro de masas bajo las siguientes condiciones, velocidad de cono de 70, Sm (Mn 2\*0.75), además se realizó barrido desde 20 hasta 400 m/z.

#### Determinación de proteínas de *Artemisia cina*.

Gel de Poliacrilamida para Electroforesis con SDS- PAGE-SDS.

La confirmación de las posibles proteínas contenidas en el extracto de *A. cina* se realizó en geles de poliacrilamida al 5% y 12% con duodecil sulfóxido (agente reductor, SDS) al 10%. Los geles fueron visualizados con azul Coomasie (Sigma-Aldricj, St Louis Missouri, USA).

Se analizaron muestras control y de *A. cina* a las concentraciones de 5CH, 10CH, 15CH, 20CH, 25CH y 30CH.

Estimación de proteínas por el método de Bradford.

La cuantificación de proteínas de *A. cina* se realizó utilizando la técnica de Bradford (1976). Se determinó la concentración de proteína a las muestras control con albúmina y muestras de *A. cina* a las concentraciones de 5CH, 10CH, 15CH, 20CH, 25CH y 30CH.

#### Análisis estadístico.

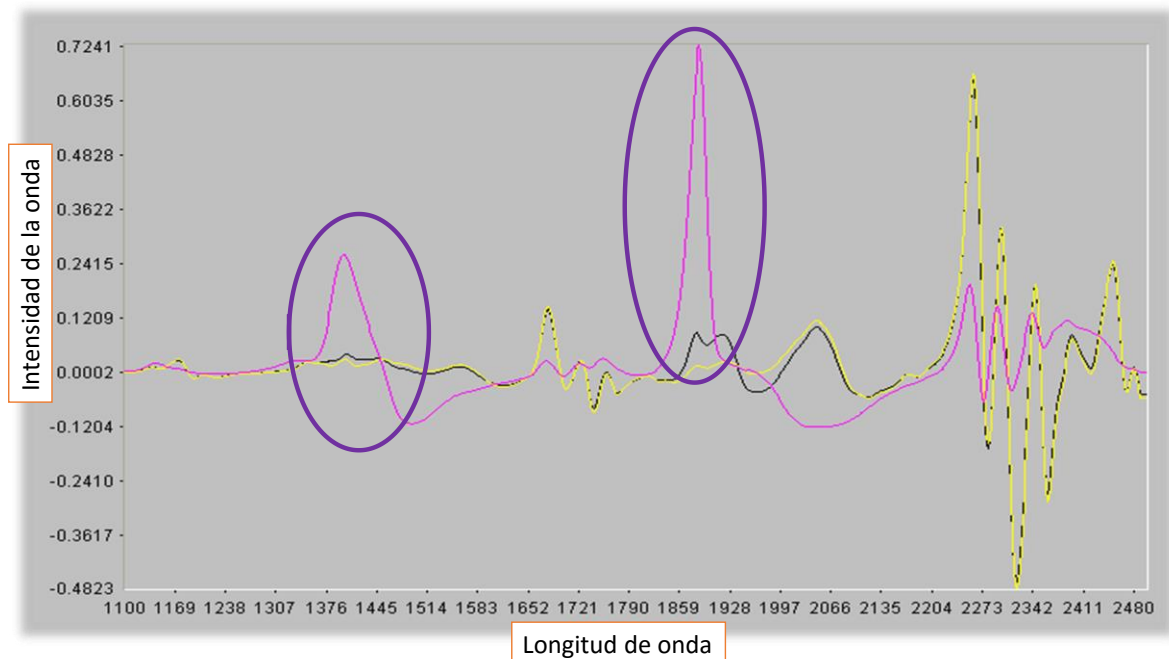
Se realizó una regresión lineal para el ensayo de Bradford.

## **Resultados y discusión.**

En el espectroscopio de infrarrojo cercano existieron bandas de diferencia a la altura de 1,790 a 1,859 nm de *A. cina*, indicativo de una diferencia composicional, de igual manera ocurrió a 1,376 y 1,445 (círculos morados en la fig. 1)

Se obtuvo un espectro con una banda a 1,859 nm con alta intensidad (0.72), este espectro es parecido al agua, lo cual muestra la memoria que tienen los compuestos con el agua y el planteamiento homeopático de diluciones (Rodríguez, 2001). Las bandas de diferencias denotadas con círculos en morado mostraron las diferencias entre el agua, el alcohol al 96% y la presentación homeopática de *A. cina* a la 30CH. Estos hallazgos contradicen lo que se propone en la doctrina homeopática, donde se afirma que a diluciones mayores de 12CH ya no se encuentra rastro de moléculas. Sin embargo, la teoría de memoria del agua demostró lo contrario (Eizayaga, 2012).

Figura 1. Diferencia conformacional entre moléculas de *Artemisia cina* 30CH y agua.

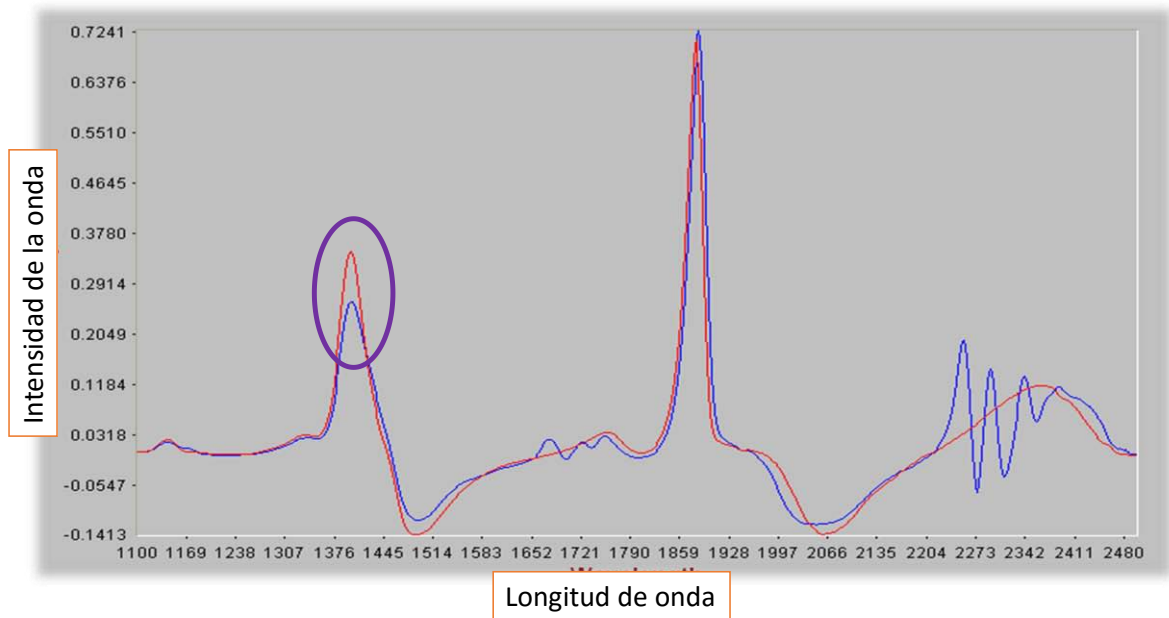


Los círculos en color morado muestran las diferencias conformacionales, el color rosa señala a la *A. cina* 30 CH, el negro al agua y el color amarillo las moléculas que conforman el alcohol al 96%.

Las gráficas obtenidas mostraron una diferencia a 2,204 hasta 2,411 nm respecto al agua, lo cual reafirma lo anterior, existe una diferencia de bandas y se puede encontrar un principio activo (fig. 2). La banda que rodea el círculo morado muestra una intensidad de onda menor sobre el espectro del agua, esto indica que a la 30 CH se encontró un espectro, se asume que las moléculas de *A. cina* 30 CH se combinaron con las moléculas de agua y por ello las bandas sobrepuestas.



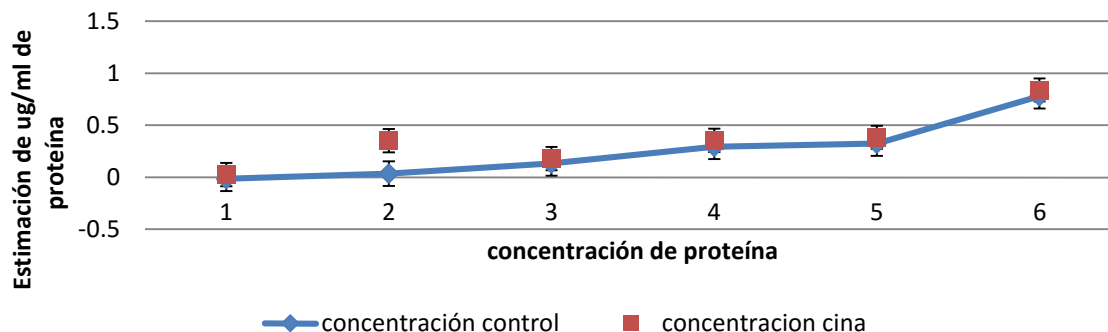
Figura 2. Diferencia conformacional entre moléculas de *Artemisia cina* 30CH y agua en primera derivada.



El círculo en morado señala las diferencias conformacionales entre los dos compuestos. La línea azul corresponde a *A. cina* 30 CH y la roja al agua.

En la electroforesis (PAGE-SDS): Con el objeto de identificar la posible presencia de proteínas derivadas de los compuestos homeopáticos en estudio, se realizó un análisis por PAGE- SDS. La muestra de *A. cina*: no se mostró bandas de proteína de bajo o alto peso molecular. Posiblemente los principios de un compuesto homeopático conformado por alcoholes, degradan las proteínas de *A. cina*, las cuales quedaron por debajo del número de Avogadro (en un mol de una sustancia cualquiera, su dimensión es de  $6.022 \cdot 10^{23}$ ) (Muñoz y col., 2003). Además de ello, el concentrado proteico podría haber estado en muy baja proporción, por lo que se decidió realizar el ensayo de Bradford donde se encontró una baja concentración de proteína a la 10CH (figura 3), que concuerda con los principios homeopáticos, donde un compuesto tiene rastros por debajo de 12CH (Montserrat, 2013).

**Figura 3. Estimación de proteína de *Artemisia cina* 30 CH por el método de Bradford.**



Por medio de espectrometría de masas se encontró la presencia de artemisininas en las fracciones obtenidas del extracto etanólico (anexo 3). Los picos encontrados en el barrido de artemisininas *Sigma*®, concordaron con las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3h, Ac3i, Ac4a, señaladas al igual con flecha roja a nivel de 244m/z.

Los barridos obtenidos con el homeopático de *A. cina* 30 CH mostraron que a 286m/z tuvieron parecido con el peso molecular reportado de 287 g/mol, sin embargo, cuando se realizó el barrido de artemisininas *Sigma*® no se observó la misma banda de diferencia.

La fracción **Ac3a** mostró dos picos altos de los cuales uno coincidió con las artemisininas *Sigma*® a 244.95m/z, de igual manera, la fracción Ac3b tuvo un espectro parecido.

La fracción **Ac3i** mostró un pico congruente con las artemisininas *Sigma*® a 244.89 m/z, sin embargo, tuvo otros compuestos en gran cantidad que no se determinaron.

La **Ac4a** por cromatografía mostró tener artemisininas, sin embargo, se observó que al compararla con artemisininas *Sigma*® obtuvo un pico a 244m/z donde coincidieron, pero el pico observado a 261.29m/z no tuvo artemisininas *Sigma*®, además de ello, esta fracción tuvo un pico a 277m/z, una molécula aún desconocida.

Los resultados obtenidos en el infrarrojo cercano muestran el principio de quimiometría (García y col., 2013) que a nivel de 2,204 existe una combinación de bandas de grupos funcionales con enlaces N-H (CONHR), enlace RNH<sub>2</sub> que pueden ser aminas o amidas, enlace C=O (CHO) que se atribuyen a aldehídos, cetonas, ácidos carboxílicos y ésteres, así como un enlace CH, CH<sub>2</sub> Y CH<sub>3</sub> que se puede inferir como alcano, alqueno, alquino. Estos resultados se aproximan a la composición molecular del principio activo, sin embargo, no es un resultado definitivo. Estas bandas (figura 1 y 2), según lo reportado por Sun (2009), se calculan a partir de las masas de los átomos y de la constante fuerza del enlace entre ellos. La diferencia existente en 1,307 a 1,445 probablemente se observó a diferencias entre grupos nitroderivados.

La concentración de proteína en la muestra de *A. cina* 10 CH concuerda con lo reportado por Eizayaga (2012). Las concentraciones homeopáticas hasta la 12 CH detectan metabolitos proteicos, de ahí en adelante ya no es detectable, sin embargo, al realizar el barrido con espectrómetro de masas se observan picos que concuerdan con la notificación de Alejos (2011) donde *Artemisia annua*, planta de la misma familia que *A. cina* (Asteraceae) posee el principio activo reportado como antihelmíntico, las artemisininas, que tienen un peso molecular de 287 m/z, así que se realizó un barrido de 280 a 290 m/z.

Asimismo, no se observaron concentraciones de proteína en los geles de poliacrilamida, estos hallazgos concuerdan con lo reportado por Rodríguez (2001) quien menciona que un medicamento homeopático mantiene su memoria en el agua, mas no tiene como tal un principio activo medible. Además Eizayaga (2012) afirma que a concentraciones superiores a 12CH ya no se encuentra rastro del principio activo. El peso molecular de las artemisininas es de 287 g/mol (Kim y col., 2014), se encontró en el producto homeopático y en el extracto etanólico de *A. cina*, a diferencia de las fracciones se obtuvo un derivado sintético de menor peso molecular que coincidió con las artemisininas sintéticas.

Los picos que se observan a nivel de 244m/z y 261m/z en los espectros de masas, se atribuyen a artemisininas, pero la presencia y concentración de ellos parece determinar la actividad letal *in vitro*. De esta manera, cuando el pico de 261 es más alto que el 244 la fracción posee un efecto letal, pero cuando es opuesto, la fracción ya no es activa (Trigg, 2011).

Las artemisininas encontradas en este estudio con el extracto etanólico y en el homeopático de *A. cina* fueron reportadas en *A. annua* en estudios realizados por Yuan y col. (2014) quienes afirman que la molécula de artemisinina puede encontrarse de forma diferente, es decir, como alcohol artemisínico, aldehído artemisínico, aldehído dihidroartemisínico, ácido dihidroartemisínico o ácido artemisínico y cada forma dará un barrido diferente en el espectrómetro de masas. En este estudio no se determinó en qué conformación se presentó y probablemente el solvente utilizado pudo haber cambiado la forma de la molécula y de esta forma, mostró barrido diferente de artemisininas de referencia ante el espectro de masas.

## Experimento II: Fraccionamiento derivado del extracto etanólico de *Artemisia cina* para obtener moléculas puras.

### Materiales y métodos.

La metodología base se realizó siguiendo la descripción de Giang y col. (2013) para el fraccionamiento del extracto etanólico de *A. japonica*. Anexo 5.

### Resultados y discusión.

Se comparó artemisininas comercial, como referencia con el extracto etanólico. Los resultados muestran que la combinación hexano y acetona en proporciones de 80:20 siendo éste el más eficaz.

De la partición líquido-líquido (combinación de dos moléculas inmiscibles, metanol y hexano, de forma que las moléculas polares se mezclan con el metanol y las no polares con el hexano) se obtuvieron dos fracciones, hexánica (Ac1a) y metanólica (Ac1b). De la fracción hexánica se obtuvieron a su vez, cuatro fracciones (Ac2a, Ac2b, Ac3b y Ac4b) por columna de VLC (columna de cromatografía al vacío) con tonsil; de éstas la fracción **Ac2b** se obtuvo rastro de artemisininas por cromatografía en capa fina. Posteriormente se realizó una columna de gravedad obteniéndose así catorce fracciones, identificadas como Ac3a hasta Ac3n (cuadro 1).

Cuadro 1. Subfracciones colectadas de la separación de *Artemisia cina* por columna de gravedad de la fracción Ac2b.

Fracción	Nomenclatura	Peso (mg)
1-14	Ac3a	2.8
15- 41	Ac3b	1.4
42- 44	Ac3c	6.9
45	Ac3d	0.7

46- 49	Ac3e	1.3
50	Ac3f	1.5
51- 53	Ac3g	1.2
54- 55	Ac3h	0.7
56	Ac3i	8.8
57	Ac3j	13
58	Ac3k	27.9
59	Ac3l	8.8
60- 61	Ac3m	3
62	Ac3n	1.6

De esas fracciones, **Ac3k** y **Ac3m** mostraron bandas de artemisinina, se les realizó una placa preparativa, obteniendo con ello cuatro fracciones, **Ac4a**, **Ac4b**, **Ac4c** y **Ac4d**; de ellas **Ac4a** mostró ser artemisinina (cuadro 2).

Cuadro 2. Fracciones de *Artemisia cina* obtenidas por medio de la placa preparativa realizada de la fracción Ac3k y Ac3m.

Fracción	Peso
Ac4a	8.9
Ac4b	17.9
Ac4c	0.1
Ac4d	0.1

De la fracción metanólica (de la partición líquido-líquido) se obtuvieron cinco fracciones (cuadro 3).

Cuadro 3. Fracciones obtenidas de la separación de *Artemisia cina* por medio de partición líquido- líquido en solvente metanólico.

