



# UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS  
Y FORESTALES

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAESTRÍA  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**OPCIÓN TERMINAL**  
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *ALLIUM SATIVUM*, *ALLIUM CEPA* Y *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SOBRE HUEVOS Y LARVAS INFECTANTES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* Y *TRICHOSTRONGYLUS COLUBRIFORMIS*

TESIS

QUE PRESENTA

M. V. Z. ANGEL IVAN HUERTA MELGAREJO

PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

ASESOR  
D. C. JOSÉ HERRERA CAMACHO

MORELIA, MICHOACÁN, ENERO 2016.

## AGRADECIMIENTOS

### A DIOS

Por concederme la serenidad para aceptar lo que no puedo cambiar, por darme el valor para cambiar lo que si puedo y la sabiduría para discernir la diferencia.

### A MI FAMILIA

En especial a mis abuelos, **Teresa y Francisco**, por enseñarme la más grande lección de vida, nunca rendirme y terminar todo lo que se comienza.

A mis **padres y hermanos** por apoyarme siempre, por ser la luz que me guía cada día, la razón que me mantiene firme. Mi familia peluche.

A mi primo **Alberto** y tíos “**el Peludo**”, “**el Moso**” y **María** que siempre han creído en mi.

### A MIS AMIGOS

A todos, sin excluir a ninguno, pero en especial a **Barriga, Efraín, Jaime, Álvaro, Jessy, Majo**... Mil gracias por todos los momentos que me han permitido estar en sus vidas y por que han estado conmigo, aunque sea sólo para molestar.

A **Marisela**, gracias por tu amistad, por apoyarme cuando más lo necesitaba, por entenderme, gracias por quedarte y concluir conmigo esta etapa.

A **Diney**, siempre fuiste un apoyo en este proyecto de vida. Espero Dios te llene de luz, paz y armonía donde te encuentres.

### A MIS ASESORES

Un especial agradecimiento al **D. C. José Herrera Camacho** por haber creído en mí, en este trabajo y haberme brindado la mano en los momentos más difíciles de esta etapa.

El **D. Q. Mario Armando Gómez Hurtado**, **D. C. Rosa Elva Norma del Río Torres**, **M. C. Darwin Cabrera Jiménez** y al **D. C. Roberto González Garduño**, por que a pesar de las circunstancias me proporcionaron la confianza, apoyo y paciencia para concluir este proyecto.

## **A LAS INSTITUCIONES Y COLABORADORES**

A la **Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo**, por abrirme las puertas para poder realizar mi preparación profesional en esta hermosa carrera que representa la Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Al **Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, investigadores y administrativos**. Por el espacio, apoyo y paciencia para realizar mis actividades académicas.

A la **Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia** de la U. M. S. N. H., por permitirme el uso de las instalaciones para desarrollar el trabajo de investigación.

Al **Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, investigadores y administrativos**. Por el espacio, apoyo y paciencia para realizar mis actividades académicas.

A la **Unidad Regional Universitaria Sur Sureste** dependiente de la Universidad Autónoma de Chapingo, por el tiempo y el espacio brindado para el desarrollo de las pruebas parasitológicas.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)**, por los apoyos económicos otorgados para completar un ciclo más de formación.

Al **M. C. Carlos Edmundo Orozco Durán y M. V. Z. Ivet Sierra Aguilar**, por su amistad y apoyo en el procesamiento de las muestras de producción de gas *in vitro*.

Al **D. C. Joel Edmundo López Meza** del **Centro Multidisciplinario de Estudios en Biotecnología** de la U. M. S. N. H., por su asesoría para realizar algunos experimentos necesarios para el proyecto.

A la **M. C. Patricia Silva Sáenz** de la **Facultad de Biología** de la U. M. S. N. H., por llevar a cabo la identificación taxonómica de la planta (*Artemisia ludoviciana*) utilizada en este estudio.

A **prestadores del servicio social y voluntarios** que se sumaron al trabajo bajo las circunstancias especiales que se presentaron en cada uno de los muestreos y experimentos realizados.

**A TODOS USTEDES**

**“INFINITAS GRACIAS”**

# ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1  |
| <b>2. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....  | 5  |
| 2.1. Los nemátodos gastrointestinales en los pequeños rumiantes .....                 | 5  |
| 2.1.1. Ciclo biológico .....  | 7  |
| 2.1.2. Hipobiosis .....   | 9  |
| 2.1.3. Patogenia.....   | 11 |
| 2.1.4. Signos clínicos .....  | 12 |
| 2.2. Resistencia antihelmíntica .....   | 13 |
| 2.2.1. Aspectos bioquímicos de la resistencia.....                                    | 16 |
| 2.2.2. Factores que favorecen la aparición de resistencia .....                       | 17 |
| 2.2.3. Subdosificación.....   | 17 |
| 2.2.4. Rotación de antihelmínticos .....  | 18 |
| 2.2.5. Tiempo de biodisponibilidad del fármaco.....                                   | 19 |
| 2.2.6. Población en refugio .....   | 19 |
| 2.2.7. Reversión de la resistencia .....  | 21 |
| 2.3. Mecanismos de resistencia antihelmíntica a los fármacos.....                     | 21 |
| 2.3.1. Benzimidazoles.....  | 22 |
| 2.3.2. Imidazotiazoles (levamisol) y tetrahidropirimidinas (morantel, pirantel).....  | 23 |
| 2.3.3. Lactonas macrocíclicas .....   | 24 |
| 2.3.3.1 Mecanismos relacionados con los receptores GluCl.....                         | 25 |
| 2.3.3.2. Mecanismos de resistencia que involucran a la glicoproteína-P (Gp-P) . ..... | 25 |
| 2.4. Métodos para el diagnóstico de resistencia parasitaria .....                     | 27 |
| 2.4.1. Pruebas <i>in vitro</i> .....  | 27 |
| 2.4.1.1. Prueba de eclosión de huevos.....  | 27 |
| 2.4.1.2. Prueba de motilidad larval.....  | 28 |
| 2.4.1.3. Prueba de parálisis larval.....  | 28 |
| 2.4.1.4. Prueba de desarrollo larval .....  | 29 |
| 2.4.1.5. Prueba de desarrollo para adultos .....                                      | 29 |
| 2.4.2. Pruebas <i>in vivo</i> .....   | 30 |

|   |    |
|---|----|
| 2.4.2.1. Prueba de la reducción de la oviposición .....                                     | 30 |
| 2.4.2.2. Prueba de eficacia antihelmíntica controlada.....                                  | 31 |
| 2.5. Métodos alternativos para el control parasitario .....                                 | 31 |
| 2.5.1. Selección de animales resistentes.....   | 31 |
| 2.5.2. Inmunización animal.....   | 33 |
| 2.5.2.1. Antígeno natural.....  | 33 |
| 2.5.2.2. Antígeno oculto.....   | 34 |
| 2.5.2.2.1. Antígeno H11.....  | 34 |
| 2.5.2.2.2. <i>Haemonchus</i> glicoproteína que contiene complejo galactosa (H-gal-GP) ..... | 35 |
| 2.5.2.3. Antígenos recombinantes .....  | 36 |
| 2.5.3. Mejoramiento nutricional.....  | 37 |
| 2.5.4. Agujas de óxido de cobre .....   | 38 |
| 2.5.5. Desparasitación selectiva .....  | 39 |
| 2.5.6. Hongos nematófagos .....   | 40 |
| 2.5.7. Pastoreo alterno rotativo .....  | 41 |
| 2.5.8. Rotación de potreros .....   | 43 |
| 2.5.9. Plantas ricas en metabolitos secundarios.....  | 44 |
| 2.5.9.1. <i>Allium sativum</i> y <i>Allium cepa</i> .....                                   | 45 |
| 2.5.9.1.1. Composición nutricional .....  | 47 |
| 2.5.9.1.2. Uso etnobotánico.....  | 49 |
| 2.5.9.1.3. Composición fitoquímica.....   | 49 |
| 2.5.9.1.3.1. <i>Allium sativum</i> L.....   | 49 |
| 2.5.9.1.3.2. <i>Allium cepa</i> L. ....   | 49 |
| 2.5.9.1.4. Información farmacológica.....   | 51 |
| 2.5.9.1.5. Enzima y compuestos activos azufrados.....                                       | 52 |
| 2.5.9.1.5.1. Alíña.....   | 52 |
| 2.5.9.1.5.2. Isoalina .....   | 52 |
| 2.5.9.1.5.3. Enzima alinasa .....   | 53 |
| 2.5.9.1.5.4. Alicina.....   | 54 |
| 2.5.9.1.6. Reacciones adversas.....   | 54 |
| 2.5.9.1.7. Compuestos azufrados.....  | 55 |
| 2.5.9.1.7.1. Estabilidad.....   | 56 |

---

|  |            |
|--|------------|
| 2.5.9.1.7.2. Transformación.....   | 57         |
| 2.5.9.1.8. Mecanismo de acción antihelmíntico putativo.....                          | 59         |
| 2.5.9.2. <i>Artemisia ludoviciana</i> .....  | 61         |
| 2.5.9.2.1. Uso etnobotánico.....   | 62         |
| 2.5.9.2.2. Composición fitoquímica.....  | 63         |
| 2.5.9.2.3. Información farmacológica.....  | 63         |
| 2.5.9.2.4. Reacciones adversas.....  | 63         |
| 2.5.9.2.5. Mecanismo de acción antihelmíntico putativo.....                          | 64         |
| <b>3. HIPÓTESIS</b> .....  | <b>66</b>  |
| <b>4. OBJETIVOS</b> .....  | <b>67</b>  |
| 4.1. OBJETIVO GENERAL.....   | 67         |
| 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES .....  | 67         |
| <b>5. RESULTADO</b> .....  | <b>68</b>  |
| CAPÍTULO 1.....  | 69         |
| CAPÍTULO 2.....  | 82         |
| <b>6. DISCUSIÓN GENERAL</b> .....  | <b>101</b> |
| 6.1. Efecto de los extractos completos sobre la microflora ruminal.....              | 101        |
| 6.2. Mecanismo de acción antihelmíntica de los extractos vegetales.....              | 103        |
| 6.3. Comparación espectroscópica de lo extractos etanólicos crudos y digeridos ..... | 108        |
| <b>7. PERSPECTIVAS</b> .....   | <b>114</b> |
| <b>8. BIBLIOGRAFÍA</b> .....   | <b>115</b> |

---

## ÍNDICE DE CUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Principales especies de nemátodos en los pequeños rumiantes.....       | 6  |
| <b>Cuadro 2.</b> Descripción técnica de <i>A. sativum</i> y <i>A. cepa</i> .....        | 47 |
| <b>Cuadro 3.</b> Composición nutricional de <i>A. sativum</i> .....                     | 48 |
| <b>Cuadro 4.</b> Composición nutricional de <i>A. cepa</i> .....                        | 48 |
| <b>Cuadro 5.</b> Información farmacológica del <i>A. sativum</i> y <i>A. cepa</i> ..... | 51 |
| <b>Cuadro 6.</b> Precursores de aromas en el género <i>Allium</i> .....                 | 55 |
| <b>Cuadro 7.</b> Proteasas de <i>H. contortus</i> con actividad conocida.....           | 59 |
| <b>Cuadro 8.</b> Descripción técnica de <i>Artemisia ludoviciana</i> .....              | 62 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de los nemátodos gastrointestinales.....   | 7   |
| <b>Figura 2.</b> Migración de larvas infectantes.....   | 8   |
| <b>Figura 3.</b> Formación de compuestos azufrados de <i>A. sativum</i> y <i>A. cepa</i> .....  | 50  |
| <b>Figura 4.</b> Estructura química de la aliína.....   | 52  |
| <b>Figura 5.</b> Reacción de formación del factor lacrimógeno.....  | 53  |
| <b>Figura 6.</b> Reacción de formación de alicina.....  | 54  |
| <b>Figura 7.</b> Principales compuestos presentes en diferentes preparados del <i>A. sativum</i> basado en el método de extracción.....     | 56  |
| <b>Figura 8.</b> Principales compuestos presentes en diferentes preparados de la <i>A. cepa</i> basado en el método de extracción.....      | 56  |
| <b>Figura 9.</b> Principales transformaciones de los tiosulfatos de <i>A. sativum</i> .....   | 58  |
| <b>Figura 10.</b> Cascada proteolítica putativo responsable de la degradación de hemoglobina en el intestino de nemátodos hematófagos.....  | 59  |
| <b>Figura 11.</b> Comparativo de RMN de $^1\text{H}$ del extracto digerido ( <b>A</b> ) y crudo ( <b>B</b> ) de <i>A. sativum</i> .....     | 109 |
| <b>Figura 12.</b> Comparativo de RMN de $^1\text{H}$ de la región aromática de <i>A. sativum</i> .....                                      | 110 |
| <b>Figura 13.</b> Comparativo de RMN de $^1\text{H}$ del extracto digerido ( <b>A</b> ) y crudo ( <b>B</b> ) de <i>A. cepa</i> .....        | 111 |
| <b>Figura 14.</b> Comparativo de RMN de $^1\text{H}$ de la región aromática de <i>A. cepa</i> .....   | 111 |
| <b>Figura 15.</b> Comparativo de RMN de $^1\text{H}$ del extracto digerido ( <b>A</b> ) y crudo ( <b>B</b> ) de <i>A. ludoviciana</i> ..... | 112 |

---

**ABREVIATURAS**

|                                       |                         |
|---------------------------------------|-------------------------|
| Albendazol                            | ABZ                     |
| Antihelmíntico (s)                    | AH                      |
| Avermectina                           | AVM                     |
| Benzimidazoles                        | Bz                      |
| Gusanos adultos                       | GA                      |
| Ensayos de eclosión de huevos         | EEH                     |
| Excreción-Secreción                   | ES                      |
| Extracto crudo                        | EC                      |
| Extracto crudo de ajo                 | ECA                     |
| Extracto crudo de cebolla             | ECC                     |
| Extracto crudo de estafiate           | ECE                     |
| Extracto digerido de ajo              | EDA                     |
| Extracto digerido de avena            | EDAv                    |
| Extracto digerido de cebolla          | EDC                     |
| Extracto digerido de estafiate        | EDE                     |
| Extracto digerido de líquido ruminal  | EDLr                    |
| Extracto digerido                     | ED                      |
| Extracto vegetal                      | EV                      |
| <i>Haemonchus contortus</i>           | <i>H. contortus</i>     |
| Huevos por gramo de heces             | hpg                     |
| Imidazotiazoles                       | IMZ.                    |
| Lactonas macrocíclicas                | LM                      |
| Lactonas sesquiterpénicas             | LST                     |
| Metabolitos secundarios               | MS                      |
| Nemátodos gastrointestinales          | NGI                     |
| Parásito (s) gastrointestinal (es)    | PGI                     |
| Partes por millón                     | ppm                     |
| Producción de gas <i>in vitro</i>     | Pgas                    |
| Resistencia antihelmíntica            | RHA                     |
| Resonancia magnética nuclear          | RMN                     |
| Taninos condensados                   | TC                      |
| Tiabendazol                           | TBZ                     |
| <i>Trichostrongylus colubriformis</i> | <i>T. colubriformis</i> |

---

## RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de los extractos de etanólicos crudos (CE) y digeridos (ED) de ajo (*A. sativum*), cebolla (*A. cepa*) y artemisia (*A. ludoviciana*) sobre los huevos y larvas infectantes (L<sub>3</sub>) de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*. Se llevó a cabo una investigación que se dividió en dos etapas. En la primera, se evaluó el efecto de los extractos crudos sobre la microflora ruminal utilizando la técnica de producción de gas *in vitro* (Pgas). En relación con lo anterior, no se encontró un efecto significativo en la producción de gas dentro de los tratamientos utilizados. Sin embargo, la microflora ruminal mostró un mejor comportamiento con el extracto de *A. sativum* al 50%, *A. cepa* al 30% y *A. ludoviciana* al 40%. No obstante, se encontraron diferencias significativas ( $P < 0,05$ ) entre los tratamientos con el nivel de inclusión al 50%, en este caso *A. sativum* fue el que mostró un mejor comportamiento en la producción de gas sin afectar la microflora ruminal. Mientras tanto, en la segunda etapa: el extracto digerido produce un mejor comportamiento a una concentración inferior en comparación con el extracto crudo sobre la eclosión de huevos. Mientras que los extractos crudos y digeridos de *A. sativum* fueron positivos sólo con *H. contortus*. Ningún tratamiento fue eficaz en larvas de tercera fase (L<sub>3</sub>) de las cepas probadas. En conclusión, la técnica de producción de gas *in vitro* permite evaluar la actividad de los extractos crudos sobre la microflora del rumen antes de su aplicación *in vivo*. Por otro lado, sirve como modelo simulado de la digestión ruminal a partir del cual se pueden recuperar los extractos digeridos para evaluaciones antiparasitarias *in vitro*. Los resultados obtenidos en los ensayos de eclosión de huevos sugieren que los extractos digeridos pueden mantener un posible efecto antiparasitaria post-digestión. Los datos obtenidos en este estudio, están destinados a servir como información preliminar para comprender el comportamiento de los extractos vegetales utilizados como antiparasitario dentro del huésped. Esto con el objetivo de estandarizar una metodología que permita vincular los resultados obtenidos en los ensayos parasitarios *in vitro* con los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*.

