



***Artemisia cina* 30 CH como tratamiento homeopático contra el
*Haemonchus contortus***



Rosa Isabel Higuera-Piedrahita ^{a*}

María Eugenia López-Arellano ^b

Raquel López-Arellano ^c

César Cuenca-Verde ^c

Jorge Alfredo Cuéllar-Ordaz ^c

^a Universidad Nacional Autónoma de México. Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Carr. Cuautitlán-Teoloyucan Km 2.5, Col. San Sebastián Xhala. Cuautitlán, Estado de México, México.

^b Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad (CENID-SAI). Jiutepec, Morelos, México.

^c Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán, Estado de México, México.

*Autor de correspondencia: rositah_10@hotmail.com

Resumen:

El problema de la resistencia a los antihelmínticos es ampliamente reconocido en la producción ovina. Por lo tanto, es necesario integrar nuevos métodos de control contra los nematodos gastrointestinales (NGI). El objetivo de este estudio fue evaluar la toxicidad de *Artemisia cina* 30 CH como un producto homeopático contra *Haemonchus contortus* en ensayos *in vitro* e *in vivo*; *A. cina* 30 CH se obtuvo de un laboratorio comercial, y la confirmación de la artemisinina como ingrediente clave se realizó con espectrometría de masas. *A. cina* 30 CH y la molécula registrada como antihelmíntica de la artemisinina se

usaron para inhibir la eclosión del huevo (IEH) y la migración larval (L₃) de *H. contortus* (IML). Además, tres grupos de 10 corderos infectados naturalmente con NGI se trataron con *A. cina* 30 CH y albendazol, y 10 fueron utilizados como control. La infección parasitaria se controló a los 0, 7, 14 y 28 días post-tratamiento (PT) para determinar el número de huevos por gramo (HPG) y el índice FAMACHA. Los datos *in vitro* mostraron 100 % de IEH y 64.7 % de IML por *A. cina* 30 CH, y se observó actividad no letal con la artemisinina. La toxicidad de *A. cina* 30 CH contra *H. contortus* en corderos infectados se observó después de 7 días de infección. La administración de *A. cina* 30 CH produjo una reducción de 69 % de EPG a los 28 días PT, similar al albendazol ($P < 0.05$). En conclusión, *A. cina* 30 CH tuvo la capacidad de IEH e IML de *H. contortus* en ensayos *in vitro* y redujo el número de huevos de *H. contortus*, que es el nematodo parásito primario en corderos en pastoreo, con lo que se redujo la infección.

Palabras clave: *Artemisia cina* 30 CH, Artemisinina, *Haemonchus*, Corderos.

Recibido: 14/06/2018

Aceptado: 04/03/2019

Introducción

Los nematodos gastrointestinales (NGI), principalmente *H. contortus*, que es el nematodo más frecuente en las regiones tropicales, se encuentran entre los principales patógenos que reducen la producción animal⁽¹⁾. Durante mucho tiempo, los medicamentos antihelmínticos se han utilizado como el principal método tradicional de control, y solo uno está en el mercado⁽²⁾. Sin embargo, el uso inadecuado de este medicamento ha causado problemas de resistencia en todo el mundo en varias especies de rumiantes^(3,4). La alta prevalencia y la rápida dispersión de la resistencia antihelmíntica han aumentado en los rumiantes domésticos, que muestran resistencia a múltiples fármacos antihelmínticos en ciertas regiones⁽⁵⁾. En México, se han presentado diversos informes sobre NGI y se están estudiando otras estrategias de control⁽⁶⁾.

El uso de diferentes métodos de control se ha denominado Control Integrado del Parásitos (CIP)⁽⁷⁾. La estrategia de la mayoría de los estudios es centrarse en el control de nematodos altamente patógenos, como *H. contortus* y *Teladorsagia*, en pequeños rumiantes debido a sus hábitos de alimentación sanguínea. La rotación de la pradera, la selección de razas resistentes, el control biológico (es decir, hongos nematófagos y nematodos depredadores)⁽⁸⁾, la desparasitación selectiva, las vacunas y los derivados de la herbolaria tradicional (esto es,

productos homeopáticos) se consideran en el CIP⁽⁹⁾. Sin embargo, se necesitan más estudios de métodos alternativos para reducir el HPG y los nematodos adultos durante los procedimientos de cría⁽¹⁰⁾.