Fracción	Peso (mg)
----------	-----------

Acb2a	1416.8
Acb2b	400.2
Acb2c	1235.6
Acb2d	61.2
Total	9936.3

Se demostró que *A. cina* tiene pequeñas cantidades de artemisininas, como también lo afirma Wang y col. (2014) donde *A. annua* planta de la familia Asteraceae usada en la medicina tradicional china y en su contenido tiene una lactona sesquiterpénica endoperoxida que cual denominaron artemisinina y se le ha prestado gran atención por su efecto antimalárico (Rong Liu y col., 2012). Esta se encuentra en muy pocas cantidades en plantas que crecen en el trópico y subtrópico, sin embargo, no se puede conocer la forma en que se encuentra, ya que según lo reportado por Yuan y col. (2014), la artemisinina puede estar como alcohol artemisínico, aldehído artemisínico, aldehído dihidroartemisínico, ácido dihidroartemisínico o ácido artemisínico; dependiendo su presentación es su actividad. En este estudio no se determinó la forma en que se presentó, sin embargo, se demostró la presencia de este principio.

Se observaron varias bandas de diferente peso molecular que con estudios más detallados como resonancia magnética se pueden dilucidar, sin embargo, según lo descrito por Giang y col. (2013) más de 500 especies del género *Artemisia* contienen gran cantidad de compuestos, entre ellos terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos cafeoilquinas poliacetilenos con variaciones oxidativas o estereoquímicas, que son probablemente los mismos compuestos que se separaron en este trabajo pero que no se dilucidaron.

La metodología empleada mostró ser óptima con hexano:metanol, separándose la mayor cantidad de compuestos presentes por polaridad, no se identificaron los otros componentes en la planta. En un estudio similar, Giang y col. (2013) mostraron que el mejor mecanismo para separar los compuestos de *A. japónica* era con N- hexano,

diclorometano y acetato de etilo, este estudio buscaba separar terpenos isómeros a las artemisininas y por ello su sistema era encaminado a separar mejor los compuestos no polares. Para este estudio, la separación de compuestos polares y no polares (hexano:metanol) permitió determinar en cual fracción se encontraban las artemisininas.

Giang y col. (2013) informaron que las artemisininas se encontraban envueltas en otros compuestos a los que ellos denominaron 2, 3 y 7, 8 los cuales los denominaron mezclas irresolubles. Este trabajo demostró artemisininas por medio de cromatografía en capa fina artemisininas no ligadas a otro compuesto, ya que la formación de bandas que se encontraron fueron nítidas y en la placa preparativa el compuesto se separó de forma fácil y rápida.

Los compuestos clorofílicos del extracto etanólico se retiraron por medio de tónsil por una columna de gravedad al vacío, este proceso es rápido y facilita la separación, además de ello no altera los compuestos presentes en el extracto. La separación propuesta por Megdiche y col. (2015) de los compuestos clorofílicos y los compuestos grasos conlleva adicionar 1,000ml de éter de petróleo. Este proceso puede cambiar la conformación de algunos compuestos. Esos autores colectaron el restante en metanol por 24 horas a temperatura ambiente, en este trabajo se recolectó en hexano y se dejó secar a temperatura ambiente hasta liofilizar. El uso de cualquiera de los dos compuestos es válido, como lo reporta Meia y col. (2014), el hexano y el metanol pueden colectar muestras, el uso depende de la polaridad de la molécula con la que se esté trabajando.



## **Experimento III: Evaluación del efecto letal de *Artemisia cina* 30 CH y de las fracciones del extracto etanólico en la inhibición de la eclosión de huevos, desarrollo larvario, migración larvaria y explantes abomasales de *Haemonchus contortus*.**

### **Material y métodos.**

Las pruebas *in vitro* o bioensayos se realizaron siguiendo los protocolos citados por Coles y col. (1992), Zhu y col. (2013), Rialch y col. (2013) y Carvalho y col. (2012). La obtención de material biológico derivado de *Haemonchus contortus* se describe a continuación:

Larvas y huevos de *Haemonchus contortus*.

Los huevos de *H. contortus* se obtuvieron por vía rectal de las heces de un cordero donador, infectado experimentalmente con 5,000 L<sub>3</sub>. Se colectaron muestras para el cultivo de huevos y obtención de las L<sub>3</sub> a los 21 días posinfección (Van Wyk y Mayhew, 2013). El manejo del cordero se realizó conforme a los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (CICUAE-FESC-UNAM). Esos animales se alojaron en un corral con piso de cemento, se les administró alimento balanceado y tenían acceso al agua *ad libitum*.

Ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (IEH).

Esta técnica se realizó siguiendo las recomendaciones de Coles y col. (1992), Carvalho y col. (2012), Zhu y col. (2013) y Rialch y col. (2013).

Se aplicaron en placas de 96 pozos con tres repeticiones cada una, los tratamientos *Artemisia cina* 30 CH (20 µL), agua (20 µL), albendazol (ABZ) (300 mg/ml), alcohol

etílico (20 µL), sólo huevos 20 µL y las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3e, Ac3h, Ac3k y Ac4b de artemisinina (1 mg/ml de cada una).

La metodología empleada se puede ver con detalle en el anexo 4.

Ensayo de desarrollo larvario (EDL).

La técnica se realizó siguiendo la descripción de Costa y col. (2008), Tadesse y col. (2009) y Zhu y col. (2013) (anexo 5).

Se trataron las L<sub>1</sub> de *H. contortus* con *A. cina* 30 CH (20 µL), agua (20 µL), ABZ (300 mg/ml, 20 µL), alcohol al 92% (20 µL) y las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3e, Ac3h, Ac3k y Ac4b de artemisinina (1 mg/ml de cada una). Se Incubaron seis días a 27° C.

Ensayo de inhibición de migración larvaria (LMIA).

La técnica se efectuó de acuerdo a lo descrito por Rothwell y col. (1993), Rabel y col. (1994), Lloyd (2000), Bizimenyera y col. (2006), Hernández y col. (2011) y Zhu (2013) (anexo 6).

Se aplicaron los tratamientos con tres repeticiones de *A. cina* 30 CH (20 µL), agua (20 µL), ABZ (300 mg/ml, 20 µL), alcohol etílico (20 µL), sólo huevos (20 µL) y las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3c, Ac3d, Ac3e, Ac3f, Ac3g, Ac3h, Ac3i, Ac3j, Ac3k, Ac3l, Ac3m, Ac4a, Ac4b, Ac4c y Ac4d de artemisinina (0.1 y 1 mg/ml de cada una). Se incuban por tres horas a 28° C.

Ensayo de inhibición de migración larvaria con larvas desnudas (LMIA).

Se empleó la técnica descrita por Rabel y col. (1994) (anexo 7).

Las larvas 3 desnudas de *H. contortus* se expusieron, con tres repeticiones cada una, a *A. cina* 30 CH (20 µL), agua (20 µL), ABZ (300 mg/ml, 20 µL), alcohol etílico al 92%, (20 µL) y las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3e, Ac3h, Ac3k y Ac4b de artemisinina (0.1 y 1 mg/ml de cada una).

Explantes abomasales.

Se realizó según la técnica descrita por Jackson y col. (2004) (anexo 8).

Se colocaron alrededor de 2,500 larvas 3 de *H. contortus* en tubos y se distribuyeron así: testigo, levamisol (7.5 mg/ml), artemisinina Sigma® (1 mg/ml), Ac3k (1 mg/ml), Ac3b (1 mg/ml), Ac3a (1 mg/ml), Ac3h (1 mg/ml), Ac3i (1 mg/ml), Ac4b (1 mg/ml).

Análisis estadístico.

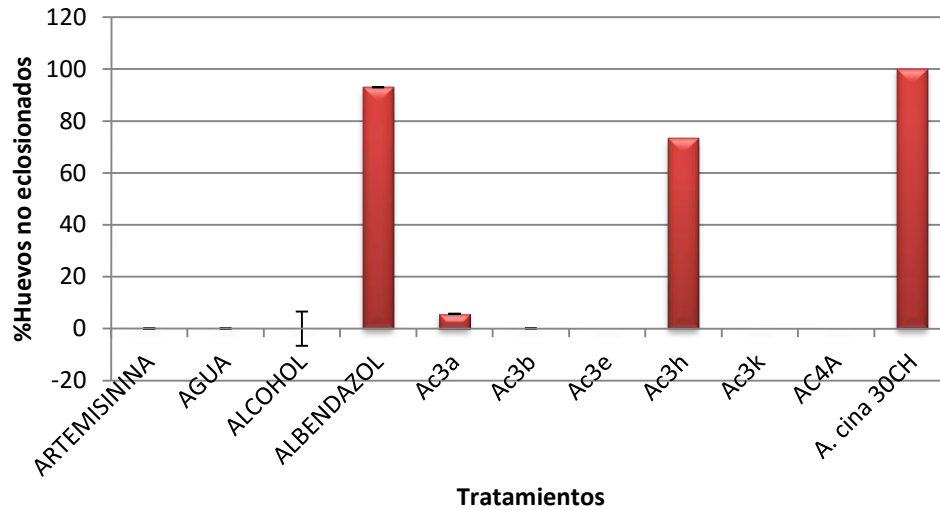
Se realizó un ANOVA multifactorial por medio del programa Statgraphics® para cada experimento.

## **Resultados y discusión.**

A través del ensayo de inhibición de la eclosión de huevos (IEH) se obtuvo un efecto letal del 91.6% con ABZ y del 72.9% con la *A. cina* 30 CH, existiendo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre esos tratamientos. También encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el ABZ y *A. cina* y el agua ( $p < 0.05$ ). Ni el agua: 2.47%; alcohol etílico al 92% con 20.15%.

Al evaluar las seis fracciones de artemisinina mediante la prueba de IEH, se demostró que el efecto letal de la fracción Ac3h fue similar al ABZ ( $p > 0.05$ ) con una letalidad de 72.7% (fig.6).

**Figura 4. Inhibición de *Haemonchus contortus* en el ensayo de eclosión de huevos (IEH) (EEM).**



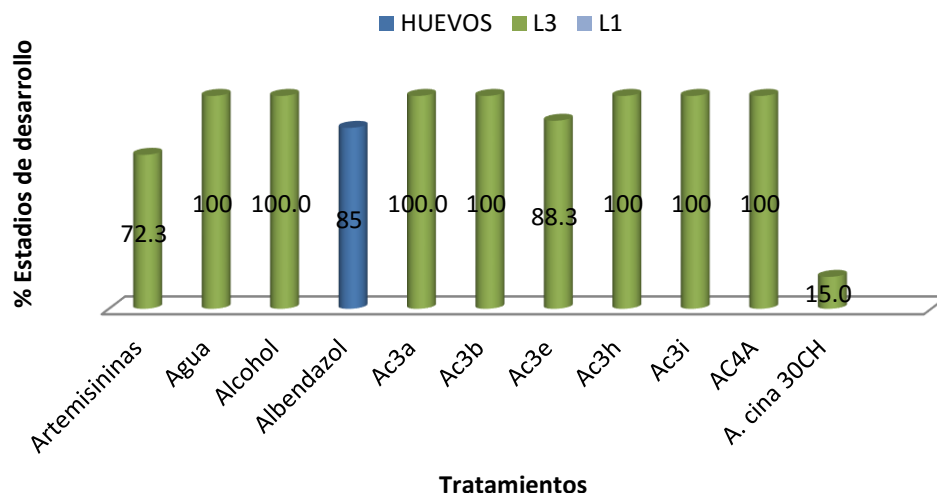
\*, \*\*, \*\*\*Diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ).

Ensayo de desarrollo larvario.

El mejor efecto letal lo tuvo el ABZ con 94.8%, siendo superior ( $p < 0.05$ ) al obtenido con la *A. cina* (76.2%). Ambos fueron diferentes ( $p < 0.05$ ) al alcohol y agua.

En cuanto a las fracciones, se encontró que la artemisinina de *Sigma*® impide el desarrollo larvario sólo se obtuvo un 27.7% de L<sub>1</sub> de *H. contortus*; no hubo un efecto significativo respecto a los testigos controles ( $p > 0.05$ ). La fracción Ac3e no mostró efecto letal ( $p > 0.05$ ), sin embargo, mostró el mismo efecto hallado en las artemisininas. No se encontró efecto letal con las fracciones en este ensayo ( $p > 0.05$ ), pero si se encontró diferencia entre las fracciones y el ABZ ( $p < 0.05$ ).

**Figura 5. Inhibición de *Haemonchus contortus* en el ensayo de desarrollo larvario (IDL). EEM.**



\*Existe diferencia entre los grupos ( $p < 0.05$ ).

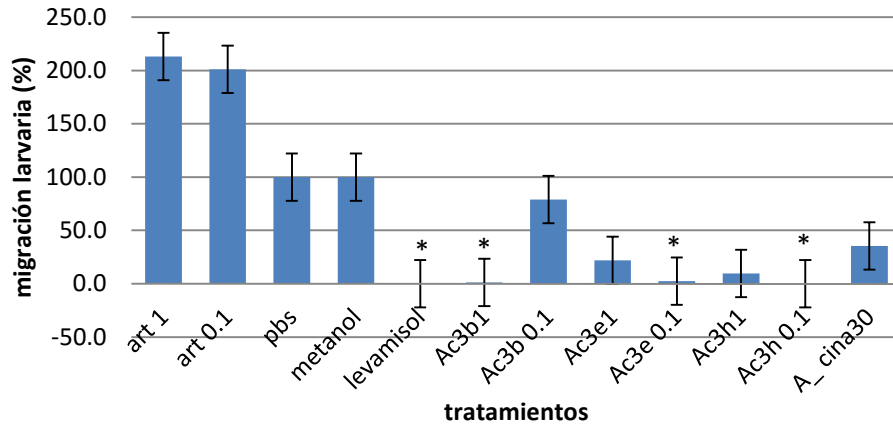
#### Ensayo de migración larvaria.

No se encontró migración de las L<sub>3</sub> de *H. contortus* tres horas después del tratamiento con levamisol, hubo un efecto letal evidente y se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). En cuanto a *A. cina* se encontró que el 35.5% de las larvas migraron ( $p < 0.05$ ). Los testigos como el agua mostraron una migración de 92% y con PBS una migración de 94.1%, no se encontraron diferencias significativas entre ellos ( $p > 0.05$ ).

Las fracciones de artemisinina (Ac3h, Ac3b, Ac3e y Ac3a) inhibieron la migración larvaria ( $p > 0.05$ ).

No hubo diferencias entre los controles de agua, alcohol y PBS ( $p > 0.05$ ) (fig. 8).

**Figura 6. Inhibición de *Haemonchus contortus* en el ensayo de migración larvaria (IML). EEM.**

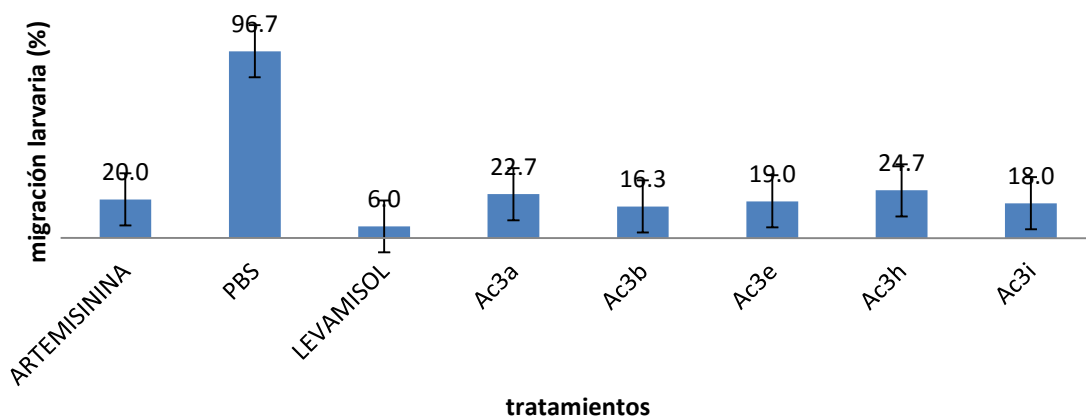


\*Existe diferencia significativa entre grupos ( $p < 0.05$ ).

Ensayo de migración larvaria con L<sub>3</sub> sin vaina.

Se observó un efecto letal de todas las fracciones ( $p < 0.05$ ), se observó inhibición de la migración con artemisininas. Las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3e, Ac3h y Ac3i mostraron inhibición de la migración larvaria ( $p > 0.05$ ) y no se encontró diferencia de estas con levamisol ( $p > 0.05$ ).