**Palabras clave:** *nemátodo, extracto vegetal, extracto digerido, producción de gas in vitro, digestibilidad ruminal.*

---

## SUMMARY

In order to evaluate the anthelmintic activity *in vitro* of the crude ethanolic extracts (CE) and digested (ED) of garlic (*A. sativum*), onion (*A. cepa*) and mugwort (*A. ludoviciana*) onto eggs and infective larvae (L<sub>3</sub>) of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis*. An investigation was conducted which was divided into two stages. In the First, the effect of crude extracts on ruminal microflora was evaluated using the technique of *in vitro* production of gas (Pgas). In connection with the above, It was not found a significant effect on the production of gas within treatments with the three levels of inclusion used. However, microflora ruminal showed a better performance with the extract of *A. sativum* to the 50%, *A. cepa* to the 30% and *A. ludoviciana* to the 40%. However, significant differences (P <0.05) between treatments with the inclusion level to the 50% was found, in this case *A. sativum* was the one who showed a better behavior on the production of gas without affecting the ruminal microflora. Meanwhile, in the second stage: the digested extract produces a better behavior at a lower concentration compared with the crude extract about eggs hatching. While raw and digested extracts of *A. sativum* were positive only with *H. contortus*. No treatment was effective on third stage larvae (L<sub>3</sub>) of the strains tested. In conclusion, the technique of *in vitro* gas production allows to evaluate the activity of crude extracts on rumen microflora prior to *in vivo* application. On the other hand, it serves as a model simulated of ruminal digestion from which can be retrieved the digested extracts for further antiparasitic evaluations *in vitro*. The results obtained in trials of hatching eggs suggest that the digested extracts can maintain a possible post-digestion parasitic effect. The data obtained in this study, are intended to serve as background information for understanding the behavior of the vegetal extracts used as antiparasitic inside the host. This with the aim of standardizing a methodology to link the results obtained *in vitro* parasite tests with the results obtained in tests *in vivo*.

**Keywords:** *nematode, vegetal extract, extract digested, in vitro gas production, ruminal digestibility.*

---

## 1. INTRODUCCIÓN

Las parasitosis gastrointestinales (PGI) en pequeños rumiantes representan una limitante a nivel mundial debido a sus altos niveles de incidencia, prevalencia y frecuencia dentro de las unidades de producción (Angulo, 2005).

Dentro de las PGI, los nemátodos gastrointestinales (NGI) son quienes inciden en mayor proporción sobre los ovinos provocando problemas como: inapetencia, mala digestión y absorción de nutrientes, inactividad de algunas enzimas intestinales, diarrea, anemia, entre otros (Castro *et al.* 2007, Arece 2008<sup>a</sup>). Estos factores contribuyen a reducir la ganancia de peso hasta en un 70% (Coop *et al.* 1982) interfiriendo con algunos indicadores productivos, y ocasionando índices de mortalidad hasta del 50% sobre infestaciones graves (Knox *et al.* 2006).

Entre los NGI de importancia económica por su alta frecuencia en la ovinocultura resaltan *Haemonchus contortus* (*H. contortus*), *Trichostrongylus colubriformis* (*T. colubriformis*) y *Oesophagostomun* (González *et al.* 2003, Olivares, 2006). *H. contortus* y *T. colubriformis* son nemátodos de ciclo monoxeno (huevo-larva- adulto) con fase larvaria libre. La infección ocurre como consecuencia de la ingestión de la larva infectante (L<sub>3</sub>) (Martínez 2010). *H. contortus* es un nemátodo hematófago de interés para la ovinocultura debido a su alta frecuencia (40-80%) y prolificidad (10 000-20 000 huevos por parásito al día), logrando sobrevivir a temperaturas superiores a los 15 °C y precipitaciones pluviales de 50 mm<sup>3</sup> (Zárate 2008). Este se caracteriza por generar pérdidas de sangre (0.05 mL por parásito al día) y daños severos a la mucosa del abomaso, ocasionados por la migración de su forma traumática (L<sub>4</sub>), lo cual trae como consecuencia descensos en la asimilación proteica y en la concentración plasmática (210-340 mL por día) (Soulsby 1987). Por su parte, *T. colubriformis* es un parásito quimiófago que se nutre del contenido del tubo digestivo del huésped. Su patogenia se relaciona con la abrasión que produce en las vellosidades intestinales ocasionando mala absorción, inapetencia, pérdida de peso, hipoproteinemia, diarrea y muerte (Sutherland y Scott 2009, Martínez 2010). Bajo este escenario, el control de la reproducción y migración larvaria

de ambos parásitos dentro del hospedero resultan claves para minimizar su propagación y efectos negativos sobre la producción animal.

En las últimas décadas, el control de los PGI se ha basado en el uso indiscriminado de antihelmínticos (AH) (Encalada *et al.* 2008), situación que ha favorecido el creciente desarrollo de la resistencia parasitaria con lo que se han incrementado los problemas sanitarios y productivos de los animales (Jabbar *et al.* 2006, Geurden *et al.* 2014). El uso de estas sustancias genera pérdidas cuantiosas para la ganadería calculadas entre 220 a 367 millones de dólares al año, debido principalmente al uso incorrecto de los fármacos y aplicaciones repetidas (Emery y Wagland 1991, Sackett *et al.* 2006).

La creciente demanda por reducir los residuos de medicamentos en productos de origen animal, la protección al medio ambiente y el alto costo de los AH convencionales, ha creado un interés en la búsqueda de métodos alternativos para el control parasitario (Molento 2009).

Las alternativas que actualmente se están utilizando incluyen el control biológico mediante hongos nematófagos (Mendoza-de Gives *et al.* 2006, Ojeda-Robertos *et al.* 2008), inmunización (Hein y Harrison 2005; Vercruyssen *et al.* 2007), selección genética de animales resistentes (Kahna *et al.* 2003, Greer 2008), inmunonutrición (Coop y Kyriazakis 2001, Nox *et al.* 2006), así como el uso de extracto vegetales (EV) (Athanasidou y Kyriazakis 2004, Hernández *et al.* 2008). Esta última opción se ha propuesto como una alternativa orgánica, la cual permite reducir la presión de selección de los NGI originada por el uso continuo de los AH (Hernández *et al.* 2014).

Entre los extractos crudos (EC) con reportes etnobotánicos antiparasitarios se encuentra el ajo (*A. sativum*) y la cebolla (*A. cepa*). Sin embargo, los resultados científicos no han aportado pruebas definitivas para esta actividad biológica. Parece que *A. sativum* presenta resultados favorables *in vitro* (Singh y Nagaich 2000, de Almeida *et al.* 2004, Veerakumari y Lakshmi 2006, Amin *et al.* 2009, Navaneetha y Veerakumari 2009, Ahmed *et al.* 2013, Shalaby y Farag 2014) e *in vivo* (Ayas *et al.* 2008, Strickland *et al.* 2009a, Fadzirayi *et al.* 2010, Lkhagvatseren *et al.* 2010), pero también resultados negativos *in vitro* (Burke *et al.* 2009a, 2009b) e *in vivo*

(Strickland *et al.* 2009b, Worku *et al.* 2009, Santos y Carvalho, 2014). Por su parte, *A. cepa* también cuenta con reportes positivos *in vitro* (Mehlhorn *et al.* 2011, Abdel-Ghaffar *et al.* 2011) e *in vivo* (Klimpel *et al.* 2009) y algunos negativos *in vitro* (Bahmani *et al.* 2013) e *in vivo* (Abdel-Ghaffar *et al.* 2011). Mientras que del estafiate (*A. ludoviciana*) no hay suficiente información disponible que respalde su eficacia AH. No obstante, se han encontrado algunos efectos positivos sobre protozoarios (Malagon *et al.* 1997; Said *et al.* 2005; Calzada *et al.* 2006; Calzada *et al.* 2007) y algunos otros negativos sobre NGI (Calzada *et al.* 2007; Acharya *et al.* 2004). No obstante, plantas pertenecientes al mismo género han resultado de gran interés por sus efectos positivos sobre parásitos, tal es el caso de *Artemisia brevifolia* (Iqbal *et al.* 2004) y *Artemisia absinthium* (Tariq *et al.* 2009).

La supuesta propiedad antiparasitaria de los EC ha sido causa de controversia a pesar del conocimiento de sus propiedades profilácticas y terapéuticas, debido a que no existe una correlación significativa entre los test *in vitro* e *in vivo* como lo muestran los estudios de resistencia antihelmíntica (RAH) a las drogas sintéticas (Athanasiadou y Kyriazakis 2004, Moreno *et al.* 2010). La discrepancia en los resultados podría atribuirse al origen, temporada, proceso de recolección y partes utilizadas del material vegetal; metodología de extracción y solvente utilizado; y finalmente a la farmacocinética, biodisponibilidad y farmacodinamia de los extractos vegetales *in vivo* (Makkar, 2003). Los resultados *in vitro* deberán ser siempre validados *in vivo* antes de generalizar la propiedad antiparasitaria de los EC (Athanasiadou y Kyriazakis 2004).

Debido que los EC se administran vía oral en los animales y ocurre metabolismo de los mismos en el rumen, resulta de interés conocer de manera preliminar si los ED mantienen un efecto antiparasitario. Para ello, la técnica de producción de gas *in vitro* (Pgas) resulta ser un sistema de alta capacidad operativa y bajo costo (Bruni y Chilibroste, 2001), la cual permite determinar las tasas de degradación de los alimentos por acción de la microflora ruminal mediante el monitoreo de la Pgas durante determinados intervalos de tiempo (Posada y Noguera, 2005). Este método se propone como un medio para evaluar en primera instancia los efectos de los EV con posible acción antihelmíntica sobre la microflora ruminal, mismos que puedan perjudicar la digestibilidad de los alimentos, lo cual pudiese afectar la salud animal.

Por otro lado, servir como un modelo de digestión ruminal simulada que permita recuperar los ED con la finalidad de evaluar su actividad antiparasitaria *in vitro*.

El presente estudio tuvo como objetivo preliminar, evaluar la actividad de los extractos vegetales de *Allium sativum*, *Allium cepa* y *Artemisia ludoviciana* sobre huevos y larvas infectantes de nemátodos de la familia Trichostrongylidae de ovinos.

---

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Los nemátodos gastrointestinales en los pequeños rumiantes

Los ovinos poseen una gran capacidad para transformar forrajes de baja calidad en productos de alto valor nutricional como la carne, leche, huevo (Sievers *et al.* 2002). Los sistemas de producción ovina utilizan especies capaces de aprovechar los recursos naturales mediante el pastoreo (Maingi *et al.* 2004). Sin embargo, diversas prácticas de manejo favorecen la infección directa o indirecta por NGI (Márquez 2003), lo que limita el desarrollo de la industria ovina debido a bajas en la productividad (Herrera *et al.* 2013).

Las nematodiasis o trichostrongilidosis son quizá de las infecciones parasitarias más frecuentes del ganado ovino, prácticamente la mayoría de los rebaños explotados en sistemas extensivos sufren de esta infestación, aunque la carga parasitaria puede variar de acuerdo al área geográfica, tipo de manejo, programas antiparasitarios, entre otros (Márquez 2003).

Los nemátodos son un grupo de helmintos redondos no segmentados cuya morfología es semejante entre cada especie, aunque éstos presentan adaptaciones a la forma de vida parasitaria. Estos pertenecen al Reino: animalia, Phylum: nematoda, clase: adenophorea (Aphasmodia) y secernetea (Phasmodia); estas clases se dividen en súper familias (ejem. Trochostrongylidae), familias (ejem. Trichostrongylidae) y luego en géneros y especies (ejem. *H. contortus*) (Lee 2002).

Existen alrededor de 20 000 especies descritas para los diversos géneros, aún quedan otros sin clasificar. Dentro de la familia Trichostrongylidae se encuentra la mayoría de los nemátodos del tracto gastrointestinal (Rodríguez *et al.* 2001), los cuales se caracterizan por ser individuos de pequeña talla (4-5 mm), tener una cápsula bucal ausente o rudimentaria en comparación a otros nemátodos. Los machos poseen una bolsa caudal copulatriz desarrollada.

En el trópico mexicano los nemátodos de interés son: *Haemonchus*, *Trichostrongylus* y *Oesophagostomun* (**Cuadro 1**) debido a su patogenicidad, prevalencia e incidencia en los rebaños ovinos (González *et al.* 2003, Aguilar *et al.* 2005).

**Cuadro 1.** Principales especies de nemátodos en los pequeños rumiantes.

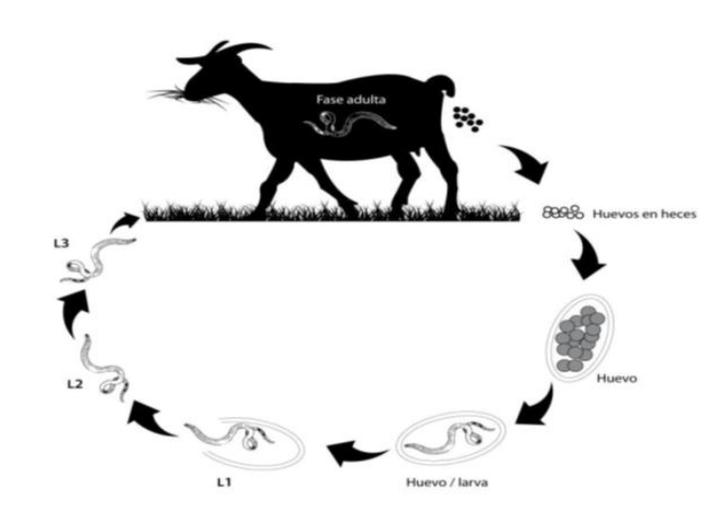
| Parásito   | Localización      | Morfología y talla                  |
|--|-------------------|-------------------------------------|
| <i>Haemonchus contortus</i>  | Abomaso           | Macho: 10-20 mm<br>Hembra: 18-30 mm |
| <i>Trichostrongylus colubriformis</i>                                  | Intestino delgado | Macho: 2.3-6 mm<br>Hembra: 3.2-8 mm |
| <i>Oesophagostomun columbianum</i><br><i>Oesophagostomun venulosum</i> | Intestino grueso  | Gusano nodulares: 8-20 mm           |

Adaptado de Quiroz 2003.

Estos géneros son identificados por su morfología y localización en el tubo digestivo de los animales. En cuanto a su patogenicidad está puede variar según la biología del parásito y el número de gusanos presentes en el tracto gastrointestinal del hospedero. No obstante, también influye la sensibilidad del propio hospedero (Martínez 2010).

En la presente investigación se utilizaron como modelo de estudio *H. contortus* y *T. colubriformis*. Los cambios producidos por estos parásitos sobre la capacidad de absorción de la superficie intestinal pueden tener como consecuencia una alteración en el equilibrio hídrico, así como en el intercambio de iones sodio y cloro. Por otra parte, pueden inducir cambios morfológicos y bioquímicos en las células epiteliales y en las microvellosidades intestinales, además de reducir el crecimiento esquelético por disminución en el depósito de calcio y fósforo en los huesos (Soulsby1987).

### 2.1.1. Ciclo biológico



**Figura 1.** Ciclo biológico de los nemátodos gastrointestinales (Martínez 2010).

El ciclo biológico de *H. contortus* y *T. colubriformis* es monoxeno (huevo-larva-adulto) con dos fases: una exógena y otra endógena (**FIG. 1**). En la fase exógena, de acuerdo a la especie, los huevos con un número variable de blastómeros (26-32) son liberados con las heces al medio ambiente externo (Cordero *et al.* 1999, Vázquez 2000). Su tamaño oscila entre 70-90  $\mu\text{m}$ , a excepción de los *Nematodirus* que rondan los 130  $\mu\text{m}$ . Dependiendo de una óptima temperatura (22-25  $^{\circ}\text{C}$ ), humedad (60-70%), oxigenación y luminosidad (Habela *et al.* 2002), los huevos eclosionan entre las 24-30 h debido a la secreción de proteasas y quitinasa dando lugar a la larva 1 ( $L_1$ ), posteriormente en 2 ó 3 días evoluciona a larva 2 ( $L_2$ ), entre los 4-7 días esta larva se transforma en larva 3 ( $L_3$ ) o estadio infestante. Esta última larva contamina los potreros o se incuban en la tierra para invernar nutriéndose del alimento almacenado en las células que forman su intestino (Vázquez 2000). La infección de los rumiantes se lleva a cabo a partir de la ingestión de  $L_3$ , las cuales presentan un fototropismo a la luz tenue como sucede al amanecer y al atardecer, las larvas se desplazan con mayor facilidad a las puntas de los pastos favoreciendo la infección (**FIG. 2**) (Liébano 2004, Arece y Rodríguez *et al.* 2010). Según Jorgan y Brain (1994), la distancia horizontal que la  $L_3$  recorre activamente no excede usualmente de 5 a 10 cm.