Los compuestos homeopáticos son sustancias de diferentes orígenes, como vegetales o minerales, que tienen efectos terapéuticos. Los productos homeopáticos se preparan siguiendo las instrucciones de la Farmacopea Homeopática^(10,11). Por ejemplo, los productos homeopáticos obtenidos de plantas se adquieren como extractos etanólicos (generalmente), y se diluyen en 99 partes de alcohol hasta alcanzar la concentración deseada (decimal y centesimal) por debajo del número de Avogadro $6.02214 * 10^{23}$. De esta forma, los medicamentos homeopáticos se obtienen con baja inversión y fácil extracción y representan un método seguro de control⁽¹²⁾. Recientemente, varios informes sobre el posible uso de productos homeopáticos con un efecto nematicida han brindado la oportunidad de integrar *A. cina* como un nuevo método de control. *A. cina* es una planta que pertenece a la familia Asteraceae y contiene artemisinina como metabolito activo⁽¹³⁾. Esta planta ha mostrado propiedades antihelmínticas y antipalúdicas⁽¹⁴⁾. Por ejemplo, *A. cina* parece tener un efecto terapéutico potencial contra los parásitos, pero se requieren más estudios para determinar si la especie puede usarse, como un producto homeopático o en su forma natural, como un posible antihelmíntico contra la NGI. *A. cina* está conformada en la concentración de 30 centesimales hannemanianas (CH) según lo registrado por la farmacopea homeopática mexicana (concentración: 10-60M), que es la que se sugiere administrar en rumiantes. El objetivo de este estudio fue determinar la eficacia antiparasitaria de un producto homeopático basado en *A. cina* 30 CH en ensayos *in vitro* e *in vivo* contra una infección natural de pequeños rumiantes con NGI.

Material y métodos

Localidad

El análisis por espectrometría de masas se realizó en el laboratorio 5 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria; el análisis *in vitro*, en los laboratorios 3 y 5 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán (FESC), UNAM, en el Municipio Cuautitlán, Estado de México, y el ensayo *in vivo*, en un rancho en el municipio Mixquiahuala, estado de Hidalgo a 2,100 msnm con un clima semiseco, una temperatura anual de 16.6 ° C y precipitación pluvial de 500 mm⁽¹⁵⁾.

Identificación de artemisinina en *A. cina* 30 CH

Las moléculas de artemisinina se identificaron a partir de productos comerciales de *A. cina* 30 CH (*Millenium Lab*, México). Se utilizó cromatografía líquida de ultrarrendimiento con espectrometría de masas (UPLC / MS) con una columna de fase inversa en modo positivo. Todas las muestras se realizaron de acuerdo con las siguientes condiciones: velocidad de cono 70, Sm (Mn 2 * 0.75) y lectura de UPLC / MS de 200 a 300 m/z en el laboratorio 5 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria. La concentración de *A. cina* 30 CH fue de 10^{-60} M.

Parásitos

Se recogieron heces positivas para huevos de nematodos parásitos de un cordero donador previamente infectado con 5,000 huevos de *H. contortus* L₃, una cepa aislada y mantenida en el FESC, UNAM. Se usó la técnica cuantitativa de McMaster para determinar el número de HPG, y se realizaron técnicas de coprocultivo para recolectar *H. contortus* L₃ a los 21 días después de la infección (PI). Las larvas se mantuvieron a -20 °C hasta su uso (las larvas recuperadas del cultivo larvario se criopreservaron en glicerol; para los bioensayos, las larvas se descongelaron a temperatura ambiente y se verificó 95 % de motilidad).

Bioensayos

Se realizaron dos ensayos *in vitro* diferentes para determinar la inhibición de la eclosión del huevo (IEH) y la inhibición de la migración larval (IML)⁽¹⁶⁾. Todas las técnicas se realizaron con 100 huevos o etapas infecciosas de larvas (L₃) de *H. contortus*. Para cada ensayo, se prepararon tres réplicas y se aplicaron cinco tratamientos de la siguiente manera: 1) 20 µL de *A. cina* 30 CH (10^{-60} M); 2) 100 µl de agua destilada (AD, testigo); 3) 50 mg/ml de albendazol (ABZ, control) (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE. UU.), solubilizado con 0.1 mg / ml de dimetil sulfóxido (DMSO); 4) 20 µl de etanol; y 5) 1 mg/ml de artemisinina (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE. UU.).