**Figura 7. Inhibición de *Haemonchus contortus* en el ensayo de migración con L<sub>3</sub> desnudas. EEM.**

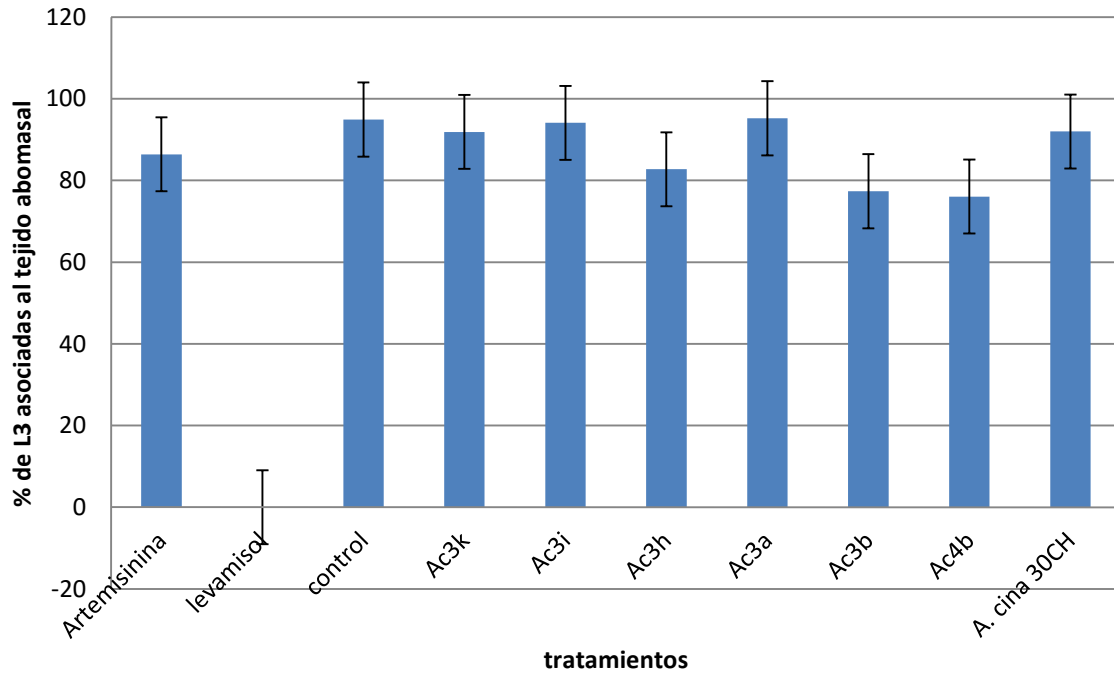


\*diferencias significativas entre grupos con  $p < 0.05$ .

Explantos abomasales.

Se encontraron diferencias entre levamisol y las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3h, Ac3i, Ac3k y Ac4b ( $p < 0.05$ ). No se obtuvieron diferencias significativas entre las fracciones de *A. cina* y artemisinina *Sigma*® ( $p > 0.05$ ). Se encontraron L<sub>3</sub> desnudas de *H. contortus* asociadas al tejido abomasal cuando se trataron con Ac3a, Ac3b, Ac3h, Ac3i, Ac3k y Ac4b. En el caso de levamisol las L<sub>3</sub> no se asociaron al tejido abomasal.

**Figura 8. Penetración de larvas 3 de *Haemonchus contortus* en explantes abomasaes.**



Porcentaje de L<sub>3</sub> asociadas al tejido abomasal y error estándar. \*Diferencia significativa (p< 0.05)

El producto homeopático de *A. cina* y ABZ mostraron inhibición de la eclosión de huevos de *H. contortus* en un rango de 90 a 100%. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Akkari y col. (2014) al utilizar *A. campestris* con el mismo ensayo, donde se encontró que la dosis letal 50 para el extracto etanólico fue de 0.8 mg/mL, en este estudio se demostró que la dosis letal es 1 mg/mL. La fracción Ac3h obtenida del extracto etanólico mostró 70% en la inhibición de la eclosión de huevos, estos resultados son pioneros en mostrar el efecto *in vitro* de *A. cina* en presentación homeopática y de las fracciones obtenidas del extracto etanólico. Por su parte, Bashtar y col. (2011) mostraron el efecto directo de *A. cina* en extracto etanólico sobre los adultos del cestodo parásito *Moniezia* sp. Hallazgos complementarios por microscopía electrónica en ese estudio mostraron daños estructurales en el



parásito, compatibles con la afectación estructural de los huevos y larvas de *H. contortus* observados en este ensayo. Esto plantea que *A. cina* puede ser un antihelmíntico con eficacia comprobada *in vitro* para el control de hemoncosis en ovinos.

Las fracciones de *A. cina* obtenidas del extracto etanólico (Ac3h, Ac3b, Ac3e, Ac3a) y el levamisol mostraron inhibición de la migración ( $p < 0.05$ ); de acuerdo a los resultados descritos anteriormente, esas fracciones son artemisininas. Los hallazgos son comparables con los reportados por Bashtar y col. (2011) donde encontraron una eficacia antihelmíntica de *A. cina* entre el 70 y 80%, esto permite afirmar que existe un potencial efecto antiparasitario en la planta.

Las L<sub>3</sub> desnudas de *H. contortus* expuestas a las fracciones de *A. cina*, el levamisol y las artemisininas, mostraron inhibición de la migración larvaria a diferencia de las larvas sin desenvainar. Estos hallazgos hacen suponer que el efecto de artemisinina es a nivel abomasal o en la fase exógena de la larva y coincide con lo reportado por Abolaji y col. (2014) quienes encontraron que las artemisininas retrasan el crecimiento e interfieren con el metabolismo celular a nivel mitocondrial y se puede traducir como una afectación del desarrollo, lo que explicaría la inhibición de la migración en este ensayo. Se propone utilizar dosis más altas como lo sugieren Anthony y col. (2005), para ocasionar un daño evidente sobre las L<sub>3</sub>.

En este estudio sólo se evidenció la eficacia de artemisinina contra las L<sub>3</sub> desnudas de *H. contortus*, en larvas 3 con cutícula y en pruebas de desarrollo larvario no se evidenció.

El daño se mostró en fracciones como la Ac3e, Ac3a, Ac3b y Ac3h de *A. cina* que por su espectrometría de masas tienen concentración de artemisininas junto con otra molécula de más bajo peso molecular. En este estudio no se dilucidaron las moléculas, solamente se determinó su peso molecular para compararlas con el control de artemisininas de Sigma®. Se puede asumir que la falta de actividad de

las artemisininas es por su presentación, ya que dependiendo la conformación de su molécula es más eficaz como lo cita Yuan y col. (2014).

El efecto que se encontró en ensayos *in vitro* con el extracto etanólico de *A. cina* y con las fracciones permite demostrar que la extracción de los metabolitos eficaces puede hacer cambiar la conformación de las moléculas y disminuir su eficacia. Resultados comparables los reporta Domínguez (1979) donde la actividad de las plantas ha sido atribuida a metabolitos secundarios que pueden ser extraídos de la planta sin tratamiento alguno, tal como se obtiene *A. cina* de las hojas de la planta en prefloración, el extracto utilizado sobre las L<sub>3</sub> de *H. contortus* es uno de los ensayos por excelencia para demostrar la eficacia de la misma (Asase y col., 2005). Se han utilizado diferentes concentraciones para evaluar plantas, entre ellos muestran que a una concentración de 1.2 mg/ml del extracto de planta, inhibe el 33% de la migración larval (Alonso-Díaz y col., 2008), en este estudio con *A. cina* y sus fracciones se consiguió una inhibición de la migración larvaria entre el 79 y 100% con las fracciones Ac3b y Ac3e.

Los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la eclosión de huevos son comparables con los encontrados por Costa y col. (2008) al utilizar *Azaridachta indica* donde demostraron que es necesario 1.8 mg/ml de extracto etanólico de la planta para inhibir el 95% de la eclosión de huevos; en este estudio fue necesario 1 mg/ml para inhibir la eclosión de huevos de *H. contortus* con la fracción Ac3h y de *A. cina* 30 CH, esto confirma que el producto homeopático es eficaz para inhibir la eclosión; su concentración, al compararla con un estándar como el ABZ que inhibe el 100% de eclosión, muestra que puede ser una opción antihelmíntica eficaz. El ABZ es una sustancia pura, mientras que el homeopático de *A. cina* 30 CH y las fracciones tienen muchos compuestos químicos que contienen el componente activo con acción ovicida, además, a diferencia del ABZ, la *A. cina* es un producto natural que puede crecer localmente y se obtiene a bajo costo. En general, el extracto de una planta tiene pocas concentraciones de componentes activos y un gran número de componentes promisorios (Rates, 2001). La eclosión de huevos

pudo haber sido inhibida por el homeopático debido a que sus componentes activos se encuentran en baja concentración, pero al dinamizarse, su potencia incrementa y se hace más eficaz (Avello y col., 2009).

Se ha demostrado que la planta *A. cina* posee entre sus componentes algunos terpenoides, Júnior (2003) reportó la actividad insecticida de éstos, además se ven envueltos en la inhibición o retraso del crecimiento, daño en la maduración y reducción de la capacidad reproductiva o el apetito, hallazgos que coinciden con lo reportado en este trabajo con el ensayo de inhibición de la eclosión de huevos e inhibición de la migración larvaria.

En este experimento, el levamisol mostró una inhibición completa de la L<sub>3</sub> de *H. contortus* para penetrar al tejido. En el caso de las fracciones de *A. cina* (Ac3a, Ac3b, Ac3h, Ac3i, Ac3k y Ac4b) y la artemisinina comercial (*Sigma- Aldrich*®) mostraron una asociación no significativa ( $p > 0.05$ ) al tejido abomasal. Jackson y col. (2004) encontraron una gran asociación de larvas a la región antro pilórica en condiciones normales, similar al testigo de este estudio y a las fracciones de las plantas. Es poco conocido el mecanismo de acción de las artemisininas, Yuan y col. (2014) muestran que las artemisininas pueden estar como alcohol artemisínico, aldehído artemisínico, aldehído dihidroartemisínico, ácido dihidroartemisínico o ácido artemisínico, de esta forma, dependiendo la organización de la molécula es su actividad y en el caso de las fracciones se determinó que eran artemisininas por cromatografía en capa fina, sin embargo, no se conoció su presentación química; queda la inquietud de qué tipo de presentación tenían las artemisininas para mejorar su actividad en este experimento.

A través de los explantes abomasales se evalúa la asociación de L<sub>3</sub> de nematodos gástricos al tejido abomasal (Jackson y col., 2004), dicha asociación es un proceso importante en el establecimiento de la infección. La primera fase está representada por el establecimiento larval donde se ocurren dos pasos esenciales, el desnudamiento y la penetración en la mucosa abomasal. Esta última es la

asociación inicial de la larva desnuda al tejido abomasal con la mucosa y posterior invasión de la misma (Min y Hart, 2002; Hoste y col., 2006).

Se ha demostrado que las larvas de nematodos gastroentéricos de rumiantes expuestas a taninos condensados, disminuyen su capacidad de asociarse al tejido en explantes abomasales (Brunet y col., 2008; Paolini y col., 2005), lo que no ocurrió con este estudio, por lo tanto, se descarta que su mecanismo de acción sea inhibiendo la penetración larval.

## **Experimento IV: Determinación del efecto de *Artemisia cina* 30 CH en una infección natural con nematodos gastroentéricos.**

### **Materiales y métodos.**

#### **Localización.**

Este experimento se realizó en una unidad de producción ovina ubicada en el municipio de Mixquiahuala de Juárez, Hidalgo, México. Esta localidad se encuentra a una altura sobre el nivel del mar de 2,100m, posee un clima semiseco, con temperatura media anual de 16.6°C. El régimen de lluvias se registra entre los meses de mayo y octubre con una precipitación media de 500 mm anuales (Ayuntamiento de Mixquiahuala de Juárez, 2013).

#### **Animales.**

Se utilizaron 30 corderos Suffolk (16 machos y 14 hembras) de tres meses de edad, con veinte días de destete, identificados con arete metálico, positivos a nematodos gastroentéricos (NGE).

Los animales fueron mantenidos en condiciones de semi-estabulación, durante la noche permanecían en el corral y salían a pastorear de la 10:00 a 18:00 horas. Pastoreaban en áreas después de la cosecha de alfalfa y maíz. No existió ningún tipo de manejo sanitario previo. Los corrales eran de madera, con piso de tierra, con una superficie de 30 m<sup>2</sup> y una altura de pared de un metro y del techo a dos metros altura.

## **Diseño experimental.**

Previo a los tratamientos se realizó una distribución en tres grupos homogéneos de los individuos con base a la eliminación de huevos en heces por medio del programa Statgraphics.

Cada uno de los grupos recibió el siguiente tratamiento:

Grupo A: Se administró *Artemisia cina* 30CH® (Laboratorios Millenium) por vía oral, una sola dosis, 1ml por cada 5 kg de peso vivo (pv) (Cavalcanti, 2008).

Grupo B: Albendazol (*Albendaphorte 2.5% Co*®, Laboratorio Salud y Bienestar Animal) por vía oral, 7.5mg/kg pv.

Grupo C: Testigo, no recibió tratamiento.

A los 0, 7, 14 y 28 días después del tratamiento, a todos los animales se les tomó una muestra de heces y sangre, así como el registro de su peso corporal e índice del sistema FAMACHA.

Las variables de respuesta fueron la dinámica de la eliminación de huevos en la materia fecal, cambio de peso corporal, índice del sistema FAMACHA y volumen del paquete celular.

## **Recolección de muestras.**

Las muestras de heces fueron tomadas del recto utilizando bolsas plásticas, se identificaron individualmente con el número del arete de cada animal, se mantuvieron y transportaron al laboratorio en refrigeración (3°C). En la mañana, antes que los animales salieran a pastorear se obtuvieron las muestras de sangre (5 ml) por medio de venopunción yugular se, utilizando tubos al vacío con EDTA

como anticoagulante. Se trasladaron al laboratorio el mismo día bajo refrigeración (3° C).

### **Procesamiento de las muestras.**

Las muestras de heces se procesaron por medio de la técnica de Mc Máster, técnica modificada para ovinos (Coles, 1992) para conocer la cantidad de huevos de NGE por gramo de heces. El tiempo que transcurrió entre la toma de muestra y el análisis fue de doce horas. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 3°C desde la toma hasta el análisis.

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

### **Registro del peso vivo.**

El peso vivo se calculó con una cinta métrica® (*Ovni*, Inalmet) alrededor del tórax de cada cordero y el valor se correlacionó con lo reportado por Afolayan y col. (2006) para obtener la correlación con el peso vivo.

Se calculó la ganancia diaria de peso según lo descrito por Silva (2006).

### **Índice del sistema FAMACHA.**

Se evaluó el grado de anemia de cada una de las ovejas seleccionadas a través de la asignación del índice correspondiente de acuerdo a la tarjeta del sistema FAMACHA tomando en cuenta el color de la mucosa ocular. La aplicación de ese método se hizo de acuerdo a las recomendaciones expuestas en el folleto informativo de la tarjeta FAMACHA elaborado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Pretoria, el Instituto Veterinario de Onderstepoort, y La Asociación Veterinaria Sudafricana (Bath, 2004).

## **Análisis estadístico.**

Los datos del conteo de huevos por gramo de heces (hgh) se transformaron logarítmicamente ( $\log. 10 \text{ hgh}+10$ ) para estabilizar la varianza y analizarlos estadísticamente.

Para la comparación de las medias de las variables dependientes entre los grupos raciales se usó análisis de varianza con un valor  $p < 0.05$  para aceptar diferencias estadísticamente significativas.

Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza y prueba de LSD empleando el paquete Statgraphics, con un diseño completamente al azar considerando para cada uno de los efectos de días, FAMACHA, peso corporal y volumen de paquete celular.

## **Nota ética.**

El manejo de los corderos se realizó conforme a los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán- UNAM (SICUAE-FESC-UNAM) (Protocolo No DC- 2013-14).

## **Resultados y discusión.**

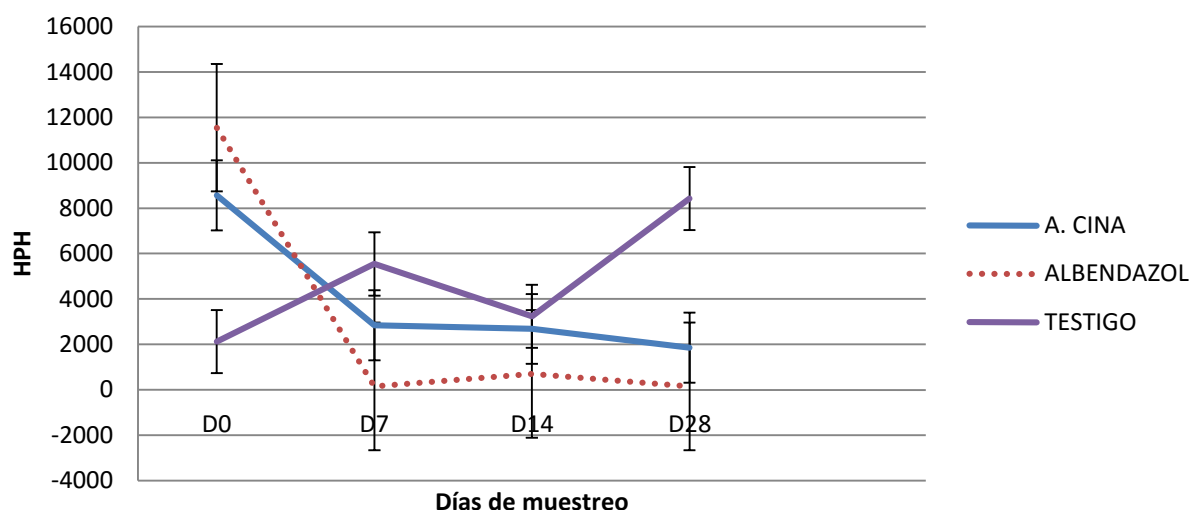
Las muestras de heces de los 30 corderos resultaron positivas a NGE con una eliminación promedio de 6,293 hgh, los géneros identificados fueron *H. contortus* (78%) y *Teladorsagia sp.*(22%).