**Figura 2.** Migración de larvas infectantes (Liébano 2004).

En la fase endógena, la larva infectante muda en el rumen al haber un incremento de pH ocasionado por la secreción de la enzima leucina aminopeptidasa a través de las células neurosecretoras, localizadas entre la base del esófago y los orificios excretores de la larva. Existe un desprendimiento del casquete de la larva, el cual es presidido por la aparición de un anillo refringente en la región del casquete, con lo que las larvas ayudadas por su movimiento salen de la vaina (Hsu 1977, Liébano 2011).

Una vez que la larva se ha liberado de la vaina migra entre los 10 y 20 minutos post infección hacia el órgano blanco, *H. contortus* pasa a la mucosa fúndica del abomaso (Arece y Rodríguez 2003), mientras que *T. colubriformis* se sitúa entre el epitelio y la membrana basal del intestino delgado. Posteriormente, la larva entra en una fase del ciclo biológico denominada: fase tisular o histotrópica. Dos días después, la larva emerge como larva 4 (L<sub>4</sub>). Durante este periodo se puede inhibir temporalmente su desarrollo debido a condiciones fisiológicas adversas y permanecer como larva hipobiótica hasta que las condiciones sean favorables. Seguido, la L<sub>4</sub> penetra las criptas glandulares donde permanece 10-14 días dando origen a la larva 5 preadulto (L5P) y después a un parásito adulto. Las hembras comienzan a ovipositar entre los 21 y 28 días post infección (Aguilar *et al.* 2008, Aguilar *et al.* 2011). Este periodo puede verse modificado según la respuesta inmunitaria del hospedador (Habela *et al.* 2002).

### 2.1.2. Hipobiosis

Algunos géneros de NGI presentan un fenómeno de inhibición del desarrollo denominado “hipobiosis”. Este consiste en un periodo de latencia y metabolismo disminuido como respuesta a las condiciones ambientales o cambios fisiológicos en el huésped (Angulo 2005). De esta manera, la larva asegura su sobrevivencia cuando las condiciones ambientales para la transmisión son inadecuadas y la supervivencia de las formas libres es mínima (Gatongi *et al.* 1998). En el caso de *H. contortus*, el proceso se realiza después de formada la L<sub>4</sub>, mientras que en *T. colubriformis* sucede en la L<sub>3</sub> (Cordero 1999).

#### Se han identificado tres factores desencadenantes de la hipobiosis:

**1) Inhibición estacional:** Es un mecanismo diseñado por aquellos nemátodos adultos de vida corta como medio para sobrevivir durante los periodos de condiciones climáticas adversas y hostiles. La hipobiosis es iniciada por una señal ambiental recibida por las larvas L<sub>3</sub> de vida libre. Cuando la L<sub>3</sub> infecta a un hospedador no continúa su desarrollo, sino que se arrestan en los tejidos del hospedador como L<sub>3</sub> desenvainadas ó como L<sub>4</sub> tempranas (Sommerville y Davey 2002, Langrová *et al.* 2008).

En regiones del hemisferio norte con climas templados y fríos, las larvas hipobióticas se acumulan en el interior de animales que pastan durante el otoño ante la llegada del invierno. La reanimación de estas larvas hipobióticas ocurre al final del invierno o principio de primavera cuando las condiciones ambientales son favorables. Por su parte, en regiones templadas y cálidas del hemisferio norte, la hipobiosis parece relacionarse con el comienzo de la temporada seca, debido a que estas condiciones son un riesgo para la sobrevivencia y desarrollo de las etapas de vida libre (Dopchiz *et al.* 2000; Sommerville y Davey 2002).

En el hemisferio sur el proceso de hipobiosis ocurre durante los meses de primavera e inicios de verano. De modo similar, en regiones tropicales la hipobiosis es baja y por lo regular surge en periodos secos (Fiel 1988, Romero y Boero 2001). El mecanismo responsable de la reanimación no es conocido.

**2) Inhibición inmunológica:** Mientras los animales pastorean ingieren continuamente larvas infectivas que se desarrollan en adultos. Mientras la temporada de pastoreo continúa, estos animales desarrollan una respuesta inmunológica a las infecciones de los nemátodos (Sommerville y Davey 2002, Miller y Horohov 2006).

En las ovejas la maduración de las larvas inhibidas inmunológicamente parece estar relacionado con el parto (Quiroz *et al.* 2011, Goldberg *et al.* 2012). La producción de un gran número de huevos, uno o dos meses, después del parto garantiza cantidades suficientes de L<sub>3</sub> para infectar a un elevado número de individuos susceptibles (Angulo 2005).

La inmunocompetencia se ve restaurada durante el destete cuando los niveles de prolactina disminuyen y la carga de gusanos son expulsados a consecuencia del aumento de la respuesta inmunológica (Beasley *et al.* 2010).

**3) Reducción por carga parasitaria:** Debido al exceso de gusanos adultos se cree que un hacinamiento estimula la inhibición de las larvas infectivas entrantes. Estas detienen su desarrollo hasta que la población de gusanos adultos (GA) disminuye en número o es eliminada (Sommerville y Davey 2002).

Sin embargo, un alto grado de hipobiosis sobre corderos en pastoreo con inmunidad en desarrollo, sugiere que son los factores ambientales más que la respuesta inmunológica los que regulan el fenómeno. Por otro lado, en algunas regiones o países los corderos comienzan pastoreo en agosto o septiembre, presentando altos grados de hipobiosis de octubre hasta marzo, lo que sugiere que el descenso de la temperatura no es un estímulo del todo necesario (Quiroz *et al.* 2011). Desde el punto de vista patológico, es importante tener presente que una desinhibición de un gran número de larvas hipobióticas puede causar procesos graves sobre la salud del animal.

### 2.1.3. Patogenia

Los mecanismos patógenos que generan los NGI en el hospedero dependen del estadio en el que se encuentre la larva (L<sub>3</sub>, L<sub>4</sub>, L<sub>5</sub> y adultos), así como de su localización anatómica (Angulo 2005). Uno de los principales problemas de las PG es la disminución del apetito generado por la liberación de colecistoquinina a nivel del sistema nervioso central. Esta característica es común para el parasitismo del abomaso, intestino e hígado, cuya intensidad puede oscilar entre un 15-20% en infecciones subclínicas crónicas hasta producir un cuadro de anorexia en infecciones agudas. Esto tiene consecuencias nocivas sobre el crecimiento del esqueleto, músculo y sobre el depósito de reservas corporales de grasa (Sykes y Coop 1982).

En el abomaso, las larvas se desarrollan en las glándulas gástricas provocando compresión, inflamación y edema de la mucosa (Romero y Boero 2001). Como resultado aumenta el mucus y disminuye la producción de ácido clorhídrico, el pH se eleva inhibiendo la conversión de pepsinógeno a pepsina, incrementando la liberación de gastrina y con ello aumentando la permeabilidad gástrica del pepsinógeno a la circulación y del plasma al lumen (Kataria *et al.* 2008).

En el caso del intestino delgado, las larvas que penetran la pared intestinal como las de *T. colubriformis* realizan su desarrollo bajo el epitelio generando inflamación, separación del epitelio y aceleración en la proliferación de las células intestinales. Como consecuencia las vellosidades crecen atróficas o deformadas disminuyendo su capacidad enzimática y la absorción de nutrientes (Parkins y Holmes 1989), generando pérdidas proteicas de 20 a 125 g al día (Poppi *et al.* 1986). Los cambios producidos en la capacidad de absorción alteran el equilibrio hídrico, así como el intercambio de los iones de sodio y cloro, lo cual provocaría una hipoalbumemia y una marcada diarrea (Parkins y Holmes 1989, Jara 2004).

En el intestino grueso se reduce el índice de conversión de alimento (Coop y Holmes 1996), mientras que los nódulos formados en la pared intestinal interfieren con la motilidad, produciendo una diarrea mucoide (Radostits *et al.* 2002).

En el caso de los parásitos adultos existe un aumento de la acción hematófaga de algunos géneros (*Haemonchus*, *Ostertagia*, *Mecistocirrus*, *Bonostomun*), debido a un mayor requerimiento de nutrientes. La actividad anticoagulante y el comportamiento de alternar el lugar de alimentación, incrementan el volumen de sangre perdida por parte del hospedador (Angulo 2005). Tal como, *H. contortus* quien genera pérdidas de sangre de 0.05 mL por parásito al día. Durante su migración hacia otros segmentos del aparato gastrointestinal *H. contortus* provoca descensos sobre la asimilación proteica y disminuye de la concentración plasmática de 210 a 340 mL/día (Soulsby 1987). En este caso, los niveles del 15% del hematocrito son comunes debido a que su potencial biótico (5 000-10 000 huevos por hembra/día) suele alcanzarse rápidamente (Romero y Boere 2001).

Las especies de *Trichostrongylus* que habitan el intestino delgado (*T. colubriformis*) son más patógenas. Los adultos lesionan profundamente la mucosa por su acción expoliatriz. Por otro lado, el tamaño de algunos nemátodos como *Toxocara* puede ocasionar obstrucción intestinal (Angulo 2005).

#### **2.1.4. Signos clínicos**

Las parasitosis son consideradas como uno de los principales problemas que afecta la productividad de los ovinos en pastoreo (González *et al.* 2011). Estas afectan en mayor medida a los animales jóvenes en desarrollo (Caballero *et al.* 2009), ocasionando trastornos que comprometen su integridad, bienestar y salud (Sarmiento *et al.* 1999).

Las parasitosis inciden directamente en los ovinos provocando anorexia, reducción en la ingestión de alimentos, mala digestión y absorción de nutrientes, así como depresión de la actividad de algunas enzimas intestinales, alteración en el metabolismo proteico, anemia, diarrea, entre otras (Arece 2008, Castro *et al.* 2008). Estos factores contribuyen a reducir la ganancia de peso de 2-5 kg/mes en ovinos (Coop *et al.* 1982, Nari *et al.* 2003) y de 28-48 kg/año en bovinos (Soca *et al.* 2005), ocasionando mermas económicas que rondan los 45 millones de dólares/año (Waller 2006), derivado de la resistencia y fácil adaptación de los

PGI. En casos de infestaciones graves los índices de mortalidad superan el 50% (Knox *et al.* 2006).

La disminución en el consumo está asociada a la mala absorción y a las modificaciones metabólicas. La mala absorción es explicada por la alteración de las mucosas y por el daño a las células productoras de ácido clorhídrico en el abomaso, esto provoca una disminución de la digestión enzimática, perturbaciones en la motilidad digestiva y modificaciones en la permeabilidad de los epitelios (Hoste *et al.* 1997).

*H. contortus* es un parásito hematófago que se desarrolla a temperaturas superiores a los 15 °C, llegando a sobrevivir a precipitaciones pluviales por encima de 50 mm (Zárate 2008), haciendo de él un parásito adaptable a diversas condiciones ambientales. Dentro de la ovinocultura se han reportado frecuencias para este parásito que van desde el 40 al 80%, debido a la alta prolificidad de las hembras (Vázquez *et al.* 2006, Rojas 2007). Por su parte, *T. colubriformis* es quimiófago, se nutre del contenido del tubo digestivo del animal que parasita (Martínez 2010). Su patogenia está relacionada con la abrasión que produce sobre las vellosidades intestinales ocasionando una mala absorción de nutrientes (Hoste *et al.* 1997).

## 2.2. Resistencia antihelmíntica

La RAH a las drogas es un problema para la producción de ovinos en muchas partes del mundo, incluido en nuestro país (Cristel y Suárez 2006, Hernández *et al.* 2006). La resistencia se describe como la habilidad heredable de algunos parásitos para sobrevivir a la acción de una ó más drogas a las dosis terapéuticas recomendadas (Taylor y Hunt 1989). La determinación de esta capacidad, se ve reflejada en un aumento significativo de individuos dentro de una misma población de parásitos, capaces de tolerar dosis que han resultado letales para la mayoría de los individuos de la misma especie (Fiel *et al.* 2001).

Los primeros reportes de RAH se presentaron en EE. UU., a finales de la década de los 50' y principio de los 60' cuando se comunicó por primera vez la resistencia a la fenotiacina. En 1964 se observaron estas condiciones con el tiabendazol en *H. contortus* de ovinos (Romero y

Boero 2001). Más tarde, debido al amplio uso de los benzimidazoles (BZ) se encontró resistencia sobre *H. contortus* y *T. colubriformis*. En Sudáfrica en 1976 y 1987 se encontraron reportes de resistencia al levamisol (LV), morantel y lactonas macrocíclicas (LMC). A partir de estos reportes iniciales, las resistencias de los parásitos hacia los compuestos se ha extendido por el mundo en diferentes especies de parásitos de pequeños rumiantes, bovinos, equinos entre otras especies de animales domésticos (Márquez 2007).

En México, Rúelas *et al.* (1990), notificaron por primera vez la presencia de una población de *H. contortus* de ovinos resistente a BZ en Puebla. Campos *et al.* (1992), identificaron tres poblaciones resistentes a albendazol, febendazol, oxfendazol y febantel en borregos. Por su parte, Negrete *et al.* (1998), observaron nula efectividad del febendazol a dosis de 5mg/kg contra *H. contortus* en ovinos de la ciudad de Chapa de Mota, Estado de México. Mientras que, Salas *et al.* (1998), informaron de una baja actividad (34%) por parte de oxfendazol contra *H. contortus* de ovinos en Tlapacoyan, Veracruz. Figueroa *et al.* (1999), detectaron la misma tendencia en el mismo Estado con una población de *H. contortus* resistente al sulfóxido de albendazol en ovinos.

Actualmente se ha notificado RAH a BZ, levamisol (LV) (Castillo *et al.* 2000, Torres *et al.* 2003) e ivermectina (IVM) (González *et al.* 2003, Hernández *et al.* 2006, Montalvo *et al.* 2006).

### **La resistencia antihelmíntica puede ser:**

- **Intrínseca:** Se presenta cuando un parásito es naturalmente insensible a una droga, debido a la ausencia de receptores o a la imposibilidad del fármaco para entrar a la célula (Márquez 2003).
- **Adquirida:** Se presenta en los PGI que inicialmente son susceptibles a la acción terapéutica de un AH, y que posteriormente dejan de serlo luego de la ocurrencia de modificaciones genéticas que son heredables de generación en generación (Vásquez *et al.* 2007).

Dentro del hospedador, los GA se adaptan al antiparasitario con el que tengan contacto, generando genes de resistencia en un proceso hereditario e irreversible (Wolstenholme *et al.* 2004). La continúa selección y reproducción de los nemátodos resistentes aumenta la frecuencia de genes resistentes en la población. Por lo cual, la prevención del establecimiento es una alternativa para retardar la acumulación de los genes resistentes (Sangster 1999). Los híbridos resultantes de la combinación de genes de resistencia y sensibles retardan la aparición de poblaciones de parásitos resistente (Sáenz *et al.* 1991).

**Las diferentes modificaciones genéticas que se encuentran en el proceso de la resistencia adquirida son:**

- **Mutación:** el ADN de las células susceptibles del parásito es alterado, impidiendo que la droga produzca su acción farmacológica. Las mutaciones seleccionan principalmente poblaciones resistentes, por lo cual las generaciones siguientes provendrán de cepas resistentes (Vásquez *et al.* 2007).
- **Amplificación genética:** es causada por la producción de genes que conllevan a una producción incrementada de sustancias cruciales en la acción de un fármaco, convirtiéndolas en resistentes a las concentraciones normales de la droga que son efectivas en condiciones normales (Vásquez *et al.* 2007).
- **Transferencia genética:** las células susceptibles del parásito adquieren material genético de otro ambiente u organismo introduciéndolo en su cromosoma, induciendo así resistencia a los AH o a una droga en especial (Márquez 2003).

**La transferencia genética se divide en tres mecanismos básicos:**

- **Transformación:** son piezas de ADN conteniendo los genes para resistencia a drogas, los cuales son captados del ambiente por una célula sensible incorporándolo en el cromosoma.