El IEH se llevó a cabo en placas ELISA que se incubaron a 28 °C durante 48 h. La lectura de IEH se realizó utilizando la solución de yodo de Lugol, que se agregó a cada envase después de la incubación. Se leyó el volumen total de cada envase ELISA para contar el número de *H. contortus* L1 e IEH activos por envase con un microscopio con aumento de 10 X (Olympus, modelo CK-2, Japón).

El IML recibió un tratamiento similar al IEH, excepto que el ABZ fue reemplazado por levamisol (300 mg / ml). Las larvas también se leyeron usando la solución de lugol después de la incubación. Se leyó el volumen total por depósito para determinar el IML.

Ensayos *in vivo*

Corderos

Treinta corderos de raza Suffolk —16 machos y 14 hembras—, de 3 meses de edad y 20 días después del destete, se infectaron naturalmente con NGI. Todos los corderos se mantuvieron en condiciones semi-estables, pastando en potreros durante el día y en establos por la noche. Los corderos fueron alimentados con concentrado comercial y agua a voluntad. No se aplicó tratamiento antihelmíntico a ningún cordero antes del presente estudio. Todos los corderos fueron positivos para huevos NGI, lo que fue confirmado por las técnicas de McMaster y de coprocultivo.

Diseño experimental

Antes de los tratamientos, los corderos se aleatorizaron en tres grupos de 10 cada uno con el apoyo del paquete estadístico StatGraphics Centurion XV. Los tratamientos se diseñaron de la siguiente manera: el grupo A recibió 1 ml de *A. cina* 30 CH por cada 5 kg de peso corporal (PC) por vía oral (Millenium Laboratories, México) como una dosis única; la concentración de *A. cina* 30 CH fue de 10^{-60} M.⁽¹⁾ El grupo B se trató por vía oral con ABZ a 7.5 mg / kg de peso corporal, y el grupo C, sin tratamiento, se utilizó como testigo. Se recogieron muestras fecales y hematológicas a 1 día de pretratamiento (0 días) y a los 7, 14 y 28 días de postratamiento (PT). Además, se observaba el color de la mucosa ocular utilizando el índice FAMACHA.

Análisis estadístico

Las medias de los huevos de *H. contortus* y las larvas L₃ se compararon entre los tratamientos y los grupos testigo mediante el análisis ANOVA, complementario con la prueba de Tukey para identificar las diferencias entre los tratamientos, utilizando el software StatGraphics Centurion XV. El número de HPG se transformó en $\log_{10} \text{HPG} + 10$ para estabilizar la varianza, y la prueba de diferencia menos significativa (DMS) se aplicó utilizando el software StatGraphics Centurion XV con un diseño completamente al azar que consideró mediciones repetidas a lo largo del tiempo y el tratamiento. Las diferencias con $P < 0.05$ se consideraron significativas.

Nota ética

El manejo de los corderos se realizó de acuerdo con el Reglamento del Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán-UNAM (CICUAE- FESC- UNAM) y está autorizado por el Protocolo No. DC-2014-14.