A los siete días de la aplicación del ABZ se presentó una drástica disminución en la



eliminación de huevos de nematodos gastroentéricos, 98.8% de reducción; ( $p < 0.05$ ). Con la *A. cina* 30 CH también hubo una reducción en la excreción de huevos en un 51.7% (fig. 9). El grupo de animales que no recibió tratamiento (testigo) tuvo una eliminación de huevos, ascendente y continúa inició con 2,125 hgh y terminó con 8,425 hgh (0% de reducción) ( $p < 0.05$ ). No existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p > 0,05$ ) en la eliminación de huevos entre los animales que recibieron ABZ y *A. cina* en ninguno de los muestreos.

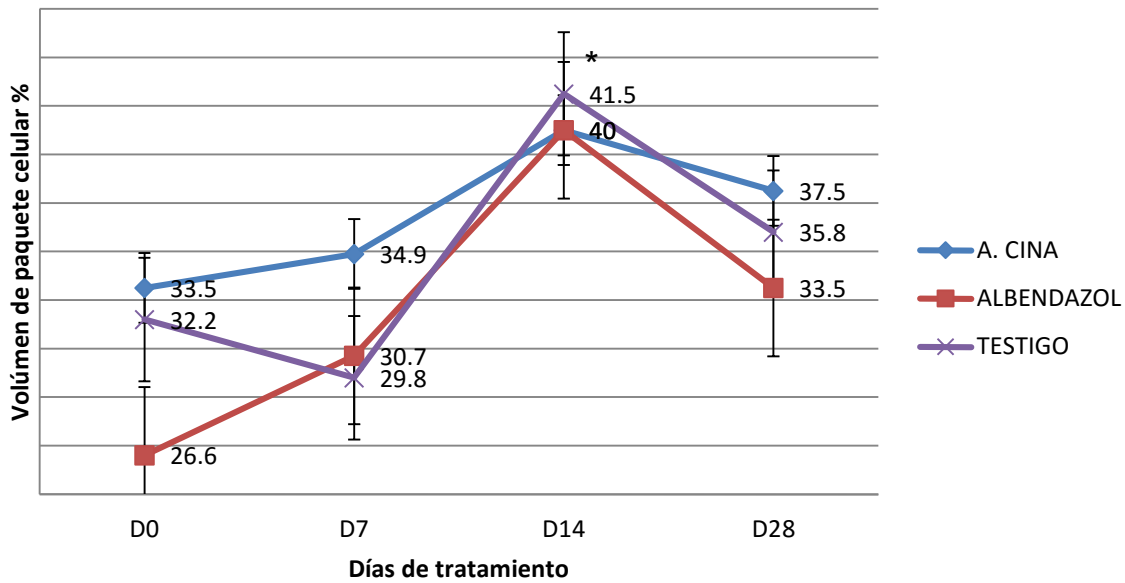
**Figura 9. Dinámica de eliminación de huevos por gramo ME ± EE de corderos tratados con Albendazol, *A. cina* 30 CH y grupo testigo.**



Datos ajustados a log 10 y analizados estadísticamente por Anova con prueba de LSD. \*, \*\* Muestran diferencia significativa dentro del grupo ( $p < 0.05$ ).

Al inicio de las evaluaciones, los valores del volumen del paquete celular en los tres grupos de animales evaluados mostraron un incremento significativo parámetro ( $p < 0.05$ ).

**Figura 10. Volumen de paquete celular (%) ME  $\pm$  EE en ovinos Suffolk tratados con Albendazol y *A. cina* 30 CH.**



Medias con \* muestran diferencia significativa dentro el mismo grupo ( $p < 0.05$ .)

El valor de FAMACHA en los animales tratados con *A. cina* 30 CH y con albendazol mejora al día 14 y 28 de tratamiento (cuadro 5).

El tratamiento con albendazol mejora el parámetro de FAMACHA desde el día 7 (cuadro 5).

Cuadro 5: Promedios de FAMACHA para los 30 animales Suffolk tratados con Albendazol y *A. cina* 30 CH.

Tratamiento	Promedio d0	Promedio D7	Promedio d14	Promedio d 28	p
<b>A. cina 30CH</b>	3 $\pm$ 0.13a	4 $\pm$ 0.44aA	3 $\pm$ 0.52bB	2 $\pm$ 0.31bA	0.44
<b>Albendazol</b>	5 $\pm$ 0.26aA	3 $\pm$ 0.21bB	2 $\pm$ 0.3cA	1 $\pm$ 0.22cA	0.1967
<b>Testigo</b>	3 $\pm$ 0.25b	2 $\pm$ 0.29aB	1 $\pm$ 0.2aA	3 $\pm$ 0.71bB	0.6238

Tras la aplicación del ABZ y *A. cina* 30 CH se presentó una reducción significativa ( $p < 0.05$ ) en la eliminación de huevos en las heces dentro de las dos primeras semanas postratamiento, en los corderos con una infección natural con *H. contortus*

y *Teladorsagia sp.*, estos hallazgos son similares a los reportados por Bashtar y col. (2011), quienes encontraron una reducción en la excreción de *Moniezia* en animales tratados con *A. cina*. Squires y col. (2011) reportan que cuando los parásitos adultos ingieren sangre con artemisinina se presenta un daño interno, de ahí la reducción en la oviposición y su muerte. Por otro lado, el tratamiento con artemisinina no redujo la infección inducida por *H. contortus* en gerbos especie que es extrapolable a ovinos, así, estos resultados más los presentados en este estudio indican que se abre la puerta a determinar las dosis eficaces y se alcancen niveles sanguíneos altos para que el daño al parásito sea evidente.

Cuando el tratamiento con ABZ es eficaz y se proporciona una buena alimentación a los animales, se induce la formación de anticuerpos para defenderse de una infección parasitaria y favorecer la presentación de los fenómenos como resistencia o resiliencia, por ello los conteos de huevos en heces disminuyen y otros parámetros como el índice del sistema FAMACHA y el VPC se ven positivamente afectados (Gervacio y López, 2006; Valdez y Wong, 2006; Morales y col., 2006).

Los corderos tratados con ABZ tuvieron una mejora en los índices del sistema FAMACHA, hallazgos que coinciden con lo reportado por Demeler y col. (2012) donde la aplicación de ABZ mejoró los parámetros productivos (ganancia de peso), el color de la mucosa conjuntival y el VPC en animales con parásitos hematófagos. Gervacio y López (2006) demostraron que el índice FAMACHA se correlaciona con el VPC cuándo éste es 40 corresponde a un FAMACHA 1 y 2, un valor de 30 cuando se tiene un índice 3 y 4 y un VPC de 15 cuando hay un índice 5 del sistema FAMACHA. Resulta evidente que después de la aplicación de *A. cina*, que como ya se demostró actúa contra *H. contortus*, hay un beneficio sobre los parámetros productivos de los animales, desconociéndose si tiene una acción directa sobre la médula ósea, glóbulos rojos o sobre el sistema inmune para crear una respuesta contra el parásito.

El tratamiento con *A. cina* 30CH y ABZ contra la infección natural por NGE mejoró los valores del VPC a los 7 y 14 días de su administración ( $p < 0.05$ ), hallazgos similares los reportaron Cala y col. (2014) quienes encontraron que artemisinina mejora dicho parámetro dos semanas después de su aplicación. Por otro lado, Demeler y col. (2012) reportaron que en infecciones naturales después de un tratamiento con ABZ se presenta un incremento en el VPC. Dado que no se conoce el mecanismo de acción de *A. cina*, su efecto favorable en ese parámetro sanguíneo se puede atribuir a dos cosas, la primera a un daño directo sobre el parásito o a un posible estímulo de la médula ósea adulta. En este sentido, Kerboeuf y col. (2008) reportan una actividad antioxidante de las artemisininas que ayudan a mantener el equilibrio oxidativo-antioxidante afectando directamente al parásito; además García La Fuente y col. (2009) apoyan esta hipótesis al afirmar que existe una inhibición de componentes proinflamatorios y estimula la respuesta inmune. Ferrerira y González (2008) describen la estabilidad de artemisinina a nivel ruminal y describen que es detectable en sangre a una concentración de 33mg de artemisinina/kg pv.

Se concluye que *A. cina* 30CH y el ABZ tuvieron una eficacia antihelmíntica sobre reducción de los huevos en las heces y sobre el índice FAMACHA y el VPC en las primeras dos semanas después de su aplicación. Se hace necesario dilucidar el mecanismo de acción del compuesto homeopático para optimizar su uso.

## **Experimento V: Evaluación del efecto de *Artemisia cina* 30 CH y el extracto etanólico de *A. cina* en una infección controlada con *Haemonchus contortus*.**

### **Materiales y métodos.**

#### **Localización.**

Este experimento se realizó en las instalaciones destinadas a animales de experimentación de posgrado de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

#### **Animales.**

Se utilizaron 20 animales, diez machos y diez hembras, raza Hampshire de tres meses de edad. Los corderos tenían 20 días de destetados, estaban identificados con arete metálico, no recibieron manejo sanitario previo y fueron negativos a NGE. Los corderos fueron mantenidos en condiciones de estabulación durante tres meses. Se alojaron en cuatro corrales (6 m<sup>2</sup> c/u), con piso de cemento y paredes de malla ciclónica, la altura de la pared era de un metro y al techo fue de dos metros.

Todos los animales se alimentaron con alfalfa achicalada como dieta base y agua *ad libitum*.

#### **Diseño experimental.**

Previo a los tratamientos se realizó una distribución de los 20 individuos con base a su peso en tres grupos homogéneos por medio del programa Statgraphics.

Se monitorearon los animales por 14 días previamente, para asegurar su negatividad a NGE. Posteriormente, cada cordero recibió una dosis de 5,000 L<sub>3</sub> de *H. contortus* por vía intrarruminal. Se realizó el monitoreo de los animales cada tres

días, por 57 días hasta el establecimiento de la infección, después de este tiempo se realizaron los tratamientos.

Cada uno de los grupos recibió el siguiente tratamiento:

Grupo A: Se administró *Artemisia cina* 30CH® (Laboratorios Millenium) por vía oral, una sola dosis, 1 ml por cada 5 kg de peso vivo (pv) (Cavalcanti, 2008).

Grupo B: Recibió *A. cina* extracto etanólico (laboratorios Millenium, México) por vía oral, una sola dosis, 1ml por cada 5 kg de peso vivo (pv) (Cavalcanti, 2008).

Grupo C: Albendazol (*Albendaphorte 2.5% Co*®, Laboratorio Salud y Bienestar Animal) por vía oral, 7.5mg/kg pv.

Grupo C: Testigo, no recibió tratamiento.

Cada tres días por un período de 64 días, a todos los animales se les tomó una muestra de heces y sangre, así como el registro de su peso corporal e índice del sistema FAMACHA.

Las variables de respuesta fueron la dinámica de la eliminación de huevos en la materia fecal, cambio de peso corporal, índice del sistema FAMACHA, volumen del paquete celular y conteo posmortem de fases adultas de *H. contortus*.

### **Recolección de muestras.**

Las muestras de heces fueron tomadas del recto utilizando bolsas plásticas, se identificaron individualmente con el número del arete de cada animal, se mantuvieron y transportaron al laboratorio en refrigeración (3° C). En la mañana, antes que los animales salieran a pastorear se obtuvieron las muestras de sangre (5 ml) por medio de venopunción yugular se, utilizando tubos al vacío con EDTA

como anticoagulante. Se trasladaron al laboratorio el mismo día bajo refrigeración (3° C).

### **Procesamiento de las muestras.**

Las muestras de heces se procesaron por medio de la técnica de Mc Máster, técnica modificada para ovinos (Coles, 1992) para conocer la cantidad de huevos de NGE por gramo de heces. El tiempo que transcurrió entre la toma de muestra y el análisis fue de doce horas. Las muestras se mantuvieron en refrigeración a 3° C desde la toma hasta el análisis.

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

### **Registro del peso vivo.**

El peso vivo se calculó con una cinta métrica® (*Ovni*, Inalmet) alrededor del tórax de cada cordero y el valor se correlacionó con lo reportado por Afolayan y col. (2006) para obtener la correlación con el peso vivo.

### **Índice del sistema FAMACHA.**

Se evaluó el grado de anemia de cada una de las ovejas seleccionadas a través de la asignación del índice correspondiente de acuerdo a la tarjeta del sistema FAMACHA tomando en cuenta el color de la mucosa ocular. La aplicación de ese método se hizo de acuerdo a las recomendaciones expuestas en el folleto informativo de la tarjeta FAMACHA elaborado por la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Pretoria, el Instituto Veterinario de Onderstepoort, y La Asociación Veterinaria Sudafricana (Bath, 2004).

### **Conteo de parásitos adultos.**

Después del sacrificio de los corderos en el rastro, se aislaron los abomasos ligando en los esfínteres cárdico y pilórico y trasladaron al laboratorio para el procesamiento que se describe a continuación (González y col., 2011):

- ✓ El abomaso se incidió por su curvatura menor, se colectó su contenido y se lavó tres veces con agua corriente hasta completar dos litros.
- ✓ Se adicionó formol al 10% y se colectó el 20% del total del volumen para evaluar.
- ✓ Se tomó el 20% del contenido abomasal, se contaron los adultos que se encontraron y se correlacionó al total del contenido abomasal.
- ✓ Se determinó la relación macho: hembra.

### **Análisis estadístico.**

Los datos de los conteos de huevos se transformaron logarítmicamente ( $\log_{10} + 10$ ) para estabilizar la varianza y analizarlos estadísticamente.

Los resultados se evaluaron mediante análisis de varianza y prueba de LSD empleando el paquete Statgraphics, con un diseño completamente al azar y un valor  $p < 0.05$  para aceptar diferencias estadísticamente significativas. Se consideraron para cada uno de los efectos de días, eliminación de huevos, índice del sistema FAMACHA, peso corporal y VPC.

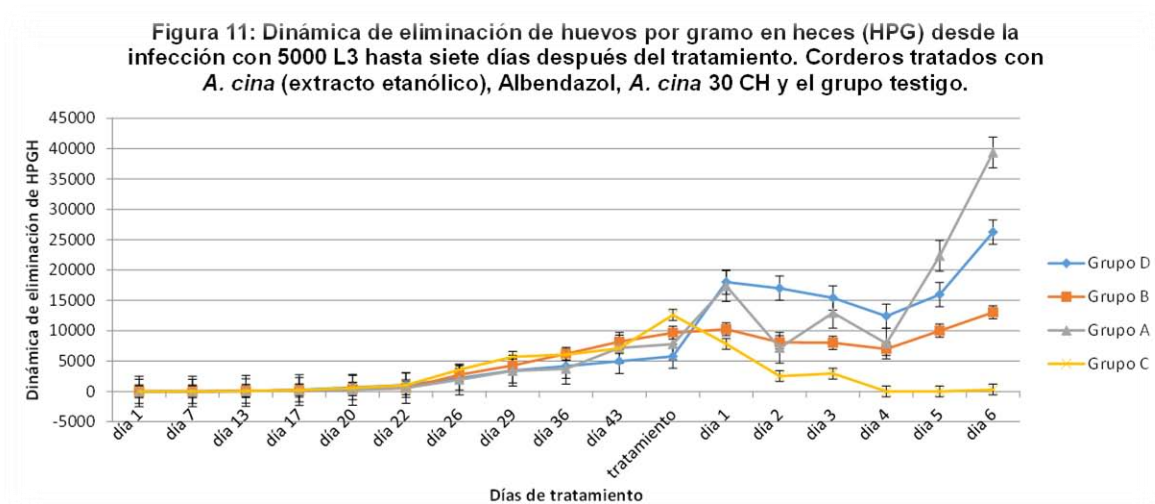
### **Nota ética.**

El manejo de los corderos se realizó conforme a los lineamientos del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán de la Universidad Nacional Autónoma de México (CICUAE-FMVZ-UNAM) (Protocolo No DC- 2013-14).



## Resultados y discusión.

La eliminación de huevos inició entre los 13 y 17 días después de la infección con 5,000 L<sub>3</sub> de *H. contortus*. La dinámica de eliminación se muestra en la figura 12, hay un comportamiento homogéneo en todos los grupos, desde el momento de la infección hasta el tratamiento. Al día siguiente del tratamiento, se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el grupo C (ABZ) y D (testigo). A los siete días postratamiento hubo diferencias entre los cuatro grupos ( $p < 0.05$ ), el grupo C mostró el mejor comportamiento antiparasitario, ya que la eliminación de huevos fue prácticamente nula. En los animales del grupo B la excreción de huevos no disminuyó, no existieron diferencias significativas en los días posteriores al tratamiento ( $p > 0.05$ ). El grupo que no recibió tratamiento (D), tuvo una eliminación de huevos constante y ascendente.



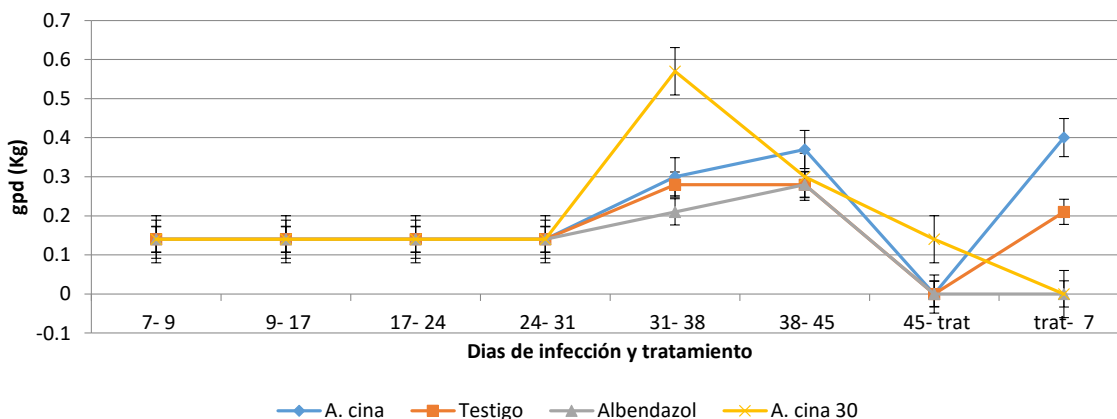
El establecimiento de la infección con *H. contortus* y la dinámica en la eliminación de huevos coincidió con Hernández (2005) quien reportó un período de prepatencia de 16 a 18 días, resultados semejantes a los 13 a 17 días del presente estudio. De igual manera, la máxima eliminación de huevos fue similar, ocurrió a los 50 días posinfección, momento que se aprovechó para realizar los tratamientos.