- **Transducción:** son genes de resistencia que son transportados desde una célula bacteriana a la otra por medio de bacteriófagos.
- **Conjugación:** genes de resistencia a drogas contenidos en un plásmido por una conexión directa formada en la bacteria por un Pili sexual (Vázquez *et al.* 2007)

### **La resistencia antihelmíntica se presenta de diversas formas:**

- **Resistencia paralela:** es un mecanismo que presentan los NGI ante algunas drogas de estructura y mecanismos de acción similares como resultado del desarrollo de resistencia hacia uno de ellos (Sonstegard y Gasbarre 2001).
- **Resistencia cruzada:** se presenta cuando se involucran sustancias químicas de modo de acción diferente (Márquez 2003).
- **Resistencia múltiple:** se presenta cuando los parásitos son resistentes a la acción de varias clases de AH no relacionados químicamente (Vázquez *et al.* 2007).

#### **2.2.1. Aspectos bioquímicos de la resistencia**

Los cambios genéticos que conllevan a una serie de modificaciones bioquímico-moleculares para la generación de la RAH, según Mottier y Lanusse (2001) pueden ser:

- Cambios estructurales y/o funcionales de las células que modifican la captación (llegada) de la droga al sitio de acción, produciendo modificaciones en su metabolismo/inactivación y/o reflujo celular afectando la capacidad de la droga para acumularse intracelularmente.
- Alteración del sistema enzimático necesario para la acción farmacológica de la droga.

- Alteración de los receptores celulares por disminución en el número o en su afinidad, lo cual afecta la unión del fármaco con su sitio de acción y por lo tanto, su efecto farmacológico.
- Variaciones en diferentes procesos celulares que compensan o contrarrestan el efecto inducido por un fármaco.

### 2.2.2. Factores que favorecen la aparición de resistencia

Los diferentes factores que determinan la resistencia se pueden clasificar en externos e internos. Los factores externos dependen del mecanismo de acción del fármaco, frecuencia de los tratamientos, dosis, rotación del compuesto activo y tiempo de acción del fármaco en el organismo. Mientras que los factores internos dependen específicamente de los PGI y se dividen en dos:

1) **Las características genéticas:** heredabilidad, dominancia, nivel de resistencia y habilidad biológica relativa y

2) **Las características biológicas:** potencial reproductivo, intervalo entre generaciones, estadio expuesto a la droga y proporción de la población en refugio (Vásquez *et al.* 2007).

### 2.2.3. Subdosificación

Surge por fallas en el cálculo del peso, debido a la estimación visual del mismo por parte de los ganaderos, lo cual favorece la selección de heterocigotos y el aumento progresivo de tipos de resistencia poligénica (Wolstenholme *et al.* 2004).

Los productos inyectables deben aplicarse en áreas libres de lana (cara interna del muslo), ya que suelen no penetrar correctamente la piel. Con las dosificaciones orales la situación es

diferente, la permanencia de las drogas en el tubo digestivo guarda correlación con el mantenimiento de niveles plasmáticos en el tiempo. Se ha demostrado que el nivel de llenado del rumen afecta la velocidad del pasaje de los productos y con ello la disponibilidad. El ayuno de 12 h previos a la dosificación oral permite una mayor retención de droga en el rumen y un lento pasaje del contenido ruminal, con lo que la disponibilidad y absorción del producto resulta más lenta y los niveles plasmáticos del fármaco son más prolongados, permitiendo una mayor exposición de los parásitos (Hennessy 1994).

Las dosificaciones frecuentes son riesgosas cuando el intervalo entre ellas se encuentra cerca del periodo prepatente (Wolstenholme *et al.* 2004).

#### **2.2.4. Rotación de antihelmínticos**

El uso continuo de un mismo grupo químico facilita la selección y aumento de parásitos resistente a ese grupo. A partir de la década de los 80' se recomendó rotar anualmente las drogas de amplio espectro. Esto basado en el hecho de que las poblaciones seleccionadas por el AH "A" durante un año sólo les quedan dos posibilidades en la siguiente rotación, morir sin ser ingeridas o ser ingeridas por los huéspedes tratados con el AH "B". Parece que esto funciona cuando se trata de drogas sin persistencia (BZ y LV), pero es diferente en el caso de algunas LMC de mayor persistencia. Ante ello, se han propuesto distintos esquemas de rotación para disminuir la posibilidad de fijación de los alelos implicados en la resistencia (Romero y Boero 2001).

Rotación anual de las drogas de amplio espectro que resulten eficaces en test previos. Dada la supervivencia potencial de una generación de strongílidos, es posible utilizar durante un año cada grupo químico sin ejercer una presión de selección mayor. A esta posición se ha expuesto la posibilidad de que en un lapso menor se pueda exponer a la droga más de una generación de larvas sobrevivientes a cada tratamiento (Romero y Boero 2001).

Utilización simultánea de dos grupos químicos en la oportunidad de cada tratamiento. En los últimos años se ha promovido este sistema, según el cual la posibilidad de tener individuos sobrevivientes a un tratamiento es mínima dado que es muy poco probable que un eventual resistente a un grupo logre sobrevivir a una exposición simultánea a otro grupo químico. Esa expectativa es relativa cuando se enfrentan poblaciones donde la resistencia está ya establecida a cada una de las drogas (Leathwick y Hosking 2009).

### **2.2.5. Tiempo de biodisponibilidad del fármaco**

Los imidazotiazoles y BZ disminuyen rápidamente su concentración plasmática, reduciendo la capacidad de los parásitos normales o en refugio a presentar genes de resistencia (Fiel *et al.* 2001). Lo cual no sería del todo satisfactorio en el caso de aquellos productos de acción prolongada como moxidectin, quien ofrece un periodo de protección de 9 semanas con alta persistencia en *Haemonchus spp.*, y *Ostertagia spp.*, provocando un efecto contrario (Nari 2001, Wolstenholme *et al.* 2004).

### **2.2.6. Población en refugio**

Cuando se aplica un tratamiento antiparasitario se afecta a la población que se encuentra en los animales. Sin embargo, es posible que en ese momento un número mayor de huevos o larvas estén en el medio externo y no se expongan a la presión del medicamento, a esto se le conoce como población en refugio (Nari 2001, Wolstenholme *et al.* 2004). Dentro de las poblaciones en refugio se encuentran las larvas hipobióticas (Torres *et al.* 2009). Diversos estudios demuestran que la mayoría de los animales de un rebaño (70-80%) tienen bajas cargas de NGI y sólo un bajo porcentaje tienen altas cargas, siendo estos últimos el responsable de la contaminación parasitaria de las praderas (Hoste *et al.* 2001, Morales 2001, Van Wyk *et al.* 2006). Además se ha demostrado que estos mismos animales son quienes presentan altas cargas parasitarias en los diagnósticos, por lo cual dichos individuos serían los únicos que

eventualmente se desparasitarían con la finalidad de no destruir el refugio interno de los parásitos (Torres *et al.* 2009).

El mantenimiento del refugio en los animales se vuelve importante en aquellas zonas donde existen condiciones de sequía prolongada (4-8 meses), como ocurre en la mayor parte de México. En estas zonas los parásitos de vida libre que se encuentran en refugio en heces o vegetación mueren de acuerdo a condiciones ambientales (temperatura, desecación, humedad, etcétera), depredadores o debido a que no coincidieron con el huésped apropiado agotando sus reservas. Una vez en el huésped los parásitos susceptibles y resistentes estarán sujetos al efecto de las defensas inmunológicas. Finalmente aquellos individuos que hayan superado estas barreras y la acción del fármaco serán los que desarrollen una resistencia para la siguiente época de lluvia. Por lo tanto, desparasitar a todos los animales en este momento del año puede ocasionar que los únicos parásitos sobrevivientes en la siguiente época de lluvias sean resistentes (Wolstenholme *et al.* 2004, Torres *et al.* 2009).

Estudios previos demuestran que en las zonas tropicales con humedad ambiental elevada y temperaturas cálidas, las fases de vida libre pueden morir rápidamente, debido a que estas larvas tienen una gran actividad de translación en la vegetación, lo cual reduce o agota sus reservas de energía (Torres y Hoste 2008).

Según, Fiel *et al.* (2001), cuanto mayor sea la proporción de la población que está en refugio, más lenta será la selección para la resistencia. Sin embargo, los parásitos que poseen ciclos de vida directos y cortos sufren mayor presión de selección para el desarrollo de resistencia que aquellos que poseen ciclos de vida indirectos, ya que estos últimos poseen varios estadios de sus ciclos de vida presionados por la selección ambiental (Vásquez *et al.* 2007).

### 2.2.7. Reversión de la resistencia

Una vez que se presenta RAH puede ocurrir una reversión a la susceptibilidad si se deja de utilizar el principio activo por periodos prolongados, pero al utilizarlo nuevamente se alcanzan rápidamente los niveles de resistencia anteriores (Prichard *et al.* 1980, Kohler 2001).

### 2.3. Mecanismos de resistencia antihelmíntica a los fármacos

Los AH constituyen hasta el día de hoy el principal método de control contra nemátodos en rumiantes, diversos métodos alternativos se están promoviendo por parte de la Food Agriculture Organization y por el Consejo Nacional de Sanidad Animal de México (Hernández *et al.* 2006).

Estos productos químicos se caracterizan por su amplio margen de seguridad, amplio espectro y actividad contra formas maduras e inmaduras de los parásitos. Sin embargo, el efecto antiparasitario de estos compuestos es muchas veces limitado por la eficacia intrínseca de los compuestos, sus propiedades farmacocinéticas, las características biológicas de los animales y de los parásitos, así como por la alta resistencia que han generado los parásitos a todos los compuestos (Márquez 2007).

Los AH de amplio espectro se agrupan en cinco familias según sus mecanismos de acción, cada uno de estos grupos posee varias moléculas que comparten los mismos mecanismos de acción (Romero y Boero 2001).

- Benzimidazoles y Probencimidazoles
- Imidazotiazoles
- Lactonas macrocíclicas
- Organofosforados
- Salicilanilidas

Se ha identificado con precisión la naturaleza genética de la resistencia derivada de la mutación del genoma de los parásitos resistentes, respecto de los susceptibles a las diferentes drogas (Romero y Boero 2001)

### 2.3.1. Benzimidazoles

Los BZ actúan inhibiendo la polimerización de la tubulina para formar microtúbulos, de tal manera que la resistencia a estos productos esta asociada con mutaciones en los genes de  $\beta$ -tubulina causando la pérdida del receptor localizado en el extremo N-terminal de dicha proteína, inhibiendo la unión de la droga (Wolstenholme *et al.* 2004).

Se han identificado dos isotipos de  $\beta$ -tubulina (isotipo 1 e isotipo 2) (Lubega 1994). Prichard (2000), demostró que las mutaciones en el codón 200 ó 167 de la  $\beta$ -tubulina llevan a que se pierda la unión a BZ con el consecuente desarrollo de resistencia. La mutación con mayor incidencia de resistencia a BZ se asocia a cambios en el isotipo 1, donde el polimorfismo Fe (hierro)-Tir (tirosina) se expresa en el codón 200 de  $\beta$ -tubulina (Kwa 1994; Silvestre y Cabaret 2002).

Se han logrado observar cambios en tres aminoácidos del isotipo 1 de *H. contortus* susceptibles (HS-BZ) (Geary *et al.* 1992) y resistentes (HR-BZ) (Kwa *et al.* 1993), el primer cambio se mostró en la posición 76 donde fenilalanina (HS-BZ) es remplazada por valina (HR-BZ), el segundo cambio se observó en la posición 200 donde fenilalanina (HS-BZ) es remplazada por tirosina (HR-BZ) y el tercer cambio se encuentra en la posición 368 donde valina (HR-BZ) es remplazada por isoleucina (HS-BZ).

En los primeros estudios se lograron detectar en poblaciones de HR-BZ un segundo polimorfismo de Fe-Tir en el codón 167 de  $\beta$ -tubulina del isotipo 2 (Prichard 2001), el polimorfismo de este codón también estaba presente en *Teladorsagia circummcita*, pero no en *T. colubriformis* (Silvestre y Cabaret 2002).

El grado de resistencia depende de la acumulación de mutaciones de Fe 200 Tir en otros codones de los isotipos 1 y 2 de  $\beta$ -tubulina (Beech 1994, Roos 1995, Prichard *et al.* 2000), o bien de ese tipo de mutaciones en el isotipo 1 seguido por una pérdida de locus del isotipo 2 (Vásquez *et al.* 2007).

En los mamíferos la  $\beta$ -tubulina posee tirosina en la posición 200, es poco probable que la resistencia a los BZ pueda solucionarse con cambios en la química de la droga para mejorar su toxicidad, debido a que la  $\beta$ -tubulina del huésped como de los nemátodos mantienen la misma afinidad, este factor reduciría su margen terapéutico (Vásquez *et al.* 2007).

Además de tales cambios en los isotipos, informes sugieren que la modulación de la actividad de la bomba de salida P-glicoproteína de la membrana celular podría contribuir a la resistencia a BZ en *T. colubriformis* (Kerboeuf *et al.* 2003).

### **2.3.2. Imidazotiazoles (levamisol) y tetrahidropirimidinas (morantel, pirantel)**

El LV es el AH colinérgico más utilizado, este actúa como agonista en los receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) en la unión neuromuscular del nemátodo causando una parálisis espástica. Las cepas resistentes a LV también lo son a morantel y pirantel, aunque son químicamente diferentes poseen el mismo mecanismo de acción (Prichard *et al.* 1980).

Mottier y Lanusse (2001), sugieren que la expresión de la resistencia de los NGI al LV se debe a la alteración o reducción en el número de receptores colinérgicos, o bien a la menor afinidad a estos receptores por parte del compuesto. Lo anterior se ve reflejado en un incremento de la desensibilización de los receptores permaneciendo por menos tiempo abiertos, disminuyendo la despolarización y por consecuencia generando una menor contracción (Sangster *et al.* 1998).

Este fenómeno debe en parte a los alelos como: Lev-1, unc-29 y unc-38 encontrados en *C. elegans* que codifican para subunidades proteicas que forman los canales iónicos nicotínicos del nemátodo (Flemming *et al.* 1997).

Se ha descrito la mutación generada en Lev-1 para la generación de resistencia. Esta mutación se ha observado en el poro iónico del receptor nicotínico donde se da el remplazo de ácido glutámico por lisina en la posición 237 (Flemming *et al.* 1997). Este cambio es suficiente para alterar el canal iónico, pasando de catiónico a aniónico, inhibiendo la excitabilidad del canal. Además Lev-1 posee un segundo aminoácido, leucina, en el poro del canal iónico en la posición 247 (Galzi *et al.* 1992). En general esta mutación incrementa la desensibilización del receptor colinérgico y reduce la afinidad por el LV disminuyendo su efecto (Martín 1997).

Los nemátodos poseen una gran familia de nAChR y los esfuerzos de clonación molecular hasta el momento no han podido revelar cualquier polimorfismo asociado con la RAH (Sangster y Gill 1999).

Existen resultados que sugieren que la resistencia genética pudiese estar ligada al sexo con un gen en *T. colubriformis* y *O. dentatum*, pero en *H. contortus* podrían estar involucrados múltiples genes (Wolstenholme 2004).

### **2.3.3. Lactonas macrocíclicas**

Estos fármacos actúan como agonistas de elevada afinidad sobre la subunidad  $\alpha$  de canales selectivos a cloro presentes en nemátodos y artrópodos. Los canales están compuestos por cinco subunidades proteicas que combinadas entre si forman un pentámero. El ligando natural en invertebrados de estos canales iónicos es el glutamato (Glu), estos receptores están ubicados, en mayor medida, en células somáticas de la bomba faríngea, útero y neuronas, por lo que la exposición al fármaco afecta la motilidad, capacidad de alimentación y fecundidad (Yates *et al.* 2003).

### 2.3.3.1 Mecanismos relacionados con los receptores GluCl

Mediante clonación y expresión se identificaron dos subunidades del canal iónico GluCl en *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*): La subunidad GluCl $\alpha$ 1 y GluCl $\beta$ , quienes resultaron sensibles a Glu pero no a la IVM. Aquellas subunidades pueden ensamblarse y formar canales sensibles a Glu como a cualquier avermectina (AVM) (Liu *et al.* 2004). Por lo tanto, la resistencia a AVM en *C. elegans* se da por mutaciones simultáneas en los tres genes: Glc-1, Avr-14 y Avr-15, los cuales codifican para las subunidades: GluCl $\alpha$ 1, GluCl $\alpha$ 3<sup>a</sup> y GluCl $\alpha$ 3<sup>b</sup>; y GluCl $\alpha$ 2, respectivamente (Dent *et al.* 1997, Dent *et al.* 2000). La presencia de más de una subunidad  $\alpha$  en el receptor GluCl indica la presencia de más de un sitio de acción para IVM (Mottier y Lanusse 2001).