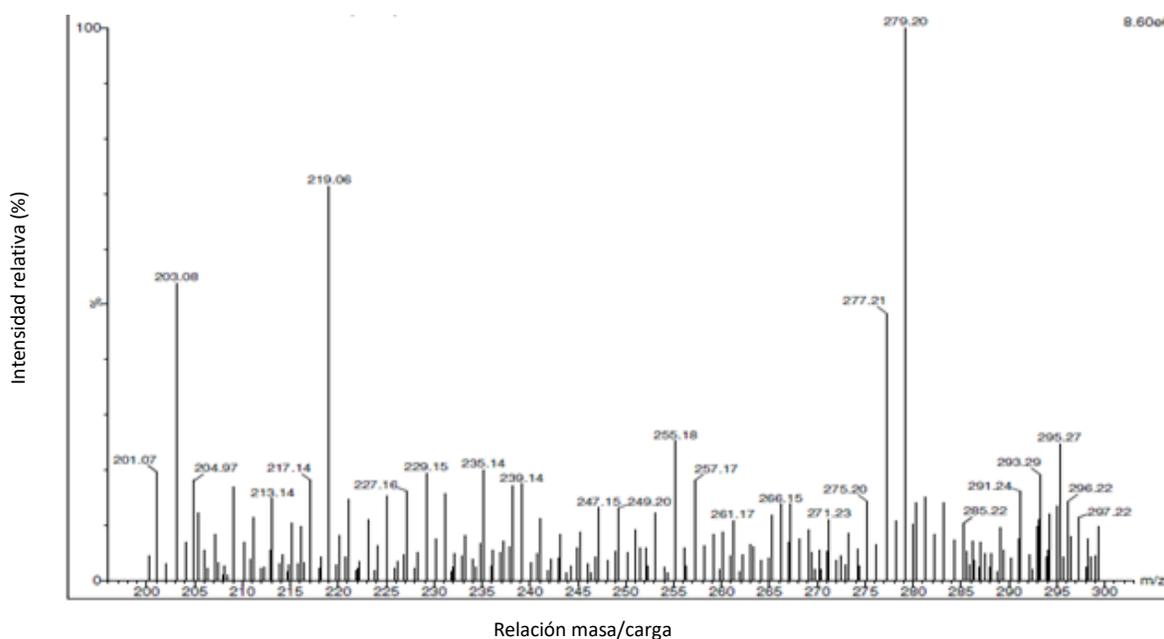
Resultados

Identificación de la artemisinina en *A. cina* 30 CH

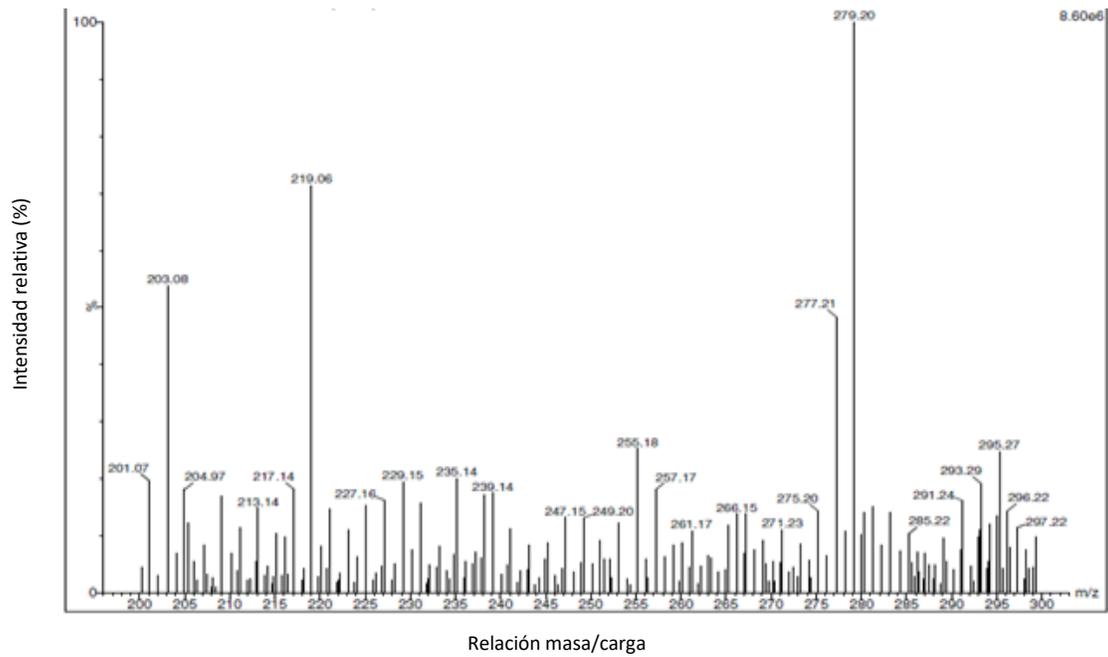
El análisis de espectrofotometría de masas mostró moléculas de artemisinina en los productos comerciales de *A. cina* 30 CH utilizados en el presente estudio. El análisis cromatográfico de *A. cina* 30 CH se realizó para comparar el perfil de los productos comerciales con el reactivo de artemisinina puro. La Figura 1 a-b mostró moléculas de artemisinina correspondientes a *A. cina* 30 CH y el reactivo de artemisinina puro con 279.20 m/z.