Los resultados observados en los corderos tratados con ABZ (grupo C) fueron los esperados y similares a los reportados por Courtney y col. (1986) quienes demostraron una eficacia del 99% usando sulfóxido de ABZ. Su mecanismo de acción es conocido, daña la unión a los canales de  $\beta$ -tubulina por lo que su efecto es más rápido en comparación a aquellos antiparasitarios que actúan sobre canales iónicos (Martin y col., 1997).

El segundo mejor comportamiento en cuanto a eliminación de huevos en las heces se presentó en los animales tratados con *A. cina* en extracto etanólico (grupo B), este efecto se atribuye a las artemisininas presentes en el extracto, se les ha demostrado un efecto antiparasitario (Akkari y col., 2014) y antimalárico (Abolaji y col., 2014). Dado que la *A. cina* tiene efectos antitumorales (Herawati y col., 2015) y por ende afecta el crecimiento, permite especular que el efecto observado en la dinámica de excreción de huevos se debió a la inhibición en su formación y desarrollo en la hembra parásita, situación aún por demostrar.

El grupo de corderos que recibieron la *A. cina* 30 CH mostró un incremento en la eliminación de huevos en las heces después del tratamiento

**Figura 12: Ganancia de peso diaria (Kg) desde la infección con 5000 L<sub>3</sub> hasta siete días después del tratamiento. Corderos tratados con *A. cina* (extracto etanólico), Albendazol, *A. cina* 30 CH y el grupo testigo.**



No existió efecto del tratamiento con *A. cina* 30 CH sobre el peso corporal, no existen antecedentes referentes al beneficio productivo o parasitológico tras el uso de esta opción homeopática.

Tampoco hubo un efecto favorable en la ganancia de peso en los animales tras la aplicación del ABZ, difiriendo de lo reportado por Sandoval y col. (2009), quienes plantean que la eliminación de parásitos más una dieta balanceada, permite la reducción de la infección y un consecuente mejor aprovechamiento de nutrientes, en el presente estudio se aseguró una dieta balanceada. Otras evaluaciones muestran que existe un beneficio en la ganancia de peso después de desparasitar con ABZ hasta los 30 o 90 días de su aplicación (Toribio y col., 1999; Sandoval y col., 2009).

Se plantea que no hubo diferencia en la ganancia de peso con el ABZ ya que probablemente el periodo de recuperación de la mucosa abomasal después del daño inducido por el parásito es mayor a los siete días, periodo de evaluación de este estudio, Chernuhka y col. (2014) plantea que las células de abomaso utilizadas en bioestudios para fomentar la regeneración de células gástricas dañadas por medicamentos como aspirina, el periodo de regeneración es de aproximadamente 22 días. Esto concuerda con los hallazgos obtenidos en este estudio, ya el daño constante por una infección de *H. contortus* induce la reducción del aprovechamiento de proteínas y la regeneración de tejido y aprovechamiento normal de nutrientes se vería reflejado hasta ese periodo mencionado.

El buen desempeño en la ganancia de peso del grupo de animales tratados con *A. cina* puede ser atribuido al carácter antioxidante y regenerador de células (Song y col., 2015).

El mejoramiento de los índices del sistema FAMACHA fue similar ( $p > 0.05$ ) en los tres grupos (*A. cina* 30 CH, extracto etanólico de *A. cina* y ABZ) a los siete días de

su aplicación. Los índices de esos grupos fueron diferentes ( $p < 0.05$ ) al grupo testigo (cuadro 6).

Cuadro 6: Promedios de FAMACHA de animales tratados con Albendazol, *A. cina* 30 CH y *A. cina*.

Famacha	testigo	<i>A. cina</i> 30	<i>A. cina</i>	albendazol
día 42	3 + 0.5a	3 + 1a	3 + 0.5a	3 + 1a
tratamiento	3 + 1a	3 + 1a	3 + 0.5a	3 + 1a
día 7	3 + 0.5a	2 + 0.5b	2 + 1b	2 + 1b

Las letras en minúscula diferentes muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

El efecto favorable sobre los índices del sistema FAMACHA con los tres tratamientos, probablemente fue debido a la reducción de las fases adultas hematófagas en el abomaso y por ende, la recuperación de parámetros fisiológicos normales como el VPC. Estos hallazgos son similares a los encontrados por Jeyakumar (2007) donde después del uso de bencimidazoles, se observó una mejora de los índices del sistema FAMACHA; en aquellos animales donde no hubo en efecto beneficioso, se consideró como un indicador de resistencia antihelmíntica. Contrario a lo anterior, no se observó un efecto positivo sobre los parámetros hematológicos cuando se utilizó la planta *Vernonia amygdalina* de la familia Asteraceae por (Nweze y col., 2013).

Cuadro 7: Promedios de huevos por hembra, número de hembras y promedio de medida de hembras para los 20 animales tratados con Albendazol, *A. cina* 30 CH y *A. cina*.

	Huevos por hembra	No de hembras	Medida de hembras
<i>A. cina</i>	51,134 + 43,544	365 + 12a	2.09 + 0.2a
<i>A. cina</i> 30	70,137 + 72,290	406.5 + 25b	1.9 + 0.2b
testigo	37,319 + 37,251	496.25 + 15b	1.9 + 0.3b
albendazol	531 + 731	276 + 15c	2.07 + 0.2a

Las letras en minúscula diferentes muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 8: Promedios de número de machos, medida de machos y relación macho:hembra para los 20 animales tratados con Albendazol, *A. cina* 30 CH y *A. cina*.

	No de machos	Medida de machos	Relación macho:hembra
<i>A. cina</i>	306.25 + 23a	1.4 + 0.2a	0.83:1a
<i>A. cina</i> 30	448 + 25b	1.45 + 0.3a	1.1:1b
testigo	463 + 27b	1.47 + 0.2a	0.93:1a
albendazol	632.5 + 17c	1.48 + 0.2a	2.2:1c

Las letras en minúscula diferentes muestran diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

El conteo y tamaño de los adultos después del tratamiento permite determinar el daño sobre el crecimiento al parásito adulto y el efecto selectivo sobre hembras o machos (Wood y col., 1995), además indirectamente se evalúa la capacidad antigénica del individuo para resistir al establecimiento de *H. contortus*.

El tamaño obtenido de las hembras (19.9 mm) en este estudio estuvo dentro de los rangos considerados como normales, Lichtenfels y col. (1994) reportan que las hembras de *H. contortus* mide de 14.8 a 27.2 mm; González y col. (2013) mencionan que tienen un promedio de 18 mm. Para los machos, el tamaño fue en promedio de 14 mm, también coincidió con lo informado por esos autores.

En este estudio el empleo de ABZ mostró un menor número de hembras: hallazgos compatibles con lo reportado por Martínez y col. (2015) donde después de dos meses del tratamiento, describe el mecanismo citotóxico, el estrés oxidativo, generación de aductos y degradación de DNA que induce el uso de ABZ al parásito adulto. El ABZ arresta parcialmente el ciclo celular, además de la exposición a la fosfatidilserina sobre la superficie del parásito adulto lo cual conduce a apoptosis. Las especies reactivas a oxígeno fueron inducidas por el ABZ y se le atribuye un efecto de reducción en el crecimiento, este último, no se observó en este estudio debido que fue corto el periodo postratamiento.

El tratamiento con *A. cina* tuvo un efecto sobre la cantidad de parásitos, este estudio es pionero en mostrar la actividad de *A. cina* sobre las fases adultas de *H. contortus*, sin embargo, no afectó su crecimiento o tamaño. Zeng y col. (2015) observaron el

posible mecanismo de acción, ya que, en los estudios que se realizaron sobre *A. indica* encontraron actividad citotóxica, y promotora de apoptosis sobre células tumorales. *A. indica* induce daño sobre el ADN mitocondrial y reduce el potencial de membrana mitocondrial, posibles causas de los hallazgos en este ensayo. Este efecto inductor de apoptosis ha sido reportado por Thang y col. (2015) al evaluar *A. sieversiana*.

El extracto etanólico de *A. cina* mostró efecto sobre *H. contortus*, coincidiendo con lo reportado por Bashtar y col. (2011) quienes informan sobre la eficacia contra *Moniezia expansa*, en un estudio similar donde siete días posteriores al tratamiento se realizó el sacrificio de los animales y se cuantificaron parásitos adultos.

## Discusión general

El presente trabajo abarcó el análisis espectroscópico de *A. cina* en extracto etanólico y *A. cina* 30 CH, el fraccionamiento de *A. cina* en sus diferentes moléculas y su efecto antihelmíntico *in vitro* por medio de las pruebas de inhibición de la eclosión de huevos, inhibición del desarrollo larvario e inhibición de migración larvaria; además se determinó el efecto de estas sobre la penetración larvaria. El presente también mostró el efecto en dos fases *in vivo*, la primera en una infección natural con ovinos en pastoreo y la segunda en una infección inducida controlada.

*A. cina* mostró contener la molécula activa reconocida como antihelmíntica (artemisinina) se encontró por cromatografía en capa fina y se confirmó por espectrometría de masas. Esta molécula según lo reportado por Alejos (2011) posee un peso molecular de 287 reporte que concuerda con el peso obtenido en este estudio. En cuanto a *A. cina* 30 CH mostró contenido de proteína, lo que se contrapone a lo reportado por Eizayaga (2012) quien afirma que en el principio homeopático a concentraciones hasta la 12 CH se detectan metabolitos proteicos.

En la separación de las fracciones de la planta se observaron varias bandas de diferente peso molecular, según lo descrito por Giang y col. (2013) más de 500 especies del género *Artemisia* contienen gran cantidad de compuestos y entre ellos terpenoides, flavonoides, cumarinas, ácidos cafeoilquinas poliacetilenos con variaciones oxidativas o estereoquímicas, que son probablemente los mismos compuestos que se separaron en este trabajo pero que no se dilucidaron.

Las fracciones obtenidas del extracto etanólico Ac3h, Ac3b, Ac3e, Ac3a y levamisol mostraron inhibición de la migración larvaria ( $p > 0.05$ ), las fracciones se determinaron como artemisininas. Estos resultados son comparables con los hallados por Bashtar y col. (2011) quienes encontraron que *A. cina* posee una eficacia antihelmíntica entre 70 y 80%, estos hallazgos permiten considerarla planta como un potencial antihelmíntico. Las fracciones obtenidas abren un campo de

estudio para determinar la forma de presentación de las mismas y mayores estudios con diluyentes, con el fin de determinar cuál es la forma más activa, el ácido artemisínico, aldehído o la cetona.

En general las plantas de la familia Asteraceae son conocidas tradicionalmente por sus propiedades medicinales, *A. cina* se caracteriza por su poder antioxidante y antibacterial (Chethan y col., 2012), además, otra característica observada en este estudio, las células blanco están protegidas y no observó daño alguno sobre la mucosa. Este estudio no abarcó el estudio microscópico de tejidos, sin embargo, a nivel macroscópico no se observó daño de tejidos después de las infecciones, se observó daño a nivel macroscópico de los huevos tratados con *A. cina* y sus fracciones inhibieron su eclosión.

Se plantea a *A. cina* como antiparasitario debido a los hallazgos encontrados a lo largo de los experimentos, sin embargo, se necesitan más estudios para determinar dosis letal 50, y ante todo la pureza de la molécula, ya que en este estudio no fue posible asegurar el 100% de pureza. Queda el campo abierto al estudio de *A. cina* en todos sus metabolitos ya que este estudio es pionero en determinar la presencia de artemisininas. La mayoría de estudios se centran en otras *Artemisias* de la familia *Asteraceae*.



## Conclusiones.

- Las fracciones Ac3a, Ac3b, Ac3h, Ac3i, Ac4a mostraron picos congruentes con artemisininas control Sigma®, se encontró que estas fracciones poseen dos picos, a 244.89 m/z y a 261m/z. Se determinó que la presencia de este último permite que la fracción sea activa *in vitro*, es decir, posee un efecto letal.
- El compuesto homeopático *A. cina* 30 CH no posee metabolitos proteicos, ya que su elaboración impide que a la 30 CH posea un compuesto activo.
- El extracto etanólico de *A. cina* tiene pequeñas cantidades de artemisininas, las cuales son fácilmente separables por el método de cromatografía en capa fina. El sistema más apropiado para su separación es hexano, con acetona a una concentración de 80:20.
- El compuesto homeopático *A. cina* 30 CH y ABZ mostraron eficacia de 100% en el ensayo de inhibición de eclosión de huevos, la fracción Ac3h mostró eficacia menor (70%), sin embargo, aceptada por la Asociación Mundial de Parasitología.
- ABZ y *A. cina* 30CH mostraron inhibición del desarrollo larvario, por lo cual se propone a *A. cina* como una alternativa antihelmíntica.
- Las fracciones Ac3e, Ac3h y el levamisol mostraron inhibición de la migración larvaria (L<sub>3</sub>), el efecto es mayor cuando las larvas están desnudas y las fracciones de artemisininas son activas (Ac3a, Ac3b, Ac3h y Ac3i). El efecto inhibitorio de las artemisininas Sigma® fue evidente en larvas desnudas.
- Las fracciones obtenidas de *A. cina* no mostraron efecto sobre la penetración a la mucosa abomasal, medida por medio de explantes abomasaes, se concluye que su mecanismo de acción no es inhibiendo la penetración de L<sub>3</sub> a la mucosa.
- *A. cina* 30CH y ABZ mostraron eficacia antihelmíntica sobre reducción de huevos en las heces y sobre parámetros productivos como el índice del sistema FAMACHA y el VPC al día 7 y 14. El ABZ mejoró los parámetros y

disminuye drásticamente la eliminación de huevos por gramo desde el día siete postratamiento y se mantiene hasta el día 28.

## Bibliografía

- Abolaji, A. Eteng, M. Ebong, P. Dar, A. Farombi, E. Choudhary, I. *Artemisia annua* as a possible contraceptive agent: a clue from mammalian rat model. Nat. Prod. Res. Formerly natural product letters. (2004) DOI:10.1080/14786419.2014.936016.
- Akkari, H. Rtibi, K. Bchir, F. Rekik, M. Aziz, M. Gharbi, M. Veterinary Res. Communication. (2014). 38: 249- 255.
- Alejos, F. Qu, G. Zhou, L. Characterization of development and artemisinin biosynthesis in self- pollinated *Artemisia annua* plants. Springer Verlag. (2011). 234: 685- 697.
- Almeida, F. Garcia, K. Torgerson, P. Amarante, A. Multiple resistance to anthelmintics by *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep in Brazil. Parasitol. Internat. (2010). 59: 622- 625.
- Arece, J. Mahieu, M. Archimede, H. Aumont, G. Fernández, M. González, E. Cáceres, O. Menéndez- Buxadera, A. Comparative efficacy of six anthelmintics for the control of gastrointestinal nematodes in sheep in Matanzas, Cuba. Sma. Rumin. Res. (2004). 54: 61- 67.
- Avello, M. Avendaño, C., S. Aspectos generales de la homeopatía. Rev Méd Chile (2009); 137: 115-120.
- Ballester Sanz, A. Sanz Franco, M. Galan Grau, E. Formación médica continuada en atención primaria. Homeopatía. Fundamentos científicos. Centro de Salud de Nazaret y de Cullera. Valencia, España. (1999). Vol. 72.
- Barros, S. Pasteur, J. Homeopatía: Medicina del terreno. Ediciones de la Biblioteca. Universidad Central de Venezuela, Caracas. (1977) P. 17- 22.
- Bashtar, A. Hassanein, M. Ghaffar, F. Rasheld, K. Hassan, S. Mehlhorn, H. Al-Mahdi, M. Morsy, K. Ghamdi, A. Studies on monieziaisis of sheep I. Prevalence an antihelminthic effects of some plant extracts, a light and electron microscopic study. Parasitol. Res. (2011). 108: 177- 186.
- Bautista, O. Ovalle, K. Evaluación de la eficacia de un preparado acuoso de semilla de papaya (*Carica papaya*) contra *Haemonchus contortus* en ovinos

con infección artificial. Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (2012).