También se observaron mutaciones en los genes *unc-7* y *unc-9*, quienes restringen el efecto de AVM sobre las neuronas con receptores GluCl sin alcanzar el músculo faríngeo. Mientras que, la IVM puede inhibir directamente el músculo faríngeo mediante dos vías: 1) a través de la subunidad que codifica el gen Avr-15, y 2) a través de Avr-14, *unc-7* y *unc-9*, expresados en la neurona extra faríngea (Dent *et al.* 2000). Mediante técnicas de clonado se ha logrado identificar dos genes en *H. contortus* y *A. suum* (HcGBR2A y HcGBR2B), los cuales presentan alta homología con el gen Avr-14 (Jagannathan *et al.* 1999).

La resistencia a la IVM también se ha relacionado con una disminución en la permeabilidad de la cutícula, mediante genes denominados Dyf, cuyo producto de expresión es responsable de esta captación. Por ejemplo, cuando mutan “*osm-1*” confiere resistencia, debido a que la cutícula de los parásitos es menos permeable a la droga, la cual no puede alcanzar su receptor (Dent *et al.* 2000).

### 2.3.3.2. Mecanismos de resistencia que involucran a la glicoproteína-P (Gp-P)

Dentro de los potenciales mecanismos de resistencia a las AVM se ha propuestos el flujo de droga mediado por la Gp-P (Kerbouef *et al.* 2002). Está es una proteína transportadora de membrana de mamíferos y algunos parásitos asociada al fenómeno de resistencia a múltiples

drogas. Considerando que diversas Gp-P expresadas por los parásitos difieren en algunas cuestiones con la de los mamíferos (Williamson y Wolstenholme 2012), se abre el panorama a desarrollar inhibidores específicos de estas proteínas a nivel parasitario que no interaccionen con proteínas transportadoras en el huésped, evitando interferencia con otras funciones fisiológicas (Lifschitz *et al.* 2011).

Su localización sugiere que la Gp-P cumple un papel en la regulación del transporte de fármacos a través de las membranas celulares por un proceso dependiente de energía (Lifschitz *et al.* 2011). De esta manera, esta proteína participa en los procesos de absorción, distribución y excreción de diferentes xenobióticos (Lanuse *et al.* 2005).

La estructura y/o la transcripción del gen de la Gp-P están alteradas en nemátodos resistentes a endectocidas (Xu 1998). Estudios en poblaciones de *H. contortus* encontraron evidencia de la asociación de genes Gp-P con IVM (Blackhall *et al.* 1998). Sin embargo estos resultados no son consistentes (Sangster *et al.* 1999). Por su parte, Le jambre (1999) indica que un gen de Gp-P en *H. contortus* no determina la resistencia.

Lifschitz *et al.* (2011), evaluaron la expresión de Gp-P en cepas de *H. contortus* resistentes y susceptibles a IVM, encontrando que la expresión de la proteína fue mayor en cepas resistentes que en susceptibles. Lo mismo se pudo contemplar con los estudios de Xu 1998, quien determinó que el ARNm de la Gp-P está presente en cantidades mayores en *H. contortus* resistentes a IVM. Lo anterior sugiere que la Gp-P se encuentra sobre expresada en nemátodos resistentes.

Varios autores demostraron que hay cuatro genes y al menos 50 diferentes alelos Gp-P en *H. contortus* (Sangster 1999, Xu 1998). Dos familias de genes que codifican para la Gp-P (PGP-A en *H. contortus* y A28) (Sangster 1999) y para las subunidades del canal GluCL son seleccionadas por tratamientos repetidos con IVM o Moxidectina (Blackhall *et al.* 1998).

Por consiguiente, podría enunciarse que la resistencia a AVM es poligénica y estaría asociada a modificaciones de las subunidades de receptores GluCl y/o a la variación o expresión

incrementada de la Gp-P, lo cual impediría alcanzar concentraciones activas de la molécula antiparasitaria en el receptor de glutamato del parásito resistente (Kerboeuf *et al.* 2003).

## **2.4. Métodos para el diagnóstico de resistencia parasitaria**

Actualmente la mayoría de estas técnicas son empleadas en la evaluación AH de EV.

### **2.4.1. Pruebas *in vitro***

#### **2.4.1.1. Prueba de eclosión de huevos**

Esta prueba fue desarrollada para la detección de resistencia a los BZ (Márquez 2003). Se basa en el aislamiento e incubación de huevos no desarrollados de nemátodos en diluciones seriadas de BZ durante 48 h a 26 °C (Álvarez *et al.* 2002). Posteriormente, se determina el porcentaje de los huevos eclosionados en cada dilución y se corrige la mortalidad natural observada en el lote control (Morrondo 2008).

Por lo tanto, la dosis discriminante es la que logra matar el 99% de los huevos susceptibles, de modo que los que sobreviven a esta concentración serán resistentes al fármaco (Coles *et al.* 2006).

Se ha observado que los huevos de las cepas susceptibles raramente eclosionan a concentraciones por encima de 0.1 µg/ml de algún AH (Coles *et al.* 1992). Entre los inconvenientes de esta técnica destaca la necesidad de huevos no embrionados ya que poseen mayor susceptibilidad y los BZ sólo actúan sobre el huevo en la primer parte del desarrollo (Cutullé *et al.* 1999). Un inconveniente de los nuevos BZ como el febendazol es que resultan inadecuados para la prueba por su escasa solubilidad y bajo poder ovicida (Lacey y Pichard 1986). Por lo cual, el TBZ es el compuesto empleado en mayor medida por su solubilidad en agua (Coles *et al.* 2006). Otra consideración a tomar en cuenta es que los huevos embrionados y larvados se cuentan, esto puede llegar a dar resultados falsos positivos (Cutullé *et al.* 1999).

#### 2.4.1.2. Prueba de motilidad larval

Esta prueba se desarrolló especialmente en larvas de *Ostertagia ssp.*, y *Haemonchus spp.*, se basa principalmente en que algunos productos como LV, pirantel y morantel actúan produciendo parálisis en los NGI.

Las larvas de los NGI son expuestas durante 24 horas a diferentes concentraciones de una determinada droga (Gill *et al.* 1991), para después evaluar el grado de motilidad larval en un medidor de micromotilidad (Morrondo 2008).

El ensayo de motilidad larval se ha probado *in vivo* para valorar la capacidad del mucus gastrointestinal en la inhibición de la migración larvaria. En cuanto a esto, las ovejas que presentan resistencia antiparasitaria provocan una mayor inhibición en la motilidad larvaria respecto de las ovejas susceptibles (García *et al.* 2003).

Esta práctica se vuelve subjetiva al momento de valorar la parálisis larvaria, lo cual conduce a falsos positivos. Debido a que posterior a la administración del tratamiento los parásitos pueden permanecer inmóviles pero continuar vivos (Kotze *et al.* 2004). Ante esta situación, Satou *et al.* (2001) utilizaron 40 µl de agua caliente a 50°C para estimular la motilidad de gusanos no afectados por la droga.

#### 2.4.1.3. Prueba de parálisis larval

Esta prueba se desarrolla para detectar resistencia al LV y morantel (Martin y Le jambre 1979). La técnica se basa en determinar el porcentaje de L<sub>3</sub> paralizadas después de haber sido expuestas por 24 h a diluciones seriadas del AH (Taylor *et al.* 2002).

La prueba tiene la ventaja de utilizar L<sub>3</sub> fácilmente obtenidas por coprocultivo que permiten ser almacenadas en refrigeración por largo tiempo (Dobson *et al.* 1996). Sin embargo, presenta una serie de desventajas, por ejemplo: Ocurre una dosis respuesta atípica, por lo que altas concentraciones de LV son menos efectivas para inmovilizar a las larvas, otra desventaja es la

subjetividad que se presenta en la técnica a la hora de valorar la parálisis larvaria, conduciendo a falsos positivos (Cutullé *et al.* 1999). Por otro lado, la incubación por tiempo prolongado induce a un cambio en el porcentaje de motilidad larval (Martin y Le Jambre 1979). La reversibilidad de la parálisis es uno de los fracasos de este método (García *et al.* 2003, Kotze *et al.* 2004).

#### **2.4.1.4. Prueba de desarrollo larval**

La prueba se basa en exponer huevos de NGI a diluciones seriadas de un fármaco, utilizando medios de cultivo específicos e incubándolos por 7 días a 26 °C hasta alcanzar el tercer estadio. Para la evaluación se recomienda utilizar un control únicamente con medio nutritivo (Márquez 2003). Esta técnica requiere de un monitoreo continuo de la placa incubada hasta la terminación de la prueba, además de huevos libres de desechos orgánicos (Cutullé *et al.* 1999).

#### **2.4.1.5. Prueba de desarrollo para adultos**

Las técnicas para el cultivo de parásitos adultos se consideran prácticas, pero poseen sus limitantes, los cultivos tienden a ser delicados. Habido poco progreso en esta área, debido a la complejidad de las técnicas de cultivo requeridas y las consideraciones de viabilidad de cada parásito fuera del huésped. Sin embargo, los ensayos de desarrollo de adultos *in vitro* para detectar la resistencia de BZ en *H. contortus* han sido satisfactorios (Small y Coles 1993) y se ha logrado su cultivo hasta la etapa adulta (Stringfellow 1984, 1986).

En todos los ensayos *in vitro* el porcentaje de eclosión y mortalidad se corrige en base a la mortalidad natural de los controles, los datos se someten a análisis “probit” para estimar la DL<sub>50</sub> y DL<sub>99</sub>.

## 2.4.2. Pruebas *in vivo*

### 2.4.2.1. Prueba de la reducción de la oviposición

Determina el efecto del AH sobre los GA dentro del huésped, el cuál imposibilita la oviposición. En comparación con la prueba de EHA que basa su actividad ovicida (Von Witzendorff *et al.* 2003).

Se han desarrollado diferentes métodos para calcular el porcentaje de reducción de huevos en heces (Duncan *et al.* 2002). Se contempla que un porcentaje superior al 90% en la oviposición después de un tratamiento de 7 a 10 días es indicativo de RAH (Coles *et al.* 1992, Kumar y Yadar 1994, García *et al.* 2003).

Para llevar a cabo la prueba se recomienda utilizar 10 animales por evaluación entre 3-6 meses de edad o bien, que presenten recuentos de huevos mayores a 150 huevos por gramo de heces (hpg), además de contar con un grupo control para conocer las posibles variaciones durante el periodo de estudio. En cuanto a la toma de muestras fecales se sugieren los siguientes periodos: LV (3-7 días), BZ (8-10 días) y AVM (14-17 días) (Coles *et al.* 2006).

Los resultados en la prueba de reducción de oviposición pueden no proporcionar información suficiente para su interpretación, ya que la eficacia antihelmíntica no se puede estimar con precisión, debido a que la prueba solo mide la producción de huevos por gusanos maduros. Por lo tanto, la cantidad de huevos no siempre se correlaciona con la cantidad real de gusanos presentes en el huésped (Taylor *et al.* 2002).

Sangster *et al.* (1979), encontraron una buena correlación entre los recuentos de huevos y la cantidad de GA de *H. contortus* dentro del huésped, pero no para *T. colubriformis*. Mientras que, Martin *et al.* (1985), no observaron correlación para *O. circumcincta*.

#### **2.4.2.2. Prueba de eficacia antihelmíntica controlada**

Se determina por la comparación de poblaciones de PGI en grupos de animales tratados y control distribuidos aleatoriamente. La necropsia, identificación y conteo del total de PGI adultos recuperados de la luz intestinal de los animales son comparados entre los dos grupos (Márquez, 2003). Este método es por lo general aplicado cuando existe un interés especial para confirmar resistencia o efectividad de un fármaco. No obstante, el costo de los animales involucrados en la necropsia, así como el recuento e identificación de los parásitos desalienta esta metodología (García *et al.* 2003).

### **2.5. Métodos alternativos para el control parasitario**

Debido a la disminución en la eficacia de las drogas antihelmínticas, se han realizado esfuerzos para desarrollar métodos alternativos que permitan el control de los PGI (Hoste *et al.* 2006, Ketzis *et al.* 2006). Algunas prácticas disminuyen el uso de tratamientos AH, aletargando el desarrollo de RAH.

Dado que la dependencia de los fármacos para el control de los parásitos ha resultado insostenible tanto ambiental, económica y socialmente por el incremento de los costos, el incremento de la resistencia parasitaria y la presencia de residuos químicos en carne, leche y otros derivados, se hace necesario el cambio de estos enfoques de control, en tanto la combinación de distintas herramientas ha demostrado mayor eficiencia (Márquez 2007).

#### **2.5.1. Selección de animales resistentes**

La intensidad o niveles de infestación no son similares en todos los animales de un rebaño (Pino *et al.* 2002). La identificación de aquellos individuos que bajo las mismas condiciones de manejo presentan características genéticas propias a la resistencia contra NGI de manera natural, es un factor importante para la producción óptima (Torres y Hoste 2008).

---

**La selección de animales dentro de un sistema de producción se basa en tres premisas:**

**1) Animales resistentes:** Son aquellos individuos capaces de resistir el establecimiento y posterior desarrollo de las larvas infectantes ingeridas, así como disminuir la velocidad de desarrollo de los diferentes estadios larvarios, lo cual sugiere que los animales resistente poseen bajas cargas parasitarias y las hembras presentes mantienen niveles bajos de postura (Morales *et al.* 2005). El aumento de la resistencia de los animales reduce la contaminación de las pasturas, disminuyendo la disponibilidad de larvas infectantes para los animales en pastoreo (FAO 2003).

**2) Animales resilientes:** Es la habilidad del animal de mantener niveles productivos aceptables a pesar de la infección parasitaria (Morales *et al.* 2006).

**3) Animales acumuladores:** Son aquellos animales que dentro del rebaño albergan altas cargas parasitarias. A diferencia de los animales resilientes, los acumuladores experimentan los efectos de los NGI y constituyen la fracción dentro del rebaño que constantemente debe ser tratada (Morales *et al.* 2002).

Existen diferencias importantes entre animales resistentes y resilientes desde el punto de vista epidemiológico, los animales resistentes no son contaminadores potenciales de las praderas (Hunt *et al.* 2008), mientras que los resilientes al mantener altas cargas de parásitos entre ellos hembras adultas potencian la contaminación de praderas (Morales *et al.* 2005).

El desarrollo de la tecnología genética ha permitido la detección de marcadores propios de la RAH, los cuales puede ser distinguidos de los componentes ambientales (Hunt *et al.* 2008). Este mecanismo constituye un carácter de gran importancia que debe ser considerado a la hora de establecer un programa de selección natural (Benhnke *et al.* 2009, FAO 2003). Aún se esta buscando la forma de integrar esta tecnología en el manejo de producción de los rebaños (Jackson *et al.* 2009).

## 2.5.2. Inmunización animal

Desde hace tiempo se ha reconocido que los rumiantes expuestos constantemente a los NGI se vuelven resistente, es sólo en la última década que comenzó a tomar importancia la evaluación de antígenos para aumentar la inmunidad de los huéspedes (Knox *et al.* 2003).

El grado de inmunidad de la vacuna está altamente correlacionado con el título de los anticuerpos (Munn *et al.* 1997, Smith *et al.* 1999), este puede ser transferido por inmunidad pasiva a las ovejas a través del suero (Smith 1993) o a corderos mediante el calostro (Andrews *et al.* 1995).

Varios tipos de proteínas se han utilizado para inmunizar a pequeños rumiantes con resultados variables. Estas proteínas se han clasificado en antígenos naturales y ocultos. Los antígenos naturales son reconocidos por el sistema inmunológico durante la infección y están constituidos principalmente por productos de excreción-secreción (ES) y antígenos somáticos o de membrana. Por lo tanto, los antígenos ocultos resultan ser eficaz contra nemátodos hematófagos y no hematófagos (Newton y Meeusen 2003). Por su parte, un antígeno oculto es aquel que no es reconocido por el huésped después de la infección (Cachat *et al.* 2010). Aunque estos no son eficaces contra NGI no hematófagos, pero presentan una eficacia del 80% sobre parásitos hematófagos (Knox *et al.* 2003).

### 2.5.2.1. Antígeno natural

La inmunización natural se centra en los antígenos de ES y somáticos de los estadios larvarios que inducen una respuesta en el sistema inmunológico (Newton y Meeusen 2003).

Schallig *et al.* (1994), no encontraron resultados utilizando antígenos de ES (15/24 kDa) de L<sub>4</sub> y adultos de *H. contortus*. Mientras que, Jacobs *et al.* (1999), evaluaron la actividad en ovejas de un antígeno aislado de la superficie de L<sub>3</sub> de *H. contortus* (Hc-SL3) en aplicación de dos coadyuvantes. No observaron resultados para Quil-A. Mientras que, el hidróxido de aluminio redujo en un 64 a 69% el conteo de hpg y de 45 a 55% la carga de GA. Por su parte, Domínguez *et al.* (2000), vacunaron corderos manchegos entre 3.5-5 meses contra *H.*

*contortus* con una fracción somática (p26/23) de parásitos adultos, la inmunización provocó una reducción del 60% en el conteo de hpg y del 61.6% en la carga de GA, valores que se correlacionaban con la inducción del alto nivel de anticuerpos.