Figura 1a-b: Análisis de espectrofotometría de masas de reactivo puro (a) y *A. cina* 30 CH (b), que muestran similitudes entre 283 y 290 m/z

a



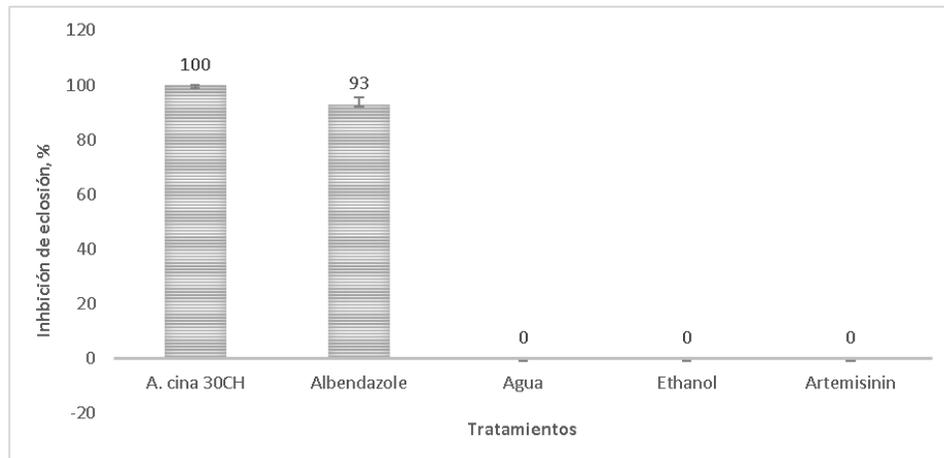
b



Ensayos *in vitro*

IEH. Los datos obtenidos de la evaluación de *A. cina* 30 CH mostraron 100 % de IEH de *H. contortus* *A. cina* después de 48 h; Este resultado fue seguido por el tratamiento ABZ, con 93 %. En contraste, no se observó IEH de *H. contortus* con 80 % de etanol, el reactivo de artemisinina puro y los tratamientos DW no mostraron efecto (Figura 2).

Figura 2: Inhibición de ensayos de eclosión de huevos contra huevos de *Haemonchus contortus* expuestos con *Artemisia cina* 30 CH y tratamientos con albendazol y testigos (artemisinina, agua y metanol)



IML. La *A. cina* 30 CH mostró una inhibición de la migración del 65,7% de las larvas infecciosas de *H. contortus*. Se observaron diferentes resultados con el reactivo de artemisinina puro usado a 0.1 y 1 mg/ml con DW y etanol, con todos los grupos tratados que muestran una migración larval del 100 %, lo que indica que no se observó inhibición en los grupos testigo. El levamisol utilizado como antihelmíntico mostró una eficacia letal del 100 % contra las larvas; por lo tanto, no se observó migración (Cuadro 1).

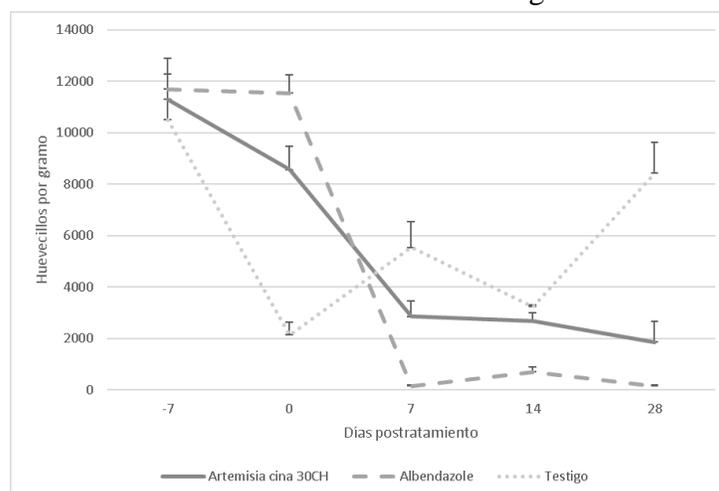
Cuadro 1: Porcentaje de inhibición de la migración larval (IML) contra *Haemonchus contortus* L₃ (X±SE)