- Bhakuni, R.; Jain, D.; Sharma, R.; kumar, S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Science*, Bangalore, (2011) 80: 11: 35–48.
- Bath, Gareth, Malann, Francois y Van Wyk. The FAMACHA ovine anemia guide to assist with the control of haemonchosis. In proceedings of the 7th anual congress of the livestock health and production group of the south african veterinary association, Port Elizabeth, (2004) 5-7 junio Pp 5.
- Bizimenyera, E. Githiori, J. Eloff, J. Swan, G. *In vitro* of *Peltophorum africanum* Sond (Fabaceae) extracts on the egg hatching and larval development of the parasitic nematode *Trichostrongylus colubriformis*. *Vet. parasitol.* (2006) 142: 336- 343.
- Bisset, S. Vlassoff, A. Douch, P. Jonas, W. West, C. Green, R. Nematode burdens and immunological responses following natural challenge in Romney lambs selectively bred for low or high faecal worm egg count. *Vet. Parasitol.* (2001). 61: 249- 263.
- Boareto, a. C.; Muller, j. C.; Bufalo, a. C.; Botelho, g. G. K.; Araujo, s. L.; Foglio, m. A.; Morais, r. N.; Dalsenter, p. R. Toxicity of artemisinin *Artemisia annua* L. in two different periods of pregnancy in Wistar rats. *Reproduct. Toxicol.* Tarrytown, (2008) 25: 239–246.
- Cala, A. Avaliação da atividade de *artemisia annua* l., *melia azedarach* l. E *trichilia clausenii* c. Sobre nematódeos gastrintestinais de ovinos. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal - são Paulo – Brasil (2010).
- Calleja Peredo, C. Especialista universitario en homeopatía por la Universidad de Valladolid. (2002) P. 9.
- Campbell W. C., Fisher M. H., Stapley E. O. Albers- Schbnberg G. & Jacob T. A. Ivermectin: a potent new antiparasitic agent. *Science* (1983). 221: 823- 828.

- Campos, R. Herrera, D. Quiroz, H. Olazaran, S. Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México. Nota de Investigación. Tec. Pec. Me. (1990) 28: 30-34.
- Campos, R. Herrera, R. Quiroz, H. Diagnóstico in vitro de *Haemonchus contortus* resistentes al albendazol, fenbendazol, oxfendazol y febantel entre rebaños de ovinos Tabasco o pelibuey. Vet. Mex. (1992). 23: (1) 51-66.
- Carvalho, C. Chagas, A. Cotinguiba, F. Furlan, M. Brito, L. Chaves, C. Stephan, M. Bizzo, H. Amarante, A. The anthelmintic effect of plant extracts on *Haemonchus contortus* and *Strongyloides venezuelensis*. Veterinary parasitology. (2012). 183: 260- 268.
- Chernukha, I. Bogatyrev, A. Dydykin, A. Aslanova, M. Fedulova, L. Effect of polypeptides isolated from cattle abomasum on stomach regenerative processes in rats. Voprosy Pitaniia. (2014). 83: 5: 26- 32.
- Chethan, J. Sampath, K. Sekhar, S. Prakask, H. Antioxidant, antibacterial and DNA protecting activity of selected medicinally important Asteraceae plants. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. (2012). 4: 257- 261.
- Coles, G. Borgsteede, F. Geerts, S. Klei, T. Taylor, M. Waller, P. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance. Vet. parasitol. (1992). 44: 35- 44.
- Costa, C. Bevilaqua, C. Camurca, A. Maciel, M. Morais, S. Castro, C. Braga, R. Oliveira, L. In vitro ovicidal and larvicidal activity of *Azadirachta indica* extracts on *Haemonchus contortus*. Small ruminant research. (2008). 74: 284 287.
- Cuesta, R. El medicamento homeopático y su normativa legal. Farmacéuticos del CGCOF. España. (1998). P. 55.
- Curtney, C. Greiner, E. Whitten, R. Efficacy of albendazole feed dormulation against bovine gastrointestinal nematodes including arrested larvae of *Ostertagia ostertagi*. Am. J. Vet. Res. (1986) 4: 119- 122.

- Derbalah, A. Kamel, S. Morsy, S. El Sawwy, M. Alternatives to control powdery mildew and early blight diseases of tomato under greenhouse condition. *Egyptian Jour. of Biol. Pest. Cont.* (2012). 22: 2: 185- 190.
- De Sagreda, J. Homeopatía. Interpretación histórica de un debate interminable. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona. *OFFARM.* (2006) 25: 86
- Draiman, M. Las personalidades homeopáticas. Homeopatía Buenos Aires. (1993). 58: 3: 169- 174.
- Driscoll, M., Dean, E., Reilly, E., Bergholz, E., Chalfie, M., Genetic and molecular analysis of a *Caenorhabditis elegans* beta-tubulin that conveys benzimidazole sensitivity. *J. Cell Biol.* (1989) 109: 2993–3003.
- Eizayaga, J. Diluciones homeopáticas. Hay algo detectable en ellas? Universidad Maimónides. Departamento de homeopatía. (En línea). (2012). Disponible en: <https://docs.google.com/file/d/0B-YT5anXwXf4T0k0ZXVpUkxUZ3FiTkpfTW8xbW00dw/edit?pli=1>
- Fader, O Endoparasitosis bovina en una invernada pastoral intensiva. Sitio argentino de producción animal. (En línea). Citado el 6 de marzo de 2014. (2008). Disponible en: [www.produccion-animal.com.ar](http://www.produccion-animal.com.ar)
- Ferreira, J.; Janick, J. Annual wormwood (*artemisia annua* L.). Disponible e: <[www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheet/artemisia.pdf](http://www.hort.purdue.edu/newcrop/cropfactsheet/artemisia.pdf)>. (2009).
- Fonseca, A. Caracterização do nematóide de ovinos, *Haemonchus contortus*, resistente e sensível a anti-helmínticos benzimidazóis, no estado do Ceará, Brasil. Universidad estadual de Ceará. Disertación para obtener el título de doctor en ciencias. (2005).
- García, A. Carbonero, M. Moreno, F. Hidalgo, M. Fernández, P. Estimación del estado hídrico de la encina mediante NIRS: índices espectrales y comparación de modelos con distintos equipos portátiles. 6º congreso forestal español. (En línea). Disponible en: <http://secforestales.org/publicaciones/index.php/congresos/article/viewFile/10578/10482>. (2013).

- Gebauer, G. Una nueva teoría a cerca de las diluciones homeopáticas. Santiago de Chile. P. 7. (2002).
- Gervacio, N. López, M. Uso del sistema Famacha y su correlación con la condición corporal, parámetros hematológicos y parasitológicos en ovinos. Tesis para obtener el grado de Médico veterinario zootecnista. Universidad Nacional Autónoma de México. (2006).
- Giang, P. Thi, N Matsunami, K. Tong, P. Three new eudesmanes from *Artemisia japonica*. Nat. Prod. Res. (2013) 28:9: 631- 635.
- Gill, J. Redwin, M. Van, J. Lacey, E. Avermectin Inhibition of Larval Development in *Haemonchus contortus* - Effects of Ivermectin Resistance Internat. Jour. for Parasitol. (1994) 25: 4: 463-470.
- Golenser, J.; Waknine, J. H.; Krugliak, M.; Hunt, N.; Grau, G. E. Current perspectives on the mechanism of action of artemisinins. International Journal for Parasitology, Kidlington, (2006) 36: 1427–1441.
- González, R. Córdova, C. Torres, G. Mendoza, P. Arece, J. Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México. Vet. Méx. (2011). 42: 2: 125- 135.
- González Garduño, R. Navarro Martínez, F. Arias- Julián, J. Gutiérrez- Cruz, S. Zaragoza Vera, M. Zaragoza Vera, C. Descripción Morfológica de *Haemonchus contortus* y *Mecistocirrus digitatus* de Ovinos y Bovinos en Tabasco, México. Avances en ciencias veterinarias. (2013). 28: 2: 76- 85.
- González, S. Villegas, M. Manual de prácticas de laboratorio. Benmérita Universidad Autónoma de Puebla. Facultad de ciencias químicas. Licenciatura: químico farmacobiólogo. (2006).
- Hanneman, S. Doctrina y tratamiento homeopático de las enfermedades. (En línea). Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=mNIMQCAPPu8C> (1819).
- Heppner, D. G.; Ballou, W. R. Malaria in 1998: advances in diagnosis, drugs and vaccine development. Tropical and Travel Association, Panajachel, (1998) 11: 519: 30.

- Herawati, M. Pudjihartati, E. Pramono, E. Sulistyarningsih, E. Purwantoro, A. Obtaining *Artemisia* cina polyploidy through plant growth regulator treatment in shoot culture. *Agrivita*. (2015). 37: 1: 178- 184.
- Hernández, D. Martínez, O. Domínguez, L. Hernández, M. Propuesta metodológica. Vinculación del programa farmacología I con la medicina natural tradicional. *Rev. Ciencias Médicas*. (2007) 11:(3): 1561-3194
- Hernández, F. Caracterización fenotípica y de virulencia de una cepa de *Haemonchus contortus* de origen ovino. Tesis para obtener el grado de médico veterinario zootecnista. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. (2005).
- Hochstetter, F. Homeopatía y otra terapéutica complementarias. 2ª edición. Santiago de Chile. (1972). 11.
- Iqbal, Z., Lateef, M., Ashraf, M., Jabbar, A., Antihelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. *J. Ethnopharmacol.* (2004).93: (2–3), 265– 268.
- Jackson, F. Greer, A. Huntley, J. McAnulty, R. BBartley, D. Stanley, A. Stenhouse, L. Stankiewicz, M. Sykes, A. Studies using *Teladorsagia circumcincta* in an in vitro direct challenge method using abomasal tissue explants. *Veterinary parasitology*. (2004). 124: 73- 89.
- Jeyakumar, C. A preliminary report on the use of FAMACHA for haemonchosis in goats in the Eastern Cape Province of South Africa during the late autumn/ early winter period. (2007). 78: 2: 90- 91.
- Kim, L. Seo, Y. Liu, H. Kim, J. Protective effect of *Artemisia annual*L. extract against galactose induce oxidatice stress in mice. *Plos one*. (2014). 9: 1: 7
- klayman, D. L. Qinghaosu (Artemisinin): An antimalarial drug from China. *Science, Washington*, (1985) 228: 4703: 1049-1055. .
- Lans, C. Validation of ethnoveterinary medicinal treatments. *Vet. Parasitol.* (2011) 178: 389–390
- Lans, C. Turner, N. Khan, T. Brauer, Y. Ethnoveterinary medicines used to treat endoparasites and stomach problems in pigs and pets in British Columbia, Canada. *Vet. Parasitol.* (2007) 148: 325–340



- Lanusse, C. Factores que afectan la biodisponibilidad plasmática y eficacia de fármacos antihelmínticos. Archivos de medicina veterinaria XXVI. Ni 1. (1994).
- Ley general de Salud en México. título décimo segundo, control sanitario de productos y servicios y de su importación y exportación. (En línea). Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=SaCWAqAAQBAJ&pg=PT328&lpg=PT328&dq=Toda+sustancia+o+mezcla+de+sustancias+de> (2013).
- Lloyd, J. Fitzgibbon, C. Barchia, I. Evaluation of a laboratory test to detect resistance to closantel in *Haemonchus contortus*. Aust Vet J. (2000). 78: 10: 710- 714.
- Lichtenfels J.R.; Pilitt P.A.; Hoberg E.P. New morphological characters for identifying individual specimens of *Haemonchus spp.* (Nematoda: Trichostrongyloidea) and a key to species in ruminants of North America. J Parasitol. (1994). 80:107–119.
- López- Arellano, R. Santander, E. Andrade, J. Alvarez, G. Garduño, J. Morales, e. Quantification of lysine clonixinate in intravenous injections by NIR spectroscopy. Vibrational Spectroscopy. (2009). 51: 255- 262.
- López Espinosa, J. Notas para la historia de la homeopatía. Rev Cubana Med Gen Integr v.15 n.5 Ciudad de La Habana sep.-oct. 1999. (en línea). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0864-21251999000500017](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21251999000500017) (1999).
- Martínez- Espinoza, R. Arguello- Garcia, R. Saavedra, E. Ortega- Pierres, G. Albendazole induces oxidative stress and DNA damage in the parasitic protozoan *Giardia duodenalis*. Frontiers in microbiology. (2015). 6: I. aug. Art 800.
- Meia, L. Fusheng, J. Xiangli, Y. Zhiqi, M. Engineering Isoprenoid Biosynthesis in *Artemisia annua* L. for the Production of Taxadiene: A Key Intermediate of Taxol. Hindawi Publishing Corporation BioMed Research International. Vol. 2015, ID artículo 504932. (2014).

- Molento, M. Verissimo, C. Amarante, A. Van Wyk, J. Chagas, A. Araujo, J. Borges, F. Alternativas para o controle de nematoides gastrintestinais de pequenos ruminantes *Arq. Inst. Biol.*, São Paulo. (2013) 80: 2: 253-263.
- Montalvo, X. López, M. Vázquez, V. Liébano, E. Mendoza, P. Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala. *Téc. Pecu. Méx.* (2006). 44 (1): 81- 90.
- Montserrat, G. Posible interacción entre determinados alimentos, hábitos y ondas electromagnéticas en relación con la actividad de los remedios homeopáticos. *Rev Med Homeopat.* (2013). 6(1):2-9
- Morales, G. Pino, L. Sandoval, E. Florio, J. Jiménez, D. Niveles de infestación parasitaria, condición corporal y valores de hematocrito en bovinos resistentes, resilientes y acumuladores de parásitos en un rebaño criollo Río Limón. *Bioline international. Instituto Nacional de Investigaciones agrícolas de Vneezuela.* (2006). 24: 3: 333- 346.
- Muñoz, R. Bertomeu, J. La historia de la ciencia en los libros de texto: la(s) hipótesis de avogadro. *Enseñanza de las ciencias*, 2003, 21 (1): 147-159.
- Nweze, N. Ogidi, A. Ngongeh, L. Antlehmintic potential of three plants used in Nigerian ethnoveterinary medicine. *Pharmaceutical biology.* (2013). 51: 3: 311- 315.
- OMS. Publicación oficial de la organización mundial de la Salud. *Estrategia de la OMS sobre la Medicina Tradicional 2002- 2005.* Ginebra. (2002). 11.
- Rabel, B. McGregor, R. Douch, P. Improved bioassay for estimation of inhibitory effects of ovine gastrointestinal mucus and anthelmintics on nematode larval migration. *International journal for parasitology.* (1994). 24: 5: 671- 676.
- Rialch, A. Vatsya, S. Ranjan, R. Detection of benzimidazole resistance in gastrointestinal nematodes of sheep and goats of sub- Himalyan region of northern India using different tests. *Veterinary parasitology.* (2013). 198: 312- 318.

- Rodríguez, J. Antecedentes históricos: la memoria del agua. En J. Baeza Rodríguez-Caro (Ed.), *Las aguas minerales en España* (1-15). Madrid: Instituto Geológico y Minero de España. (2001).
- Rong Liu, Hui- Fen, D. Ming- Sen, J. Artemisinin: the gifts from traditional chinese medicine not only for malaria control but also for schistosomiasis control. *Parasitol Res.* (2012). 110: 2071- 2074.
- Sandoval, E. Morales, G. Jimenez, D. Pino, L. Marquez, O. Efecto del albendazol incorporado a un bloque multinutricional sobre la eliminación de huevos de nematodos gastrointestinales y ganancia de peso en ovejas en estabulación. *Zootecnia tropical.* (2009). 27: 3: 309- 314.
- Sagarpa. Programa nacional de monitoreo y control de residuos tóxicos y contaminantes en alimentos de origen animal. (2013).
- Saunders, G. Wasmuth, J. Beech, R. Laing, R. Hunt, M. Naghra, H. Cotton, J. Berriman, M. Britton, C. Gilleard, J. Characterization and comparative analysis of the complete *Haemonchus contortus* b-tubulin gene family and implications for benzimidazole resistance in strongylid nematodes International. (2013).
- Santos, M.C., Xavier, J.K., Amarante, M.R.V., Bassetto, C.C., Amarante, A.F.T. Immune response to *Haemonchus contortus* and *Haemonchus placei* in sheep and its role on parasite specificity. *Vet. Parasitol.* 2014. 203: (1–2), 127–138.
- Silva, N. Ganancia de peso y características de la canal en ovinos de pelo. Tesis presentada como requisito parcial para obtener el grado de maestro en ciencias. Universidad Autónoma de Chihuahua. (2006).
- Song, Y. Desta, K. Kim, G. Lee, S. Kim, Y. Jin, J. Abd, L. Shin, H. Shim, J. Shin, S. Polyphenolic profile and antioxidant effects of various parts of *Artemisia annua* L. *Biomedical chromatography.* Article in press. (2015).
- Squires, J. Ferreira, J. Lindsay, D. Zajac, A. Effects of artemisinin and *Artemisia* extracts on *Haemonchus contortus* in gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Veterinary parasitology.* (2011). 175: 103- 108.