Alunda *et al.* (2003), aislaron tres péptidos obtenidos a partir de extractos solubles de adultos de *H. contortus* con diferentes pesos moleculares. Todas las fracciones indujeron una respuesta inmunitaria entre los 4 y 4.5 meses de edad en corderos, pero no se observó una reducción en el conteo de hpg y sobre la carga de GA.

### **2.5.2.2. Antígeno oculto**

En los animales inmunizados naturalmente no se observa una pérdida de GA. Por otro lado, el establecimiento de larvas no se vio afectado en ovejas inmunizadas con proteínas de la membrana intestinal *Haemonchus* (Smith y Smith 1993), pero sí se redujo el número de GA, especialmente las hembras, disminuyendo la cantidad de huevos (Smith *et al.* 1994).

Por lo tanto, los antígenos ocultos se cree son menos propensos a la presión de selección aumentando la variación genética (Knox *et al.* 2010).

#### **2.5.2.2.1. Antígeno H11**

El antígeno H11 (110 kDa) es una glicoproteína obtenida exclusivamente de las microvellosidades intestinales de los GA de *H. contortus*. Es un inmunógeno altamente eficaz (90% en la reducción de huevos y 75% en la carga de gusanos) contra *H. contortus* (Newton y Munn 1999). La protección está estrechamente correlacionada con los títulos de IgG específicos a H11 (Munn *et al.* 1997). Posee varias propiedades, es eficaz en corderos jóvenes y entre una variedad de razas de ovinos, así mismo contra gusanos resistentes (Newton y Munn 1999).

En un estudio con ovejas gestantes inmunizadas con H11 durante el último trimestre de la gestación y enfrentadas a 10 000 L<sub>3</sub> de *H. contortus*, se observaron reducciones del 98-99% en

el conteo de hpg. Además, los corderos nacidos y criados por ovejas vacunadas desarrollaron un nivel óptimo de anticuerpos a las 5 semanas de edad (Andrews *et al.* 1995). La protección del antígeno oculto puede persistir durante varias semanas (Andrews *et al.* 1997) hasta que las ovejas son capaces de regular a *Haemonchus* a través de la inmunidad natural (Barger *et al.* 1985). Existe evidencia experimental de que la inmunidad del antígeno oculto no interfiere con la inmunidad adquirida (Smith y Smith 1993).

Actualmente se cuenta con una vacuna (Ketzis *et al.* 2006) y la identificación de los antígenos viables para *H. contortus* (Smith 2008) y *Ostertagia* (Meyvis *et al.* 2007; Smith 2008), aunque se observe poca protección contra *Teladorsagia* (Smith *et al.* 2001).

#### **2.5.2.2.2. *Haemonchus* glicoproteína que contiene complejo galactosa (H-gal-GP)**

H-gal-GP es un complejo que se purifica a partir de las células intestinales de GA de *H. contortus* utilizando lectinas con especificidad a N-acetilgalactosamina (Smith *et al.* 1994). Se cree que esta proteína participa en la digestión de la sangre. Los componentes de protección del complejo son una familia de cuatro metalo endopeptidasa (MAP) y dos aspartil proteasas (PEP) (Raleigh *et al.* 1996, Smith *et al.* 1999, Redmond *et al.* 2004). H-gal-GP produce un grado de protección en corderos inmunizados, experimentando reducciones del 93% en el conteo de hpg y del 72% en la carga de GA (Smith *et al.* 1994).

Cox *et al.* (1990), evaluaron una proteasa de 35 kDa que correspondía a un complejo degradante de fibrinógeno aislado de GA, encontrando una reducción del 93% sobre el conteo de hpg y 87% en la carga de GA. Por su parte, Knox *et al.* (1999) evaluaron una proteasa de cisteína compuesta de tres catepsina B (70 kDa). Las ovejas vacunadas con esta proteasa demostraron una reducción del 77% en el conteo de hpg y un 47% en la reducción de GA.

En otro estudio, ovejas Merino vacunadas con proteínas de la membrana intestinal obtenidas de *H. contortus* adulto (Combinación nativa de H11 con H-gal-GP) mostraron una reducción significativa de la anemia y glóbulos blancos, así como altos niveles de anticuerpos (IgG1 e IgG2) en plasma. La reducción en el conteo de hpg y la reducción de la carga de GA fue significativa (Le Jambre *et al.* 2008).

Por otro lado, corderos de 7 meses de edad inmunizados con un homogeneizado intestinal de *H. contortus* reportaron una reducción del 77% en el conteo de hpg y del 78% en la carga de GA, además de un alto nivel de anticuerpos (Nayebzadeh *et al.* 2008).

### 2.5.2.3. Antígenos recombinantes

Se han llevado a cabo varios intentos para producir antígenos recombinantes con la ayuda de la biología molecular. Uno de los antígenos recombinantes de gran importancia fue el asociado a *Boophilus microplus* (BM 86), el cual sirvió de marco para los estudios con NGI (García *et al.* 2000).

Desafortunadamente, los estudios no han sido del todo alentadores debido a sus resultados negativos. Newlands *et al.* (1999), inmunizaron corderos de 6-8 meses con una proteína lectina y galactosidebinding  $\beta$ -35 KDa que se considera parte del complejo H-gal-GP, sin embargo la proteína no indujo alguna respuesta de anticuerpos detectable, ni redujo significativamente la cantidad de hpg o la carga de GA.

Tres isoformas de H11 (las versiones H11s, H11-1, H11-2 y H11-3) se han expresado en células de insectos utilizando baculovirus recombinante. El H11 suscitó alto nivel de anticuerpos, pero sin reducción significativa (30-40%) de los hpg (Smith *et al.* 1997).

Corderos de 5 meses de edad fueron inmunizados con un cóctel de proteínas recombinantes de GST-hmcp (hmcp1, 4 y 6). Estas fracciones no indujeron una reducción en el conteo de hpg, aunque provocaron una disminución significativa (38%) en la CG en la necropsia y con títulos de inmunoglobulinas siete veces mayor en comparación con el grupo control (Redmond y Knox 2004).

Se ha evaluado la actividad de HCO-gal-2 quien forma parte del complejo H-gal-GP sin resultados favorables (Newlands *et al.* 1999). Cachat *et al.* (2010), evaluaron un cóctel de proteasas recombinantes derivado del antígeno protector H-gal-GP (rMEP1, rMEP3 y rMEP4), así como un antígeno de *H. contortus* (rPep1). La inmunidad protectora sólo se observó en el grupo inmunizado con H-gal-GP nativo. El complejo nativo pierde parte de su

capacidad de protección cuando se disocia, lo que indica que los epítomos conformacionales son importantes y pueden explicar por qué los recombinantes expresados en bacterias insolubles no protegen (Jacobs *et al.* 1999).

Ante la variedad de resultados se considera que H-gal-GP es un antígeno muy complejo y se forma a partir de varias proteínas, hasta ahora no se conoce la forma activa para producir la inmunidad contra la haemoncosis. Se han realizado diversos ensayos para clonar diferentes partes de esta proteína sin resultados significativos (Newton y Meeusen 2003).

La vacunación con una proteína recombinante de ES (15/24 kDa) de *H. contortus* indujo cierto grado de protección en ovejas con una edad de 9 meses, arrojando reducciones del 49% en el conteo de hpg y del 55% en la carga de GA. Sin embargo, en animales de 3 meses de edad no se observaron aumentos significativos de inmunoglobulinas, mastocitos y se pudo observar la presencia de eosinófilo, esto apunta a la independencia entre respuestas (Vervelde *et al.* 2002).

Del mismo modo, una forma recombinante de proteína (p26 y p23) se ha empleado para vacunar a corderos de 3 meses de edad. La inmunización provocó una fuerte respuesta de anticuerpos específicos hasta el final del experimento, pero sin reducción en el número de hpg y de la carga de GA cuando se comparan con los animales control (García-Coiradas *et al.* 2010).

### **2.5.3. Mejoramiento nutricional**

Los animales con altos requerimientos nutricionales resultan más sensibles a las infecciones con NGI (Coop y Kyriazakis 1999). Por lo tanto, los animales suplementados con proteína reducen el número de hpg (Ketzis, 2002). A su vez la suplementación compensa la pérdida de proteína e inapetencia causada por los NGI (Strain y Stear 2001).

Inicialmente, Brown *et al.* (1991), evaluaron la administración de caseína y glucosa directamente en abomaso de corderos, observando que la inclusión de proteína redujo los hpg. y la carga de GA. Por lo tanto, la mayoría de los estudios se ha centrado en las consecuencias de la administración de suplementos proteicos (Kahn *et al.* 2001).

Tanto la inmunoglobulina IgG1 e IgA han sido asociadas con una reducción en los hpg y sobre la carga parasitaria (Gill *et al.* 1993). Strain y Stear (2001), probaron una dieta basal y una dieta suplementada con proteína adicional, observando que los corderos suplementados adicionalmente con proteína mantienen una asociación significativa entre la reducción del tamaño de hembras de GA y el aumento de la IgA contra larvas L<sub>3</sub>. Por otro lado, se evaluó el efecto de la infección por *H. contortus* en ovinos alimentados con una dieta moderada y alta en proteínas. Los resultados mostraron que el aumento de proteína en la dieta de corderos en crecimiento beneficia la RAH, pero estos beneficios pueden variar entre razas (Bricarello *et al.* 2005). En otro estudio, 30 corderos Santa Inés bajo pastoreo fueron suplementados con una dieta alta en proteína (19%) y otra baja en proteína (11%). La suplementación de la dieta con alto contenido de proteínas fue capaz de mejorar la resiliencia y resistencia a la infección natural por endoparásitos durante la estación lluviosa, observándose una disminución de estos rasgos en época seca, estos resultados pueden estar vinculados a la calidad del forraje en la época (Louvandini *et al.* 2006).

Por otro lado, el efecto de la raza y la suplementación con proteína ha sido ampliamente estudiado. Como se observa en la inclusión de proteína en la dieta de corderos Horro y Menz de 4 a 12 meses de edad. Donde los resultados sugieren que los corderos Menz adquieren la capacidad de resistir y tolerar mejor las infecciones por endoparásitos (Haile *et al.* 2002).

#### **2.5.4. Agujas de óxido de cobre**

Las agujas de óxido de cobre (AOC) se dosifican en cápsulas de manera oral, estas llegan a abomaso donde por acción del pH ácido liberan de manera continua iones de óxido de cobre.

Las AOC presentan una elevada eficacia contra *H. contortus* con una persistencia superior al 46%, 35 días después de su dosificación (Caballero *et al.* 2011).

Chartier *et al.* (2000), encontraron en cabras reducciones del 75% de *H. contortus*, así como un disminución (37-95%) en la producción de huevos con relación al establecimiento de nuevas infecciones durante varias semanas. Algo similar se observó con *T. colubriformis* y *H. contortus* en Yucatán, las agujas disminuyeron la carga parasitaria y afectaron la fecundidad de las hembras (De Montellano *et al.* 2007).

A pesar de sus acciones positivas, las AOC muestran el riesgo derivado del cobre acumulado en el hígado de los animales tratados. Sin embargo, las cabras son menos susceptibles que las ovejas a la toxicidad del cobre (Pouliquen y Douart 1998). Por tal motivo, su aplicación se recomienda hasta después del primer año de vida y con aplicaciones cada 60 días (Caballero *et al.* 2011).

### **2.5.5. Desparasitación selectiva**

Malan y Van Wyk (1992), refieren la existencia de correlación entre el color de la conjuntiva ocular, valor del hematocrito y nivel de infestación por *H. contortus*. De esta manera, el color de la conjuntiva ocular con el valor hematocrito permite establecer distintos niveles de anemia (Van Wyk y Bath 2002). Este hallazgo permitió el desarrollo del método FAMACHA (Hansen *et al.* 2001) que a partir de la estandarización de los niveles de anemia, según los colores de la conjuntiva ocular y el peso corporal del animal (Canul-Ku *et al.* 2008), ayuda a la identificación de los animales que presenten cantidades mayores a los 750 hpg (Torres-Acosta *et al.* 2010). Esta práctica permite optimizar los tratamientos selectivos, disminuir las pruebas de laboratorio y reducir el uso de AH (Morales *et al.* 2010).

### 2.5.6. Hongos nematófagos

Son organismos que utilizan a los nemátodos como fuente de alimento. En este sentido los hongos depredadores producen anillos, ramas, conidias y esporas adhesivas para atrapar y posteriormente digerir al parásito, interrumpiendo el ciclo biológico, evitando la contaminación de la pradera y disminuyendo las reinfecciones del ganado en pastoreo (Mendoza de Gives 2000).

Entre los hongos nematófagos de interés se encuentran los géneros *Arthrobotrys sp.*, *Monacrosporium sp.*, y *D. flagrans* que han demostrado ser buenos candidatos para el control de las larvas de NGI en su etapa de vida libre (Mendoza 2003).

El hongo *D. flagrans* ha sido estudiado ampliamente *in vitro* e *in vivo*. Este hongo se administra en suspensión oral o incorporándolo en bloques multitrinutricionales (Casillas Aguilar *et al.* 2008), una vez ingerido, las clamidosporas pasan a través del tracto gastrointestinal de los animales y son eliminadas junto con las heces al medio ambiente, posteriormente germinan y forman sus trampas con las que capturan y matan a los estadios larvarios de los parásitos para nutrirse de sus tejidos (Mendoza de Gives 2011).

Sin embargo, una gran cantidad de hongos nematófagos son degradados por el proceso de digestión. No obstante, especies como *D. flagrans* han despertado interés, debido a que son capaces de producir cantidades de clamidosporas resistentes cuya degradación gastrointestinal es menor conservando su actividad depredadora contra nemátodos (Campos *et al.* 2009).

Entre las desventajas que se observan con este y otros hongos son las altas dosis ( $1 \times 10^5$  hasta  $4.5 \times 10^6$  clamidosporas por kg de peso vivo) requeridas para ejercer un efecto nematicida, así como los tiempos de aplicación que suelen prolongarse desde los 28 días hasta varios meses (Paraud *et al.* 2006; Schafer *et al.* 2009). Por otro lado, se ha reportado un porcentaje de recuperación de clamidosporas en heces, entre el 6 y 11% de lo administrado, demostrando que gran cantidad se digiere en el tracto digestivo reduciendo significativamente el efecto sobre los parásitos (Ojeda *et al.* 2008, da Silva *et al.* 2009).

A pesar que *D. flagrans* ha demostrado resultados positivos como lo reportado por Mendoza *et al.* (2006), donde se observó una reducción en un 51.1% para *H. contortus* y 100% para *Cooperia sp.* También se han detectado efectos no claros en la eficacia de dicho hongo administrado en forma oral a ovinos (Epe *et al.* 2009). Valero (2006), en un estudio con *M. eudermatum*, *A. musiformis* y *D. flagrans*, encontró una actividad nematicida variable dependiente del tiempo y del medio en el que se encontraron dichos hongos, obteniendo resultados entre el 25 y 85% de eficacia a las 168 h contra *H. contortus*. Mientras que, Mendoza *et al.* 2006, utilizando *D. flagrans* no hallaron efectos sobre *Trichostrongylus sp.* Actualmente, los estudios se basan en la búsqueda de sustancias nematotóxicas y la identificación de productos extracelulares (MS y enzimas) que permitan un control directo más eficiente y con menos efectos colaterales sobre los animales y la entomofauna (Acevedo 2011).

### 2.5.7. Pastoreo alterno rotativo

Una estrategia de control parasitario tendiente a disminuir el uso de AH se basa en el pastoreo mixto y/o alterno entre diferentes especies de rumiantes o distintas razas dentro de una misma especie (Nari 2003).

#### El pastoreo alterno está cimentado en tres hechos biológicos:

- **Especificidad parásito-hospedador:** el desarrollo de NGI es diferente en bovinos y ovinos. Las larvas infectivas de parásitos ovinos pueden ser destruidas cuando son ingeridas por bovinos y viceversa (Rocha *et al.* 2008).
- **Interrupción del ciclo biológico del parásito:** El ciclo biológico de los NGI se ve afectado por el tiempo que las larvas L<sub>3</sub> permanezcan fuera del huésped susceptible (Guzmán *et al.* 2010).

- **La respuesta inmune contra NGI:** los bovinos adultos pueden bloquear el desarrollo de un gran porcentaje de larvas ovinas ingeridas, manteniendo bajas cargas parasitarias (Guzmán *et al.* 2010).