Tratamientos	Migración (%)
<i>Artemisia cina</i> 30 CH	35.0 ± 8.1
Levamisol (300 mg/ml)	0
Agua	92.0 ± 12.4
Etanol 80%	86.6 ± 11.5

Eficacia nematocida de *Artemisia cina*

La infección natural con NGI en corderos en pastoreo mostró dos especies principales de NGI: *H. contortus* (75 %) y *T. circumcincta* (25 %). Los corderos infectados para todos los grupos mostraron una media de aproximadamente 2,000 HPG antes del tratamiento (d-0). A través de los siguientes períodos, se observaron diferencias significativas en la reducción de HPG a los 7 y 14 d PT ($P<0.05$) (Figura 3). Además, también se identificaron diferencias significativas entre los grupos A (*A. cina* 30 CH) y B (ABZ) en comparación con el grupo C (testigo, $P<0.05$) a los 7 días.

Figura 3: Huevos por gramo observado a -7, 0, 7, 14 y 28 días después del tratamiento de corderos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales * ($P<0.05$)



Tarjeta de índice de FAMACHA. Para todos los grupos, se determinó que el índice de la tarjeta FAMACHA era de 3.0 a 5.0 en el estudio *in vivo*. Los valores de FAMACHA fueron variables para todos los grupos. Se observaron diferencias importantes a los 14 y 28 d PT para los tratamientos de *A. cina* 30 CH y ABZ (Cuadro 2).

Cuadro 2: Índice FAMACHA de corderos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales y que recibieron *Artemisia cina* 30 CH o albendazol

Tratamiento	Días post-tratamiento				p
	0	7	14	28	
<i>Artemisia cina</i> 30 CH	3.0 ± 0.13 ^a	4.0 ± 0.44 ^{aA}	3.0 ± 0.52 ^{bB}	2.0 ± 0.31 ^{bA}	0.44
Albendazol	5.0 ± 0.26 ^a	3.0 ± 0.21 ^{bB}	2.0 ± 0.30 ^{cA}	1.0 ± 0.22 ^{cA}	0.19
Testigo	3.0 ± 0.25 ^b	2.0 ± 0.29 ^{aB}	1.0 ± 0.20 ^{aA}	3.0 ± 0.71 ^{bB}	0.62

Las letras minúsculas iguales no tienen significación estadística y las letras minúsculas diferentes tienen diferencias estadísticas dentro del grupo ($P < 0.05$). Las letras mayúsculas iguales no tienen significación estadística y las letras mayúsculas diferentes tienen diferencias estadísticas entre grupos ($P < 0.05$).

Discusión

A. cina tiene compuestos químicos, como los terpenoides, que proporcionan actividad insecticida contra la capacidad reproductiva y causan estrés antioxidante en los patógenos^(17,18,19). En los últimos años, resultados importantes identificaron que la artemisinina tiene un posible efecto antihelmíntico⁽²⁰⁾. Por ejemplo, Akkari *et al.*⁽²¹⁾ informaron una dosis letal (DL) de *Artemisia campestris* de 0.8 mg / mL contra *H. contortus* cuando se usa un extracto etanólico. En el presente estudio, *A. cina* 30 CH mostró 100 % de IEH de *H. contortus*, además de eficacia para disminuir la migración larval, resultados similares a los consignados por otros⁽²²⁾. Bashtar *et al.*⁽²²⁾ describieron el extracto etanólico de *A. cina* como eficaz contra el cestodo *Moniezia*. Además, el presente estudio tuvo 64.7 % de IML de *H. contortus* usando *A. cina* 30 CH. Se informó una reducción en la tasa de larvas en ratas infectadas con el nematodo *Trichinella spiralis* cuando las ratas fueron tratadas con *A. cina* 30 CH, *Podophyllum* 0 y *Santoninun* 30 CH (productos homeopáticos) en 68.14%, 84.10 y 81.20 % respectivamente.⁽²³⁾

Por el contrario, se utilizó reactivo puro de artemisinina como control, y no se observó inhibición de la eclosión en huevos ni inhibición de en larvas. Estos resultados sugieren que la ausencia de actividad podría haber sido producida por la conformación química de *A. cina* 30 CH, y un solvente que utilizaba compuestos con hidrógenos y anillos de fenilo, permitiendo así un cambio rápido en la conformación.