- Sun, D. Infrared spectroscopy for food quality analysis and control. Primera edición. Editorial Elsevier (en línea). Disponible en: <http://books.google.com.mx/books?id=bOWUDEiYshsC&pg=PA80&dq=quimiometria+nir&hl=es&sa=X&ei=L0hIVMP3K5CGyASIsIKQDA&ved=0CCcQ6AEwAA#v=onepage&q&f=false>. (2009).
- Tadesse, D. Eguale, T. Giday, m. Mussa, A. Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Maesa lanceolata* and *Plectranthus punctatus* against *Haemonchus contortus*. Journal of ethnopharmacology. (2009). 122: 240-244.
- Tang, J. Zhao, J. Li, Z. Ethanol extract of *Artemisia sieversiana* exhibits anticancer effects and induces apoptosis through a mitochondrial pathway involving DNA damage in COLO- 205 colon carcinoma cells. Bangladesh journal of pharmacology. (2015). 10: 3: 518- 523.
- Tariq, K. A.; Chishti, M. Z.; Ahmad, F.; Shawl, A. S. Antihelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. Veterinary Parasitology, Amsterdam, (2009) 160: 83–88.
- Toribio, S. Toso, R. Hallu, R. Valoración del efecto del ricobendazol sobre la carga parasitaria y la ganancia de peso en ovinos. (En línea). Disponible en: [biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/anuavet/n1999a12toribio.pdf](http://biblioteca.unlpam.edu.ar/pubpdf/anuavet/n1999a12toribio.pdf). (1999).
- Trigg, P. Qinghaosu (artemisinín) as an antimalarial drug. Capítulo 2. Economical and medicinal plant research. (en línea). Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?hl=es&lr=&id=2Gloum1tJnIC&oi=fnd&pg=PA19&dq=artemisininas&ots=h6sBD0ycJt&sig=gPPtMEavXfF - hJ5PF8L3Hzue0o#v=onepage&q=artemisininas&f=false>. (2011).
- Turner M. J. & Schaeffer J. M. Mode of action of ivermectin. In: Ivermectin and Abamectin (Edited by Campbell W. C.), pp. 73-88. Springer, New York.
- Valdéz, L. Wong, M. (2006). Efecto del estado nutricional sobre la variación del índice de FAMACHA en corderos infectados experimentalmente con *Haemonchus contortus*. Tesis para obtener el título de médico veterinario zootecnista. (1989).

- Van Agtmael, M. A.; Eggelte, T. A.; Boxtel, C. J. van. Artemisinin drugs in the treatment of malaria: from medicinal herb to registered medication. *Kidlington*, (1999). 20: 199-205.
- Van Wyk, J. Mayhew, E. Morphological identification of parasitic nematode infective larvae of small ruminants and cattle: A practical lab guide. *Journal of Veterinary Research*. (2013). 80: 1.
- Vargas, C. FAMACHA. Control de Haemonchosis en caprinos. *Agronomía mesoamericana*. (2006). 17 (1): 79- 88.
- Vásquez, V. Najera, R. Variación mensual de nemátodos gastroentéricos en ovinos de clima tropical húmedo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. Portal Inifap. (En línea). Disponible en: {<http://revistapecuaria.inifap.gob.mx/index.php/Pecuarias/article/view/3400/2820>} (1986).
- Vercruysse, J. Holdsworth, P. Letonja, T. Conder, G. Hamamoto, K. Okano, K. Rehbein, S. International harmonization of anthelmintic efficacy guidelines (Part 2). *Veterinary parasitology*. (2002). 103: 277- 297.
- Wang, Z. Yang, L. Yang, X. Zhan, X. Synthetic communications: An international Journal for rapid communication of synthetic organic chemistry. *Synthetic communications*. (2014). 44: 14: 1987- 2003.
- Wood, I. Amaral, N. Bairden, K. Duncan, J. Kassai, T. Malone, J. Pankavich, J. Reinecke, R. Slocombe, O. Taylor, S. Vercruysse, J. World association for the advancement of Veterinary Parasitology. (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). *Veterinary parasitology*. (1995). 58: 181- 213.
- Yuan, Y. Liu, W. Zhan, Q. Xiang, L. Liu, X. Chen, M. Lin, Z. Wang, Q. Liao, Z. Overexpression of artemisinic aldehyde 11 (13) reductase gene enhanced artemisinin and its relative metabolite biosynthesis in transgenic *Artemisia annua* L. *Biotechnology and applied biochemistry*. (2014). 00: 00: 1- 7.
- Zacharias, F. Guimaraes, F. Araújo, R. Almeida, M. Ayres, M. Bavia, M. Mendonça-Lima, M. Effect of homeopathic medicines on helminth Parasitism

and resistance of *Haemonchus contortus* infected sheep. *Homeopathy* 97, 145–151. The Faculty of Homeopathy. (2008).

- Zeng, Y. Jiang, J. Lao, H. Guo, J. Lun, Y. Yang, M. Antitumor apoptotic activities of the chemical constituents from the ethyl acetate extract of *Artemisia indica*. Artículo en prensa. (2015). 11: 3: 2234- 2240.
- Zhao, K.; Song, Z. The pharmacokinetics of dihydroqinghaosu given orally to rabbits and dogs (chinese). *Acta Pharmaceutica Sinica*, Beijing. (1990).25: 161–163..
- Zhu, L. Dai, J. Yang, L. Qiu, J. In vitro ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Vet. Parasitol.* (2013). 195: 112- 117.

## Anexo 1: PAGE-SDS.

- ✓ Se realizó un gel separador al 12% (Agua: 3,3 uL; mezcla de acrilamida al 30%: 4,0 uL; 1,5 M tris (pH 8,8): 2,5 uL; SDS al 10%: 0,1; Persulfato de amonio al 10%: 0,1 uL; TEMED: 0.004uL)
- ✓ Se colocó la mezcla anterior entre los vidrios para electroforesis, se completó con agua para alinear, se dejó hasta formar una fase sólida.
- ✓ Se preparó el gel concentrador: (Agua: 2 uL; Mezcla de acrilamida al 30%: 0,5uL; 1,0 M de Tris (pH 6,8): 0,38; SDS al 10%:0,03; Persulfato de amonio al 10%: 0,03; TEMED: 0,003uL).
- ✓ Se adicionó y se puso el peine hasta que se formó una base sólida.
- ✓ Se adicionaron en la primera columna el control, se adicionan las muestras de *Artemisia cina* a las siguientes concentraciones: 5CH, 10CH, 15CH, 20CH, 25CH y 30CH.
- ✓ Se adicionó el buffer de carga, se conectaron los polos y se dejó alrededor de tres horas.
- ✓ Se retiró el gel y se introdujo en azul de coomasie y se dejó por 12 horas (Inifab, 2014).

## **Anexo 2: Ensayo de Bradford.**

La metodología que se siguió fue descrita en el manual de laboratorio de la Unidad de Helmintología de el Instituto de Investigaciones Científicas y Forestales (Inifab, 2014)

Se temperizó la solución concentrada de colorante para Bradford a temperatura ambiente. Se homogenizó la solución y se diluyeron 4ml de colorante de Bradford en 16ml de agua destilada.

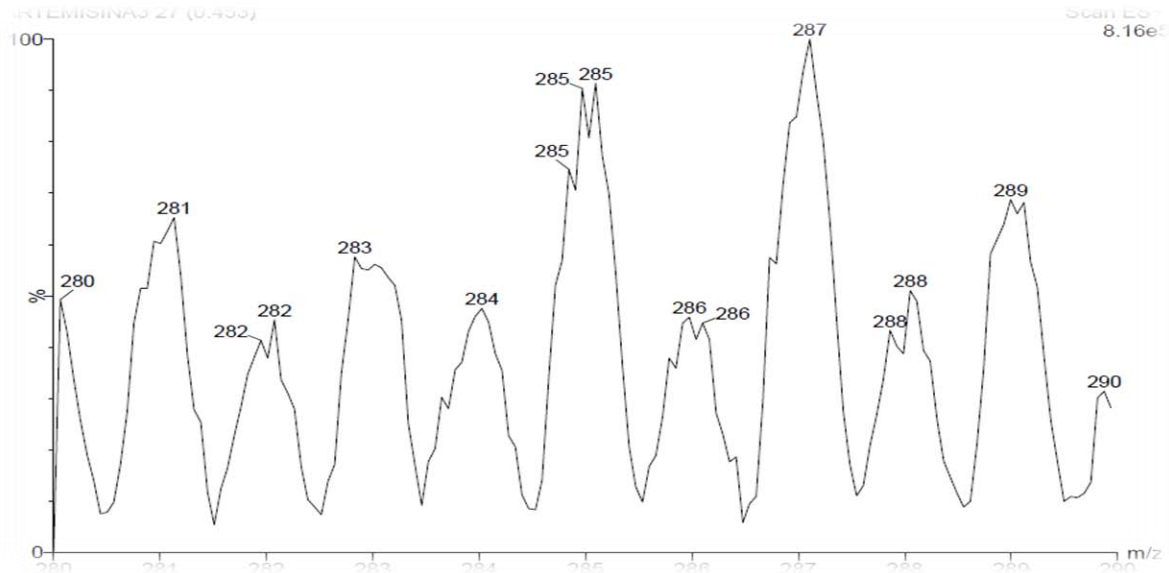
- ✓ Se diluyeron 300uL de la solución de proteína objetivo en 2,7ml de PBS 1X a pH de 8,0. Relación de proteína 1:9.
- ✓ Se diluyeron 30 uL de la solución de proteína objetivo (soluble) en 2,97 ml de PBS 1X pH 8,0. Relación de proteína: 1:99.
- ✓ Se diluyeron 3 uL de la solución de proteína objetivo en 2,997 ml de PBS 1X pH 8,0. Relación de proteína: 1:999
- ✓ Se preparó un stock de BSA a 1mg/ml diluyendo 0,010 g de BSA en 10ml con PBS pH 8,0, estéril.
- ✓ Para la curva patrón se pusieron 800 uL de cada una de las concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) a concentraciones de 0, 1, 2, 3,4 en tubos de ensayo de 1.5 ml, la curva se realizó por triplicado.
- ✓ De la misma manera se pusieron 800 uL de cada una de las diluciones de la muestra objetivo, a las cuales se les determinó la concentración protéica. Por cada muestra problema se realizaron las lecturas de las tres diluciones por duplicado para minimizar el error de lectura.
- ✓ Se agregó 200 uL de colorante de Bradford 1X filtrado a cada uno de los tubos a cuantificar, se agito y se dejaron reposar siete minutos a temperatura ambiente.
- ✓ Se realizaron las lecturas a 595 nm en espectrofotómetro en cubeta de cuarzo de 1ml.
- ✓ Se realizó la regresión lineal de los datos de la dispersión en Excel y se halló la ecuación de la gráfica.



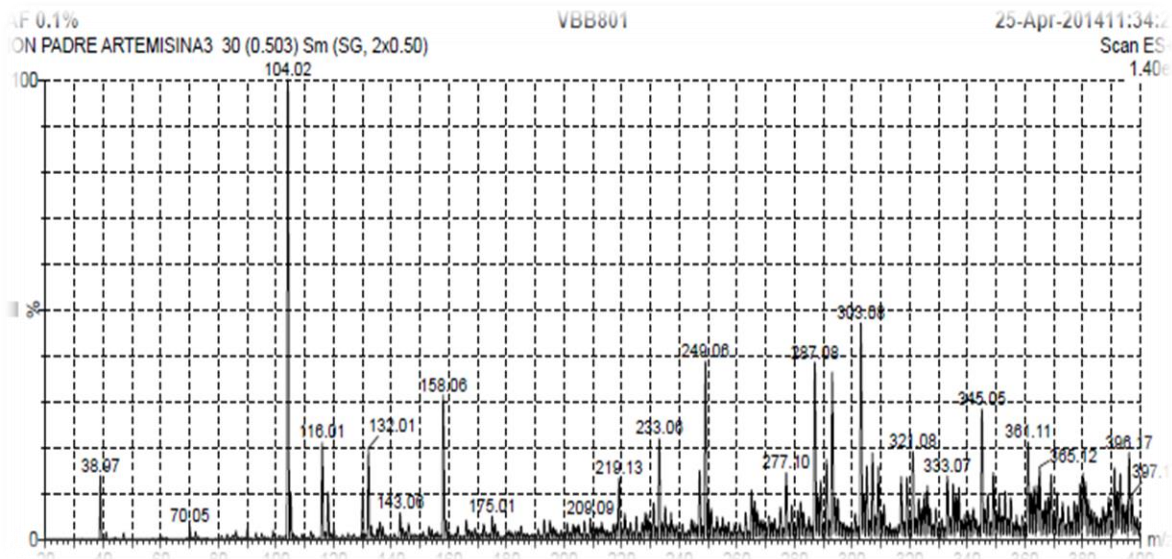
### Anexo 3: Análisis de espectroscopia de masas de artemisininas

Análisis de espectroscopia de masas de artemisininas en extracto etanólico de *Artemisia cina*, compuesto homeopático *A. cina* 30CH y fracciones obtenidas del extracto etanólico de *A. cina*.

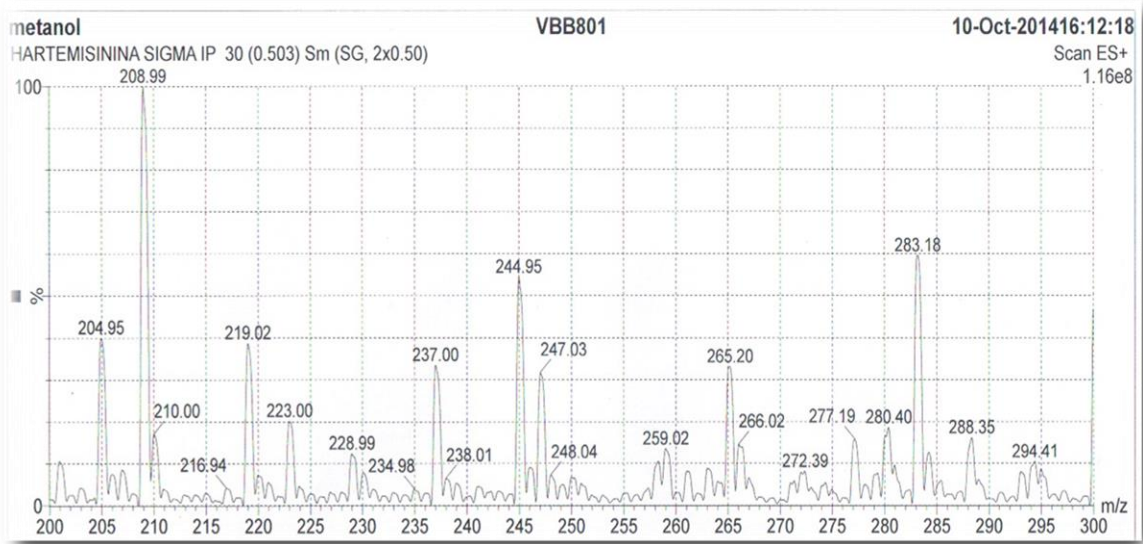
Espectrofotometría de masas de *A. cina* 30CH de 280 a 290 m/z



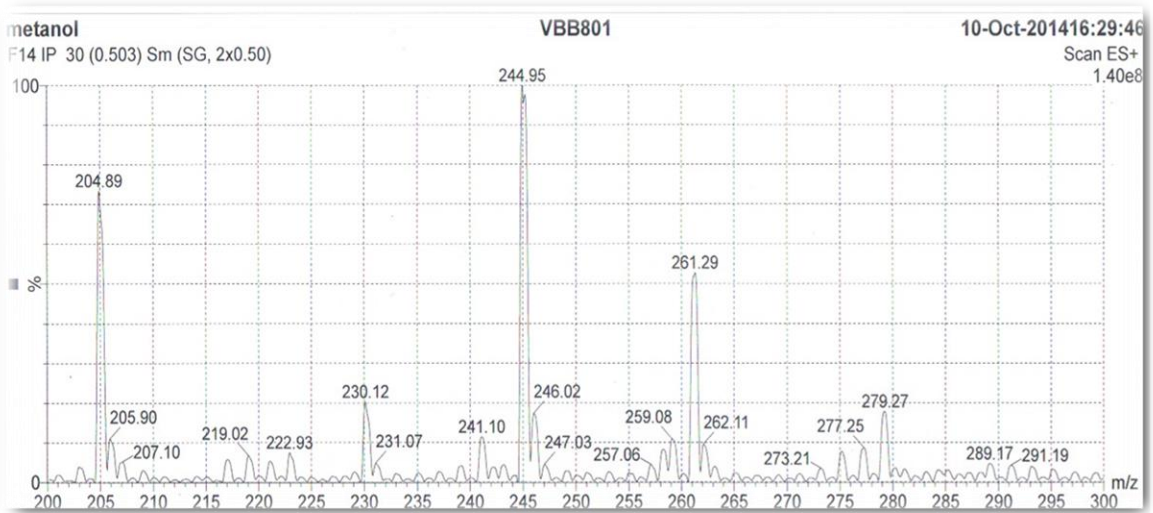
Espectrofotometría de masas de *A. cina* 1CH barrido de 20 a 400 m/z



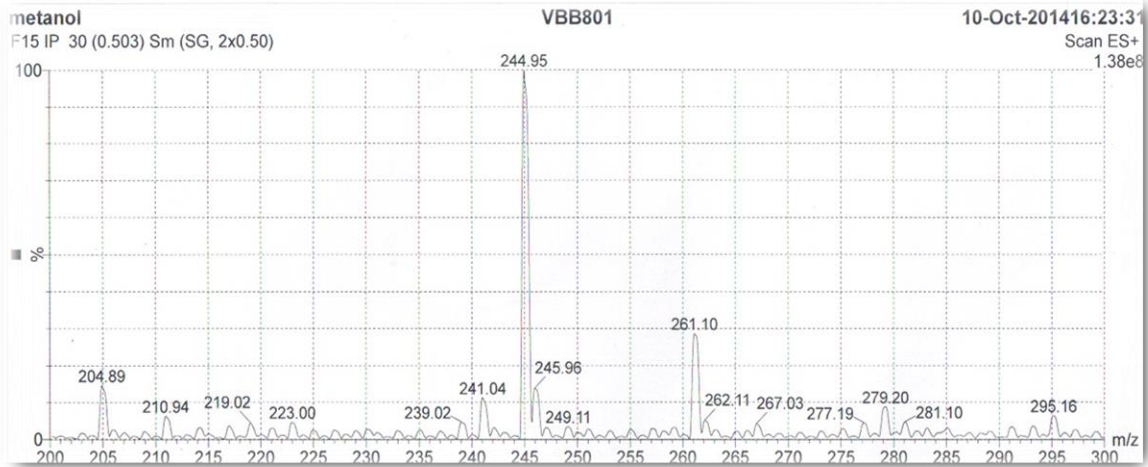
Espectrofotometría de masas de artemisininas Sigma®