A pesar que cada especie de rumiante tiene su población específica de nemátodos gastrointestinales, existen diferentes niveles de transmisión cruzada:

- **Transmisión muy baja sin reproducción:** Comprende los géneros *Ostertagia*, *Oesophagostomun*, *Nematodirus* y *Bunostomun* (Fiel *et al.* 2005).
- **Transmisión reducida:** Se presenta con un corto periodo de prepatencia y con riesgo de supervivencia para la especie parasitaria, sólo si el huésped heterólogo pastorea consecutivamente. En este caso pueden ubicarse los géneros *Cooperia* y *T. colubriformis* (Fiel *et al.* 2005).
- **Transmisión alta:** Se presenta con diferencias menores en infectividad que podrían desaparecer en pocas generaciones de selección. Los géneros involucrados son *H. contortus*, *H. placei* y *T. axei* (Fiel *et al.* 2005).

La contaminación cruzada entre especies reduce la cantidad de larvas en las pasturas y con ello la infestación, disminuyendo la liberación de huevos y por ende la contaminación de las praderas (Romero 2002). Sin embargo, bovinos de 4 a 6 meses de edad que pastorean en praderas contaminadas con heces de ovinos suelen desarrollar poblaciones de *O. venulosum* o *H. contortus* que pueden resultar patógenas (Guzmán *et al.* 2010). Mientras que, ovinos alojados en praderas contaminadas por heces de bovinos pueden contraer cantidades importantes de *O. ostertagia*, *T. axei* y algunas especies de *Cooperia* (Romero 2005). Fernandes *et al.* (2010), encontraron en la necropsia de ovinos y bovinos de más de dos años mantenidos en pastoreo mixto e individual la presencia de *H. contortus* y *T. axei*. A pesar que es posible la infestación cruzada entre *H. contortus* y *H. placei* o *T. colubriformis* y *T. axei* en las especies ovina-bovina, se conoce poco sobre su acción patogénica en el otro hospedador, así como el papel de los hospedadores heterólogos como reservorios en la infestación cruzada

cuando alguna de estas especies adquiere resistencia a las drogas antihelmínticas (Fiel *et al.* 2005).

### 2.5.8. Rotación de potreros

La rotación de praderas es una acción dirigida a permitir el crecimiento óptimo del forraje y, por otro lado a disminuir la carga parasitaria en las praderas (Castells 2004).

Los sistemas de pastoreo rotativo favorecen el control parasitario por dos mecanismos: 1) el tiempo de permanencia y 2) el tiempo de descanso. Por un lado, los tiempos de permanencia cortos, menores a 7 días, determinan que los animales no tengan tiempo suficiente para reinfestarse, ya que las larvas están disponibles cuando los animales abandonaron el potrero (Guzmán *et al.* 2010). Se ha propuesto que en clima cálido y húmedo las praderas se utilicen por tres días con un descanso de 30 días. En este tipo de sistema, los ovinos pastorean durante tres días el potrero número uno, lo contaminan con huevos de NGI presentes en las heces y antes de que los huevos se transformen en larvas infectantes, 7 días, se mueven al potrero número dos. El proceso se continúa hasta llegar al potrero 10. De tal forma que al regresar los animales al potrero uno habrán pasado 30 días (Torres-Acosta *et al.* 2010).

El principio se basa en que las larvas infectantes mueren aproximadamente en cuatro o cinco semanas en condiciones cálidas y húmedas. Esto se debe a que las larvas poseen una cubierta protectora que evita la desecación en la pradera, además la cutícula evita el consumo de alimento. Por lo tanto, al moverse para ser ingeridas por los ovinos desgastan sus reservas de alimento y mueren por inanición (Torres-Acosta *et al.* 2010). Se recomiendan periodos de descanso de 28 días para ovinos y 77 días para bovinos (Castells 2004). Lo anterior sugiere que al realizar un sistema de pastoreo rotacional adecuado, los animales estarán expuestos en menor medida a los NGI y además consumirán una mejor calidad de forraje.

La rotación estratégica de praderas y el uso de especies alternativas en pastoreo puede permitir la reducción en la carga de larvas entre temporadas, pero no evita que estas puedan

recuperarse rápidamente según el clima y potencial reproductivo, tal es el caso de *Haemonchus* y su gran potencial biótico que puede elevar la contaminación durante el otoño, aun en pasturas inicialmente seguras. El pastoreo con bovinos mejora las oportunidades, pero requiere de monitoreo para su aprovechamiento óptimo (Romero 2005).

### **2.5.9. Plantas ricas en metabolitos secundarios**

Las plantas medicinales son consideradas como una fuente potencial de nuevas drogas quimioterapéuticas, debido a su contenido de fitoquímicos y a su poco o nulo efecto tóxico (Beg 2000).

Las plantas sintetizan una serie de compuestos denominados metabolitos secundarios (MS), estos carecen o tienen muy poco valor nutricional, además no poseen una actividad reconocida en el metabolismo primario de las plantas (Iason 2005). Sin embargo, pueden tener otras funciones relacionadas con la protección de la plantas, tal como: la protección contra patógenos y herbívoros, en la competencia entre plantas, atrayente de organismos benéficos, también pueden estar involucradas en mecanismos de defensas y respuesta a factores de estrés (Greathead 2003).

De acuerdo a su criterio bio sintético, los productos naturales podrían dividirse en tres grandes grupos de compuestos: nitrogenados (alcaloides, glicósidos cianogénicos, glucosinolatos, aminoácidos tóxicos, lectinas e inhibidores de las proteasas) derivados principalmente de aminoácidos a partir del Acetil-CoA; fenólicos (taninos, fitoestrógenos y cumarinas) derivados de dos rutas: la del ácido shikímico y la de los policétidos o vía del malonato, y terpenicos (lactonas sesquiterpénicas, digitálicos, saponinas, hidrocarburos, poliacetilénicos y oxalatos) derivados de la ruta del mevalonato (Cortez-Gallardo 2004, Varón 2015).

Los reportes científicos y etnobotánicos de plantas con propiedades antiparasitarias han llevado a evaluar una gran cantidad de extractos vegetales como alternativa en el control parasitario en rumiantes (García 2010).

Los EV son mezclas complejas de MS aislados de las plantas por diversos métodos como la destilación por arrastre de vapor, expresión, soxhlet o maceración, entre otros. Los principales componentes químicos de estas mezclas son mono y sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos funcionalizados con alcoholes, éter, aldehídos y cetonas los cuales son responsables de las fragancias y de las propiedades biológicas de las plantas aromáticas y medicinales. Los extractos vegetales cubren un amplio espectro de efectos farmacológicos mostrando diversas propiedades como antiinflamatorios, antioxidantes, anticancerosos, entre otros. Algunas otras actividades biológicas se reportan como biocidas en contra de una amplia gama de microorganismos como bacterias, hongos, virus y parásitos (Kalemba y Kunicka 2003).

Aunque se han identificado algunas sustancias simples como fenoles, derivados de los fenoles (quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas), terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, pectinas y polipéptidos, los extractos totales provenientes de plantas permanecen en uso (Thuille 2003).

Mientras que se conoce la composición química de algunos extractos vegetales y son usados en base a sus propiedades documentadas *in vivo* e *in vitro*, hay pocos datos para gran número de ellos. De la misma manera, se desconoce el mecanismo de acción por el cual la mayoría de los extractos ejercen un efecto AH. Sin embargo, se han definido algunas posibles acciones en cuanto a taninos y lactonas sesquiterpénicas (LST).

#### **2.5.9.1. *Allium sativum* y *Allium cepa***

En México anualmente se cosechan 42 076 toneladas de *A. sativum* (SIAP 2006) y 1 238, 602 toneladas de *A. cepa* (Lim 2015). Se estima que el 30% del total de las cosechas de estas hortalizas se pierde por nula aceptación en el mercado, derivado de su baja calidad física (Montes *et al.* 2003). Por lo cual, se requiere encontrar mercados competitivos con valor agregado, tal como la industria farmacéutica (Gómez 2008).

---

Tanto *A. sativum* como *A. cepa* son plantas herbáceas, perennes y bulbosas pertenecientes a la familia de las Amaryllidaceas, la cuál cuenta con más de 500 miembros (**Cuadro 1**) cada uno con diferencias en apariencia, color y sabor pero cercanos en el contenido fitoquímico, bioquímico y nutraceútico (Benkeblia 2004). Desde la antigüedad estas hortalizas han sido cultivadas, son un condimento natural por excelencia y forman parte de los hábitos alimenticios y terapéuticos de diversas culturas (Hedges y Lister 2007).

Una fracción de 100 g de *A. sativum* posee entre 60-70 g de agua y 24.39 g de carbohidratos, mientras que *A. cepa* contiene entre 80-90% de agua y de 5.30-7.50 g de carbohidratos. Los niveles de compuestos azufrados son más altos en *A. sativum* (11-35 mg/100 g de peso fresco) (Benkeblia 2004).

**Cuadro 2.** Descripción técnica de *A. sativum* y *A cepa*

| Planta            | Ajo   | Cebolla  |
|-------------------|---|--|
| Familia           | Amaryllidaceae  | Amaryllidaceae   |
| Sub familia       | Allioideae  | Allioideae   |
| Género            | <i>Allium</i>   | <i>Allium</i>  |
| Especie           | <i>Allium sativum</i> L.  | <i>Allium cepa</i> L.  |
| Planta            | Bulbosa, vivaz y rústica  | Bulbosa, vivaz y rústica   |
| Sistema radicular | Raíz compuesta de 20 o más bulbos reunidos en su base por una película delgada. De la parte superior del bulbo nacen las partes fibrosas, que se introducen en la tierra para alimentar y anclar la planta. | Raíces formadas por numerosas raicillas fasciculadas, de color blanquecino, poco profundas, que salen de un tallo a modo de disco, o disco caulinar. |
| Tallos            | Fuertes, altura de 50 cm.   | Fuertes, altura de 80 a 150 cm, hueco con inflamamiento ventrudo en su mitad inferior.   |
| Hojas             | Lineares, dispuestas en forma de roseta, alcanzando hasta 60 cm de largo.   | Envainadoras, alargadas, fistulosas y puntiagudas en su parte libre.   |
| Flores            | Blancas o rosadas, conformando una umbela en el extremo del tallo que se cierra antes de la floración.  | Pequeñas blanco-verdosas, o rojo-púrpura, agrupadas en forma de sombrilla.   |

**Fuente:** adaptado de Alonso 2004, Vallejo y Estrada 2004, Fonnegra y Jiménez 2007.

#### 2.5.9.1.1. Composición nutricional

Tanto *A. sativum* como *A. cepa* son una fuente rica de micronutrientes y fitoquímicos reconocidos como elementos importantes de la dieta mediterránea y extendidos a nivel mundial (Lanzotti 2006).

**Cuadro 3.** Composición nutricional de *A. sativum*.

| Aporte por cada 100 g   |           |                        |           |
|-------------------------|-----------|------------------------|-----------|
| Energía (Kcal)          | 149       |                        |           |
| Agua (%)                | 70        |                        |           |
| Hidratos de carbono (g) | 23-28     |                        |           |
| Proteína (g)            | 5-6.7     |                        |           |
| Lípidos (g)             | 0.3-0.1   |                        |           |
| Fibra (g)               | 1.2       |                        |           |
| Elementos minerales     | Por 100 g | Vitaminas              | Por 100 g |
| K                       | 400 mg    | Ac. Ascórbico (Vit. C) | 11-18 mg  |
| Na                      | 30 mg     | Tiamina (Vit. B1)      | 0.20 mg   |
| P                       | 140 mg    | Riboflavina (Vit. B2)  | 0.06 mg   |
| Ca                      | 14 mg     | Niacina (Vit. B3)      | 0.04 mg   |
| Fe                      | 1.5 mg    |                        |           |

**Fuente:** adaptado de Lawson 2003.

**Cuadro 4.** Composición nutricional de *A. cepa*.

| Aporte por cada 100 g   |           |                        |           |
|-------------------------|-----------|------------------------|-----------|
| Energía (Kcal)          | 38        |                        |           |
| Agua (%)                | 87.86     |                        |           |
| Hidratos de carbono (g) | 10.15     |                        |           |
| Proteína (g)            | 1.36      |                        |           |
| Lípidos (g)             | 0.19      |                        |           |
| Fibra (g)               | 1.2       |                        |           |
| Elementos minerales     | Por 100 g | Vitaminas              | Por 100 g |
| K                       | 166 mg    | Ac. Ascórbico (Vit. C) | 5.2 mg    |
| Na                      | 3 mg      | Tiamina (Vit. B1)      | 0.04 mg   |
| P                       | 35 mg     | Riboflavina (Vit. B2)  | 0.06 mg   |
| Ca                      | 22 mg     | Niacina (Vit. B3)      | 0.72 mg   |
| Fe                      | 0.24 mg   | Piridoxina (Vit. B6)   | 0.13 mg   |

**Fuente:** adaptado de Cabeza *et al.* 2006, Gil 2010.

### 2.5.9.1.2. Uso etnobotánico

Dentro de la concepción popular *A. sativum* y *A. cepa* poseen propiedades mágicas que ayudan a curar enfermedades. Su principal uso medicinal se indica para combatir lombrices, amibas y otros parásitos gastrointestinales. Se utiliza el bulbo crudo o en infusión por vía oral en ayunas o mezclado con semillas de papaya, epazote o calabaza. Se emplea en trastornos digestivos como: vómito, dolor abdominal, flatulencias, estreñimiento, problemas respiratorios como: bronquitis, gripe, catarro, asma, sinusitis y garganta irritada (Osuna *et al.* 2005).

### 2.5.9.1.3. Composición fitoquímica

#### 2.5.9.1.3.1. *Allium sativum* L.

Del bulbo de *A. sativum* se han aislado diversos MS que incluyen flavonoides, prostaglandinas, fitosteroles y derivados azufrados como la aliína (2-propenil (s)-alil-L-(+)-cisteína sulfóxido) y alicina. Se ha establecido que la aliína es degradada por la alinasa (S-alquil-L-cisteína liasa) dando origen a la alicina. Los productos de la degradación de alicina que se forman por la vía del ácido sulfénico son: 6-Z-ajoeno, 6-E-ajoeno, E-Z-metilajoeno, E-Z-dimetilajoeno, isómeros de E-Z-ajoeno son 4,5,9-tritriadodecano-1,6,11-trieno-9-(s)-óxido y de cicloaductos de propenotiol junto con vinilditinos (compuestos cíclicos) 2-vinilo-(4H)-13, ditino; 3 vinilo-(4H)-1, 2-ditino). La alicina al igual que la aliína son inestable a temperatura ambiente y se descomponen principalmente en derivados de sulfuro, tioésteres y mercaptanos (**FIG. 3**) (Osuna *et al.* 2005, Maza *et al.* 2014).

#### 2.5.9.1.3.2. *Allium cepa* L.

Del aceite esencial de *A. cepa* se han descrito compuestos azufrados, destacando principalmente la propina, Isoalina y alicina (**FIG. 3**) (Ye *et al.* 2003, Osuna *et al.* 2005, Takahashi y Shibamoto 2008).