Con respecto a la infección natural con NGI y los tratamientos de *A. cina* 30 CH aplicados después de 2 semanas, el ABZ y *A. cina* 30 CH mostraron diferencias significativas ($P<0.05$) en las reducciones en el número de HPG. Estos hallazgos fueron similares a los reportados por Bashtar *et al*⁽²²⁾, quienes encontraron una reducción de los proglótidos de *Moniezia* sp. en animales tratados con *A. cina*. Sin embargo, se requieren más estudios para confirmar el posible efecto antihelmíntico de *A. cina* 30 CH contra las etapas de nematodos usando artemisinina de plantas nativas.

Los tratamientos con *A. cina* 30 CH y ABZ contra la infección natural mejoraron los valores de FAMACHA derivados del hábito de alimentación de sangre de *H. contortus* a los 7 y 14 días después de la administración ($P<0.05$). Cala *et al*⁽¹⁾ encontraron resultados similares, con el apoyo de la artemisinina como un posible metabolito nematocida después de la infección. Demeler *et al*⁽²⁴⁾ mostraron que la anemia causada por la infección por *H. contortus* en corderos tratados con ABZ mostró eficacia nematocida. Una revisión realizada por Kerboeuf *et al*⁽²⁵⁾ sugiere que la actividad de los flavonoides en la estructura y el blanco celular es similar al efecto antioxidante causado por la artemisinina. Aunque se desconoce el mecanismo de acción antihelmíntico de *A. cina*, se necesita la determinación de este mecanismo para su aplicación a los nematodos que infectan a los huéspedes. Se demostró la estabilidad de la artemisinina en el rumen, que era detectable en muestras de sangre a 33 mg de artemisinina/kg de peso corporal⁽²¹⁾. El estudio de *A. cina* 30 CH mostró la participación del fármaco como un antihelmíntico, y debe considerarse como un posible método para su uso en el control de los parásitos nematodos.

Conclusiones e implicaciones

La *A. cina* 30 CH tuvo eficacia antihelmíntica contra la eclosión del huevo de *H. contortus* durante la infección natural. El índice FAMACHA sugiere una reducción de la actividad de los nematodos después del tratamiento con *A. cina* 30 CH y ABZ. Además, este producto demostró la inhibición de la eclosión del huevo y la migración larval, lo que indica su posible efecto antihelmíntico. Para optimizar el uso de este compuesto homeopático, se debe determinar el mecanismo de su acción.

Agradecimientos

Este estudio fue apoyado por PAPIIT IN226217, llamado "Efecto antihelmíntico del extracto etanólico de *Artemisia cina*, semilla de papaya (*Carica papaya*) y taninos condensados sobre el nematodo hematófago *Haemonchus contortus*". Rosa Isabel Higuera-Piedrahita recibió el apoyo parcial de una beca de CONACYT, México. La cepa de *Haemonchus contortus*

utilizada se aisló y se mantuvo en los laboratorios 1 y 3 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, UNAM.

Declaración de conflicto de intereses

Todos los autores declaran no tener conflicto de intereses.

Literatura citada:

1. Peter JW, Chandrawathani P. *Haemonchus contortus*: parasite problem No. 1 from tropics - Polar Circle. Problems and prospects for control based on epidemiology. Trop Biomedicine 2005;22:131–137.
2. Medina-Pérez P, Ojeda-Robertos N, Reyes-García M, Cámara-Sarmiento R, Torres-Acosta J. Evaluation of a targeted selective treatment scheme to control gastrointestinal nematodes of hair sheep under hot humid tropical conditions. Small Ruminant Res 2015;127:86-91.
3. Van der Brom R, Moll L, Kappert C, Vellema P. *Haemonchus contortus* resistance to monepantel in sheep. Vet Parasitol 2015;209:278-280.
4. Geurden T, Chartier C, Fanke J, di Regalbono AF, Traversa D, *et al.* Anthelmintic resistance to ivermectin and moxidectin in gastrointestinal nematodes of cattle in Europe. Int J Parasitol: Drugs and drug resistance 2015;5:163–171.
5. Crook E, O'Brien D, Howell S, Storey B, Whitley N, Burke J, Kaplan R. Prevalence of anthelmintic resistance on sheep and goat farms in the mid-Atlantic region and comparison of *in vivo* and *in vitro* detection methods. Small Ruminant Res 2016;143:89-96.
6. Sales N, Love S. Resistance of *Haemonchus contortus* sp. to monepantel and reduced efficacy of a derquantel/abamectin combination confirmed in sheep in NSW, Australia. Vet Parasitol 2016;228:193-196.
7. González-Garduño R, López-Arellano M, Ojeda-Robertos N, Liébano-Hernández E, Mendoza de Gives P. Diagnóstico *in vitro* y en campo de resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. Arch Med Vet 2014;46:399-405.
8. Torres-Acosta J, Hoste H. Alternative or improved methods to limit gastro-intestinal parasitism in grazing sheep and goats. Small Ruminant Res 2008;77:159-173.
9. Delgado C, Rosegrant M, Steinfeld H, Ehui S, Courbois C. Livestock to 2020: The next food revolution. IFPRI, FAO/UN, ILRI Discussion Paper 1999;28-72.