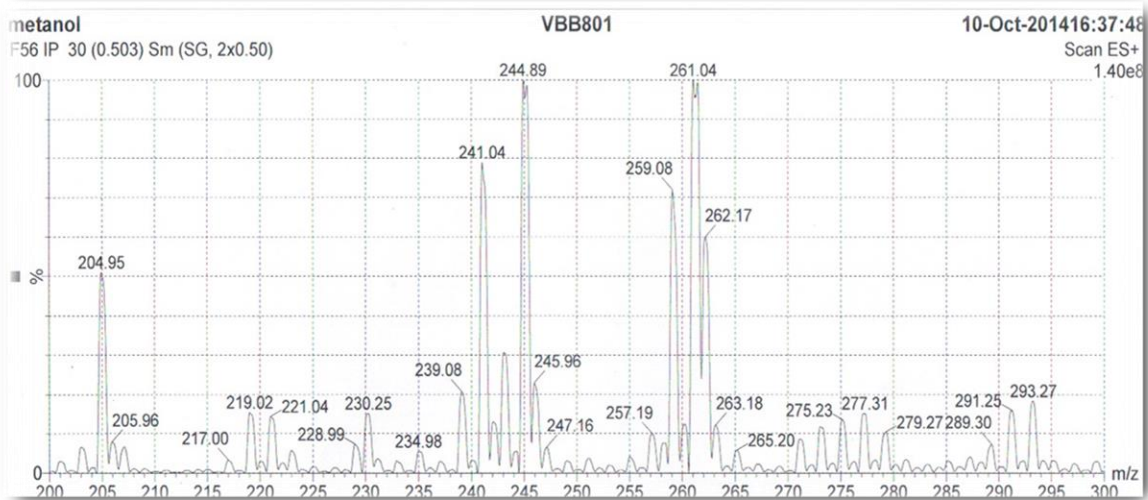
**Espectrofotometría de la fracción Ac3a**



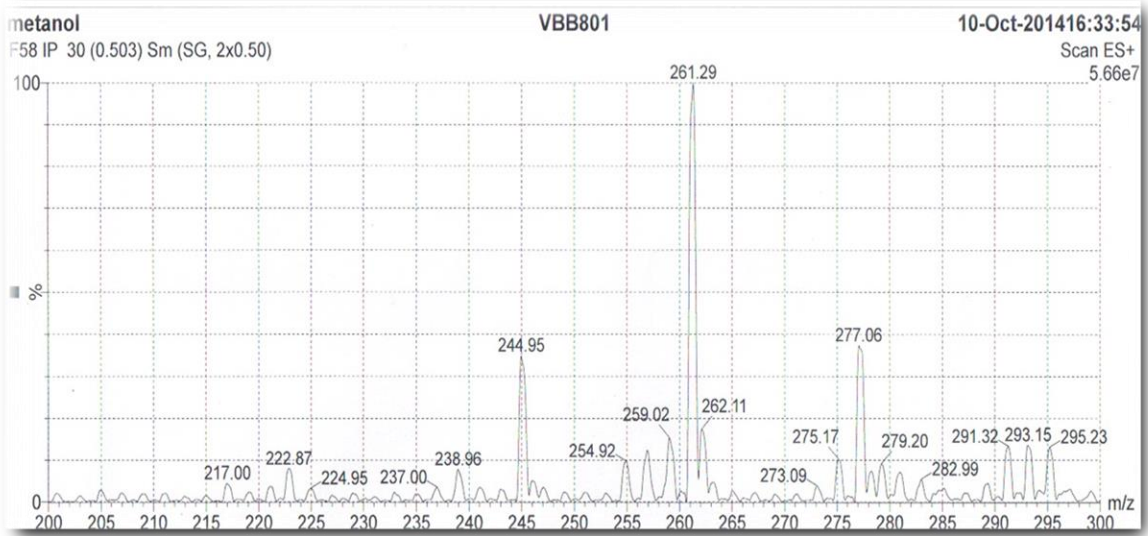
**Espectrofotometría de masas de la fracción Ac3b**



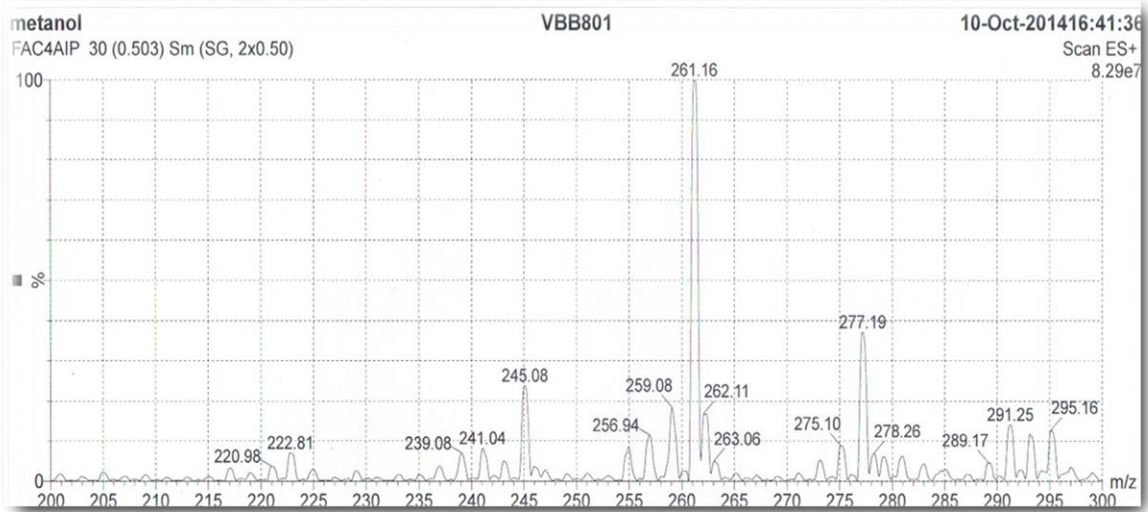
**Espectrofotometría de masas de la fracción Ac3i**



**Espectrofotometría de masas de la fracción Ac3k**



### Espectrofotometría de masas de la fracción Ac4a



## **Anexo 4: Metodología para la separación de artemisininas de *A. cina*.**

La metodología base se siguió como lo reporta Giang y col (2013) para el fraccionamiento del extracto etanólico de *A. japonica*.

1. Se deshidrató el extracto etanólico de *A. cina* por medio de un rotavapor hasta liofilizar.
2. Se realizó una partición (se mezclan dos líquidos inmiscibles como lo es el hexano y el metanol: las sustancias no polares se mezclan con el hexano y las sustancias polares se mezclan con el metanol) líquido: líquido con hexano: metanol 3:1, se reconstituyó el liofilizado en metanol, y se realizaron tres pases con hexano a un volumen de 120 mL. Se obtuvieron las fracciones hexánica y metanólica y se concentraron por medio del rotavapor y se dejó en la campana de desecación por 20 minutos.
3. La fracción hexánica que no se liofilizó, se le añadió etanol y acetona y se dejó 12 h en la campana de desecación.
4. Se realizó una columna VLC (Columna de cromatografía al vacío) para retirar clorofilas con diámetro de 5cm, longitud 7cm y volumen de 250 ml. Se utilizó como fase estacionaria tonsil, se adicionó hasta obtener una masa compacta, y se utilizó hexano como solvente.
5. Se filtró el hexano en sílice para eliminar impurezas.
6. Se aplicó vacío y se realizaron seis pasos con hexano 100%, el séptimo paso se realizó con hexano:acetona (90:10), el octavo paso con hexano: acetona (80:20) y el pase final con acetona 100%.
7. Se realizaron placas de cromatografía de las ocho fracciones comparando con artemisinina comercial (Sigma-Aldrich, St Louis Missouri)
8. Se concentraron las fracciones Ac2b, Ac2c y Ac2d.
9. Se realizó una columna de gravedad con sílice para la fracción Ac2b, con un diámetro de 1cm, altura del adsorbente: 15cm y longitud de la columna de 60 cm.
10. Se disolvió el sílice con hexano y se adicionó a la columna hasta que quedó una masa compacta.

11. Se realizaron pases con hexano 100%, acetona y metanol de las siguiente forma (Cuadro numero?):

Pase	Hexano	Acetona	Metanol
1- 26	100	-	-
27- 49	99	1	-
50-54	97	3	-
55- 66	95	5	-
67- 77	93	7	-
78	-	100	-
79	-	-	100

Se realizaron placas por cromatografía para determinar compuestos parecidos y se concentraron.

12. De la fracción Ac3k se realiza una placa preparativa en hexano 100% ya que esta mostraba artemisininas en su placa cromatográfica.

13. Se realizó un raspado de la placa y los residuos de sílice se mezclaron con hexano y se concentraron en rotavapor y se realizó cromatografía en capa fina y se comparó con artemisininas.

14. Se tomó la fracción metanólica y se realizó una columna VLC, con sílica, se utilizan como disolventes: Acetato de etilo: metanol de la siguiente manera:  
Cuadro?

Fracción	Disolvente	Concentración
0	AcOEt/Metanol	100
1	AcOEt/Metanol	90:10
2	AcOEt/Metanol	80:20
3	AcOEt/Metanol	70:30
4	AcOEt/Metanol	60:40
5	AcOEt/Metanol	50:50
6	AcOEt/Metanol	40:60
7	AcOEt/Metanol	30:70

8	AcOEt/Metanol	20:80
9	AcOEt/Metanol	10:90
10	Metanol	100
11	Metanol	100

## **Anexo 5: Ensayo de eclosión de huevos.**

Ésta técnica se realizó siguiendo la metodología citada por Coles y col., 1992; Zhu y col, 2013; Rialch y col, 2013; Carvalho y col, 2012.

1. Colección de huevos
2. Se homogenizaron las muestras de materia fecal con un agitador en solución salina fisiológica.
3. Se formaron dos fases y por pipeteo se colectó la fase sobrenadante.
4. Se puso ésta fase en tubos para centrifuga y se hicieron 7 lavados hasta que los huevos estuvieron en el fondo de los tubos (3000g/ 5min).
5. Se unieron los concentrados y se cuantificaron.
6. Se aplicaron los tratamientos *Artemisia cina* 30CH (20 uL), agua (20uL), albendazol a 300mg/ml (20uL alcohol etílico (20uL), sólo huevos 20 uL, las fracciones: Ac3a, Ac3b, Ac3e, Ac3h, Ac3k, Ac4b, artemisinina (éstas a 1mg/ml y a 0.1mg/ml) en placas de 96 pozos con tres repeticiones cada una.
7. Se adicionaron aproximadamente 100 huevos a cada pozo dejando una fila y una columna entre ellos para evitar contaminación?
8. Se Incubó a 27°C por 48 h
9. Se añadieron gotas de lugol para fijar la muestra y se cuantificaron 100 huevos. El criterio de evaluacion fue el siguiente: muertos, embrionados o larvas 1. Se utilizó microscopio en un objetivo 40X
10. Se determinó el porcentaje de inhibición de la eclosión considerando sólo el huevo con o sin larva dentro. Los resultados fueron analizado comparados con un control sin tratamiento, sólo agua



## **Anexo 6: Ensayo de desarrollo larvario.**

La técnica se realizó siguiendo la descripción de Costa y col, 2008; Tadesse y col, 2009; Zhu y col, 2013.

1. Los huevos se colectaron como se describió en la técnica anterior
2. En placas para ELISA de 96 pozos se colocaron 200 huevos por pozo y se incubaron a 27°C por 48 horas para obtener el primer estadio larvario.
3. Se trataron las L1 con *A. cina* 30CH (20 uL), agua (20 uL), albendazol (300mg/ml, 20 uL), alcohol (92%, 20 uL), fracciones: Ac3a, Ac3b, Ac3e, Ac3h, Ac3k, Ac4b, artemisinina (éstas a 1mg/ml). Se Incubaron por 6 días a 27°C.
4. La lectura se realizo adicionando una gota de solución de Lugol. El criterio de evaluacion se determino por los diferentes estadios larvarios.

## Anexo 7: Ensayo de migración larvaria.

Técnica descrita por: Lloyd, 2000; Zhu, 2013; Bizimenyera y col, 2006; Rabel y col, 1994; Rothwell y col, 1993; Hernández y col, 2011

1. Se obtienen L3 por cultivo larvario luego de 7 días.
2. Se cuantifican las L3 y evalúa su viabilidad.
3. Se coloca alrededor de 200 L3 en papel para microscopio de inmersión, dentro de un tubo Falcon de 20 ml. Se adicionan al tubo Falcon 12ml de PBS 1X
4. Se aplican los tratamientos *Artemisia cina* 30CH (20 uL), agua (20uL), albendazol a 300mg/ml (20uL alcohol etílico (20uL), sólo huevos 20 uL, las fracciones: Ac3a, Ac3b, Ac3c, Ac3d, Ac3e, Ac3f, Ac3g, Ac3h, Ac3i, Ac3j, Ac3k, Ac3l, Ac3m, Ac4a, Ac4b, Ac4c, Ac4d, artemisinina (éstas a 1mg/ml y a 0.1mg/ml) con tres repeticiones cada una. Se incuban por tres horas a 28°C.
5. Se cuentan cuántas larvas migraron del papel al fondo del tubo.
6. El porcentaje de migración se calcula como  $m/t*100$ , donde T es el número total de larvas 3 depositadas en el papel y m es el número de larvas 3 que migraron con éxito a través de él.
7. Se realizan tres repeticiones del mismo.

## **Anexo 8: Ensayo de inhibición de la migración larvaria con L<sub>3</sub> desnudas.**

Técnica descrita por: Rabel y col (1994)

1. Se obtienen larvas 3 por cultivo larvario luego de 7 días.
2. Se cuantifican las larvas y evalúa su viabilidad.
3. Se desnudan con hipoclorito al 0.187%. Se realizan dos lavados con PBS 1X.
4. Se colocan alrededor de 200 larvas 3 en papel para microscopio de inmersión, dentro de un tubo Falcon de 20 ml. Se adicionan al tubo Falcon 12ml de PBS 1X
5. Se tratan las larvas 3 desnudas con *A. cina* 30CH (20 uL), agua (20 uL), albendazol (300mg/ml, 20 uL), alcohol (92%, 20 uL), fracciones: Ac3a, Ac3b, Ac3e, Ac3h, Ac3k, Ac4b, artemisinina (éstas a 1mg/ml y a 0.1mg/ml) con tres repeticiones cada una.
6. Se incubaron por tres horas a 28°C.
7. Se contaron cuántas larvas migraron del papel al fondo del tubo.
8. El porcentaje de migración se calcula como  $m/t \cdot 100$ , donde T es el número total de larvas 3 depositadas en el papel y m es el número de larvas 3 que migraron con éxito a través de él.
9. Se realizan tres repeticiones del mismo.

## **Anexo 9: Ensayo de explantes abomasales.**

Se realizó según la técnica descrita por Jackson y col (2004), Anexo 8:

1. Se obtuvieron larvas 3 de un ovino donador de la Fes Cuautitlán, las larvas se concentraron a 35 ml, se desnudaron con cloro al 0.187%, se realizaron 4 lavados con agua destilada y tres lavados con PBS 1x, se utilizaron alrededor de 2500 larvas 3 en tubos de vidrio y se distribuyeron en los siguientes grupos: control, Levamisol (7.5mg/ml), Artemisinina Sigma® (1mg/ml), Ac3k (1mg/ml), Ac3b (1mg/ml), Ac3a (1mg/ml), Ac3h (1mg/ml), Ac3i (1mg/ml), Ac4b (1mg/ml).
2. Las larvas se incubaron por una hora y media y se lavaron con PBS 1X tres veces.
3. Se obtuvo un abomaso de un animal en rastro, se trasladó al laboratorio en nevera a 37°C, se abrió por la curvatura menor, se lavó con solución salina fisiológica (SSF) 0,85% a 37°C.
4. Se realizaron cortes circulares del abomaso para obtener 27 explantes, se colocaron en placas de seis pozos con medio Hanks tibio y Hepes a 20 mmol y 1Lt de agua estéril; el tiempo entre la obtención del abomaso y colocar los explantes fue de tres horas.
5. Se colocaron cilindros sobre el tejido con 2500 larvas 3 por cada pozo y se incubaron a 37°C por tres horas.
6. Se sacaron los explantes de la estufa y se lavaron los cilindros en tubos falcon con SSF 0.85% en 25ml .
7. Se lavó el tejido con SSF 0.85% por inmersión 30 veces en 25 ml.
8. Se colocaron los explantes en el tercer tubo falcon con 50ml de solución digestora (pepsina 1% y HCl 1%) a 37°C por 84 horas.
9. El contenido de cada tubo se fijó con iodo helmintológico y se tomó una alícuota del 2% de cada tubo y se observó al estereomicroscopio.
10. Se estimó la cantidad de larvas asociadas al tejido con la siguiente fórmula:



Donde DL: es el número de larvas 3 en digestión y TLP es total de larvas 3 en el tubo de lavado, en el tubo de jugado y de digestión.