10. Coop RL, Kyriazakis I. Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitol* 2001;17: 325-330.
11. Farmacopea homeopática Mexicana. 2007.
www.ismhei.com.mx/.../Farmacopea%20Homeopatica%20Dr%20Osvaldo_Martinez.p
. Accessed Nov 10, 2017.
12. Meier L, Torgerson P, Hertzberg H. Vaccination of goats against *Haemonchus contortus* with the gut membrane proteins H11/H-gal-GP. *Vet Parasitol* 2016;229:15- 21.
13. Zhonglei W, Liyan Y, Xiuwei Y, Xiaohua Z. Advances in the chemical synthesis of artemisinin. *Synthetic Communications: An Int J Rapid Communic Synthetic Organic Chemistry* 2014;44(14):1987-2003.
14. 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.
15. Cavalcanti A. Efeito do medicamento homeopático *sulphur* sobre nematódeos gastrintestinais, resistentes a ivermectina, de cordeiros infectados naturalmente. [tesis maestría]. Salvador, Brasil: Universidad Federal de Bahia; 2008.
16. Zacharias F, Guimaraes F, Araújo R, Almeida M, Ayres M, Bavia M, Mendonca-Lima M, Effect of homeopathic medicines on helminth parasitism and resistance of *Haemonchus contortus* infected sheep. *Homeopathy* 2008;97:145-151.
17. Saitbaeva I, Sidyakin G. Artemisin from *Artemisia cina*. *Chem Nat Comp* 1971;7(1):113.
18. Bhakuni R, Jain D, Sharma R, Kumar S. Secondary metabolites of *Artemisia annua* and their biological activity. *Current Sci* 2011;80(11):35-48.
19. Ayuntamiento de Mixquiahuala de Juárez. Enciclopedia de los municipios y delegaciones de México. Mixquiahuala de Juárez, Estado de Hidalgo 2013.
<http://mixquiahuala.hidalgo.gob.mx/> . consultado 30 Nov, 2017.
20. 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.
21. Akkari H, Rtibi K, B´chir F, Rekek M, Aziz M, Gharbi M. *In vitro* evidence that the pastoral *Artemisia campestris* species exerts an anthelmintic effect on *Haemonchus contortus* from sheep. *Vet Res Comun* 2014;38:249-255.

22. Bashtar A, Hassanein M, Abdel-Ghaffar F, Al-Rasheid K, Hassan S, Mehlhorn H, *et al.* Studies on monieziasis of sheep I. prevalence and antihelmintic effects of some plant extracts, a light and electron microscopic study. *Parasitol Res* 2011;108:177-186.
23. Sukul N, Ghosh S, Sinhababu S. Reduction in the number of infective *Trichinella spiralis* larvae in mice by use of homeopathic drugs. *Forsch Komplementarmed Klass Naturheilkd.* 2005;12(4):202-205.
24. Demeler J, Kleinschmidt N, Kuttler U, Koopmann R, Von Samson G. Evaluation of the egg hatch assay and the larval migration inhibition assay to detect anthelmintic resistance in cattle parasitic nematodes on farms. *Parasitol Int* 2012;61:614-618.
25. Kerboeuf D, Riou M, Guegnard F. Flavonoids and related compounds in parasitic disease control. *Mini Rev Med Chem* 2008;8:116-128.