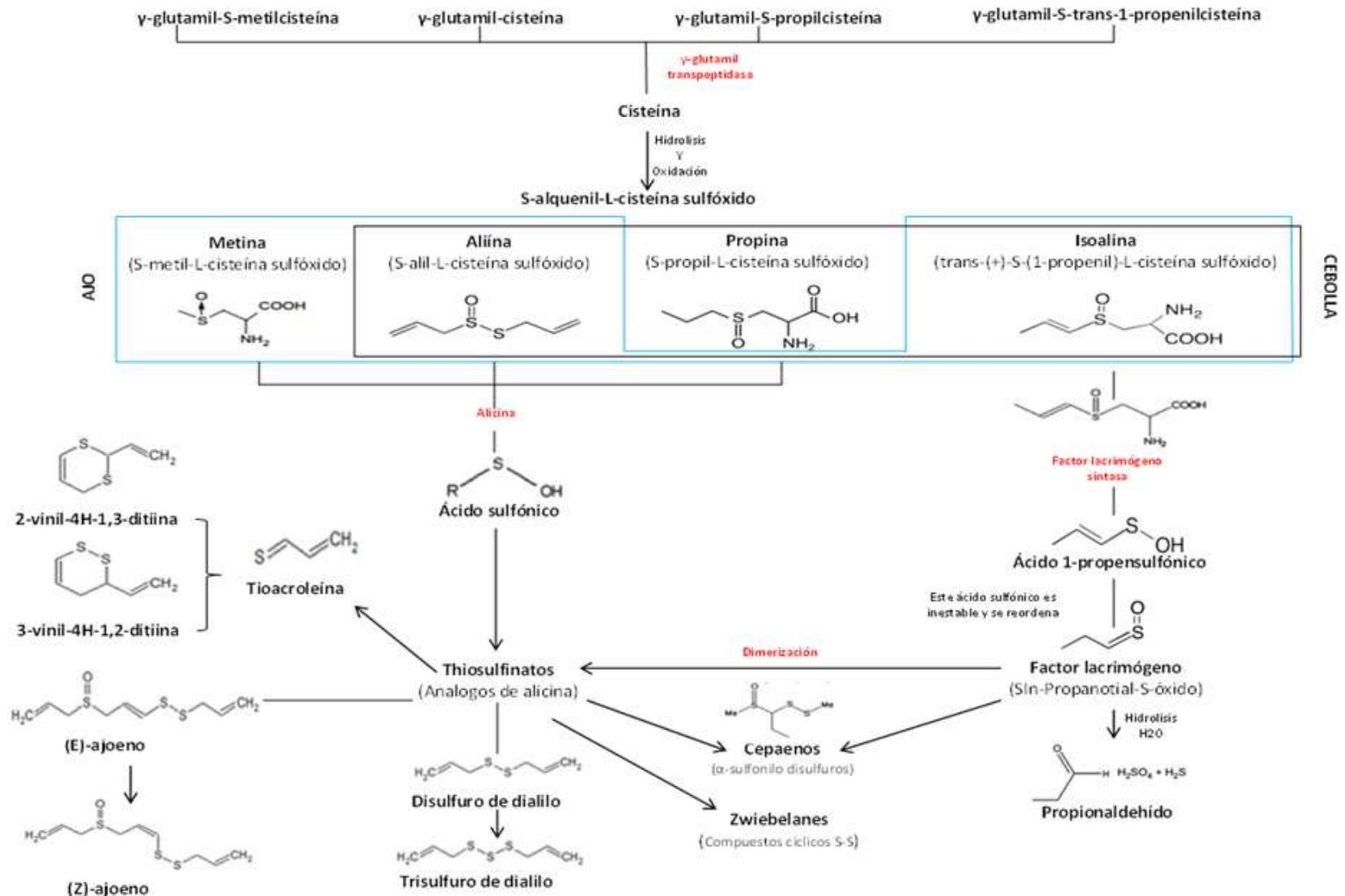


Figura 3. Formación de compuestos azufrados de *A. sativum* y *A. cepa*.

#### 2.5.9.1.4. Información farmacológica

Tanto el aceite como el extracto acuoso y etanólico de *A. sativum* y *A. cepa* destacan por sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas, antiprotozoarias, antivirales y con datos indefinidos su actividad antiparasitaria (Shenoy *et al.* 2009, Mammani y Mercado 2014) entre otras propiedades se encuentra su actividad antineoplásica, antiplaquetaria, hipolipemiente, hipotensiva e hipoglucemiante (González 2014).

En el **cuadro 5** se mencionan los principales compuestos activos que han sido estudiados en diferentes modelos biológicos.

**Cuadro 5.** Información farmacológica de *A. sativum* y *A. cepa*.

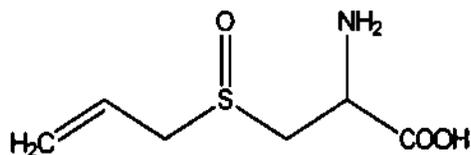
| Solubilidad | Compuestos activos   | Actividad biológica  |
|-------------|--|--|
| Agua        | S-alil-cisteína<br>S-alil-mercapto-cisteína<br>S-metil-cisteína<br>$\gamma$ -glutamil-cisteína   | hipolipemiente, antioxidante,<br>antineoplásica.<br>Desintoxicación hepática frente a<br>sustancias químicas.  |
| Aceite      | Aliína<br>Alicina<br>Ditiínas<br>Vinil ditiínas<br>Ajoeno<br>Sulfuro de dialilo ( <i>A. sativum</i> )<br>Disulfuro de dialilo ( <i>A. sativum</i> )<br>Sulfuro de propilo ( <i>A. cepa</i> )<br>Disulfuro de diapropilo ( <i>A. cepa</i> )<br>Trisulfuro de alilo<br>Trisulfuro dialílico<br>Trisulfuro alil-metil | Hipotensor, hipoglucemiante.<br><br>Antinflamatorio, vasodilatador, hipotensor,<br>antimicrobiana.<br>Antimicrobiana, antifúngico y antiviral.<br><br>Antineoplásica.<br><br>Antimicrobiana, hipotensora e<br>hipoglucemiante. |

**Fuente:** adaptado de Alonso 2004, Arranz *et al.* 2007, García *et al.* 2008)

### 2.5.9.1.5. Enzima y compuestos activos azufrados

#### 2.5.9.1.5.1. Aliína

La aliína (S-alil-L-cisteína sulfóxido) es el compuesto sulfurado más abundante en el *A. sativum* fresco, es inodoro y estable (**FIG. 4**). El *A. sativum* contiene 7-14 mg/g de aliína en peso fresco y de 18-42 mg/g en peso seco.

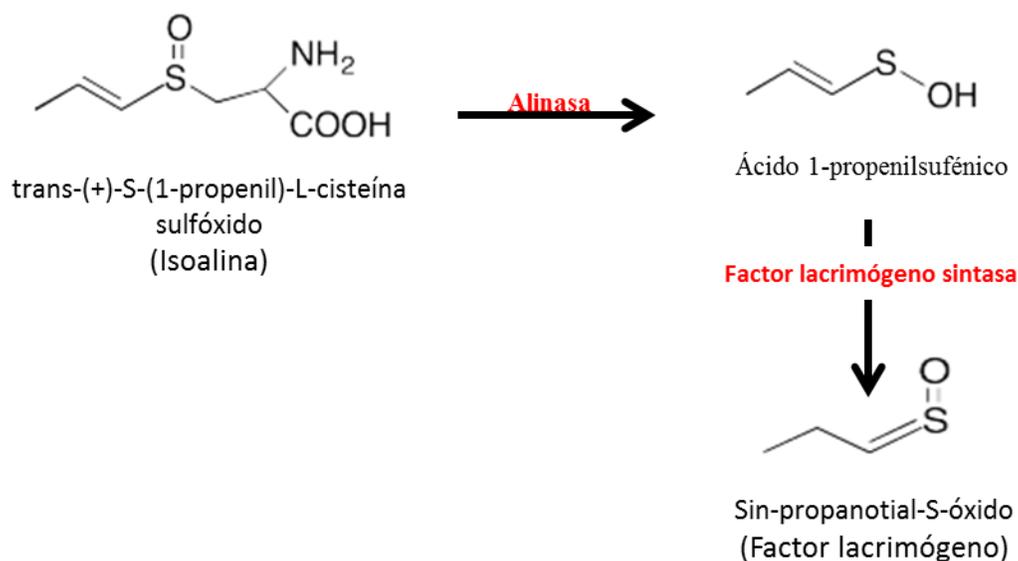


**Figura 4.** Estructura química de la aliína

La aliína se cristaliza en soluciones de etanol o acetona, y es estable en soluciones acuosas y a temperatura elevadas (Stoll *et al.* 2006). Cuando las células se rompen la aliína reacciona y aproximadamente en diez segundos se convierte en alicina y tiosulfatos que emiten el aroma característico del *A. sativum* (Lawson y Wang 2005).

#### 2.5.9.1.5.2. Isoalina

La propina (S-propil-L-cisteína sulfóxido) es el compuesto sulfurado más abundante en la *A. cepa*. A partir de isoalina (trans-S-(1-propenil)-L-cisteína sulfóxido) deriva uno de los compuesto más estudiados de la *A. cepa*, el factor lacrimógeno (sulfóxido de tiopropanal) (**FIG. 5**) (Lawson y Wang 2005).



**Figura 5.** Reacción de formación del factor lacrimógeno.

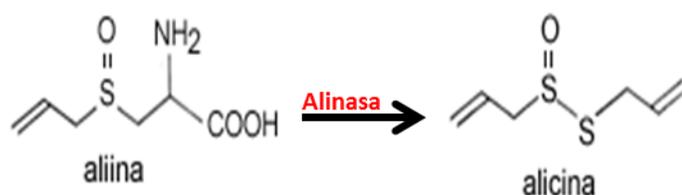
### 2.5.9.1.5.3. Enzima alinasa

La alinasa comprende entre el 10 y 12% del material proteico soluble en los dientes de *A. sativum* (Kuettner *et al.* 2002). Debido a la grande abundancia de alinasa (10 mg/g fresco) la tasa de formación de los tiosulfatos es extremadamente rápida, completándose en menos de 10 segundos para aliína y 60 segundos para metina (Lawson 1998). Esta enzima se activa a pH de 4.5-9, pero se inactiva rápidamente y de forma irreversible a pH de 1.5-3. La alinasa actúa de dos formas diferentes en el *A. sativum*, una especifica para aliína e isoalina con un pH óptimo de 4.5, mientras la otra es específica para la metina con un pH óptimo de 6.5 (Lawson 1993).

Estudios determinan que la actividad enzimática de la alinasa decrece rápidamente a 42 °C, indicando que la temperatura óptima de activación se produce entre 35-37 °C y la inactivación se da entre 42-60 °C. A temperaturas mayores la actividad enzimática se ve afectada (Krest y Keusgen 1999).

#### 2.5.9.1.5.4. Alicina

*A. sativum* contiene tres veces más compuestos azufrados que *A. cepa* (11-35 mg/100 g de peso fresco) (Lawson, 1998). La alicina (S-2-propenil éster del ácido 2-propenol-1-sulfino) (**FIG. 6**) representa el 70% de los compuestos sulfurados presentes en *A. sativum* fresco, siendo el tiosulfinato de mayor abundancia en la planta (Miron *et al.* 2002, Diaz y Jiménez 2008). Este es un compuesto que se forma a través de la interacción de su precursor (aliína) con la enzima alinasa (Benkeblia 2004).



**Figura 6.** Reacción de formación de alicina.

#### 2.5.9.1.6. Reacciones adversas

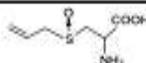
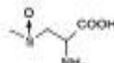
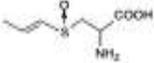
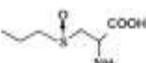
Pruebas *in vitro* e *in vivo* en ratas han mostrado un incremento en la hemólisis debido a la aplicación y consumo rutinario (Salami *et al.* 2013). De igual forma, Gatsing *et al.* (2006), mencionan que el extracto de *A. sativum* en ratas parece tener un efecto depresor del sistema nervioso central y puede inducir una disminución en los niveles de prostaglandinas en el plasma. A dosis altas puede inducir lesiones en el hígado, bazo y pulmones generando pérdida de apetito y anemia.

Mikail (2010), reportó una toxicidad aguda gradual del extracto acuoso de *A. sativum* tras la administración subcutánea en conejos. La DL<sub>50</sub> resultó ser de 3.03 g/kg, la dosis máxima tolerada fue de 2.20 g/kg, la mortalidad se produjo en conejos que recibieron una concentración de 3.2-4.2 g/kg. Otros autores han reportado una DL<sub>50</sub> superior a los 32 g/kg (Gatsing *et al.* 2006).

### 2.5.9.1.7. Compuestos azufrados

Las plantas del género *Allium* se caracterizan por la concentración de compuestos azufrados (tiosulfatos). Los bulbos contienen 85% de sulfóxidos de cisteína, mientras que las hojas poseen el 12% y las raíces el 2% (Gómez 2008). Estas sustancias son propias de cada especie y se crean a partir del glutatión ( $\gamma$ -glutamil-cisteína), que posteriormente mediante una reacción de oxidación e hidrólisis da origen a S-alquencil-L-cisteína sulfóxido (ACSOs) precursor de los compuestos característicos de los sabores y aromas en *A. sativum* y *A. cepa*. Los precursores característicos del género *Allium* son la aliína (S-alil-L-cisteína sulfóxido, 7-14 mg/g), metina (S-metil-L-cisteína sulfóxido, 0.5-2 mg/g), isoalína (trans-S-(1-propenil)-L-cisteína sulfóxido) y propina (S-propil-L-cisteína sulfóxido) (**Cuadro 6**) (Griffiths *et al.* 2002, Gómez 2008, Florencia 2011).

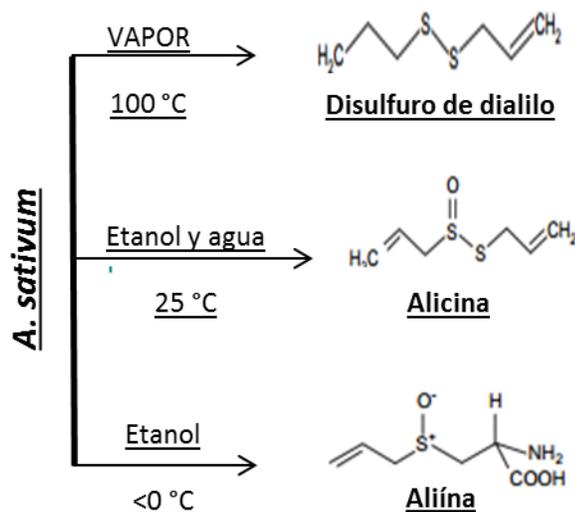
**Cuadro 6.** Precursores de aromas en el género *Allium*.

| Precursor                                 | Nombre  | Fórmula   | Planta                                 |
|---|---------|---|--|
| S-alil-L-cisteína sulfóxido               | Aliína  |   | Ajo                                    |
| S-metil-L-cisteína sulfóxido              | Metina  |  | <i>Allium</i> ,<br><i>Brassicaceae</i> |
| trans-S-(1-propenil)-L-cisteína sulfóxido | Isoalín |  | Cebolla                                |
| S-propil-L-cisteína sulfóxido             | Propina |  | Cebolla                                |

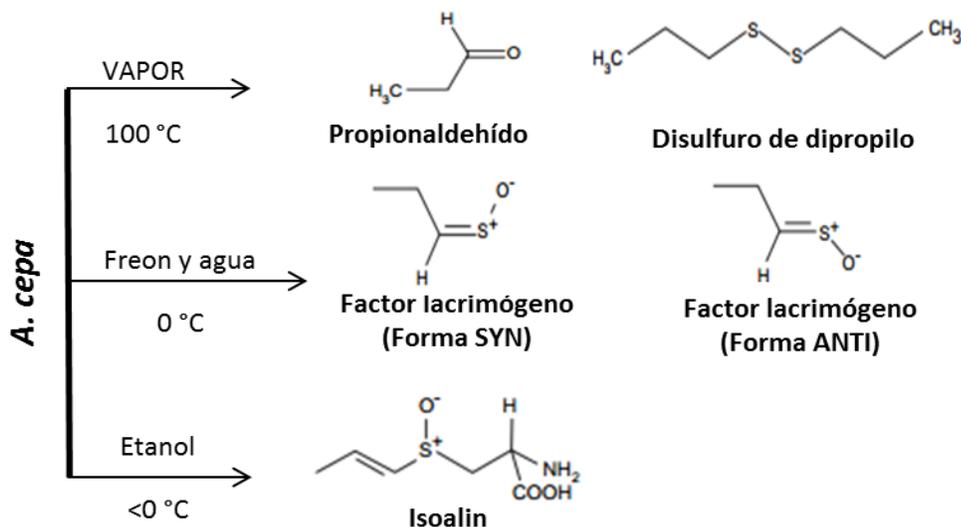
**Fuente:** adaptado de Jones *et al.* 2004.

### 2.5.9.1.7.1. Estabilidad

Los tiosulfatos que se forman cuando se machaca *A. sativum* y *A. cepa* son muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones dependiendo de la temperatura, pH y condiciones de extracción.



**Figura 7.** Principales compuestos presentes en diferentes preparados del *A. sativum* basado en el método de extracción (Adaptado de Corzo *et al.* 2007).



**Figura 8.** Principales compuestos presentes en diferentes preparados de la *A. cepa*, basado en el método de extracción (Adaptado de Corzo *et al.* 2007).

Lawson (2005), encontró que los alil-S-tiosulfatos (alicina, alil-SS(O)-metil y alil-SS(O)-trans-1-propenil) son los menos estables de *A. sativum* por que tienden a formar tioacroleina y alil mercaptano como intermediarios para futuras reacciones. La dilución con agua o solventes orgánicos pueden mejorar su estabilidad (Lawson 1998).

En cambio los alil-S(O)-tiosulfatos (metil-SS(O)-alil y trans-1 propenil-SS(O)-AIL) no pueden formar tioacroleina, por lo cual son muy estables. Mientras que, la aliína y la alinasa son estables en *A. sativum* seco (Bhagyalaksmi *et al.* 2005).

Por su parte, la vida promedio de la alicina es de 2-4 días, aumentando a 22 días después de la dilución con agua, 10 días a temperatura ambiente en 1 mM de ácido cítrico (pH3), 4 días en agua, 48 h en metanol o cloroformo, 30 h en diclorometano, 24 h en etanol o acetronitrilo, 3 horas en éter y 2 horas en hexano (Lawson 1993, Lawson 1998). En éter, el alil-SS(O)-metil tiene una vida promedio igual a la alicina (3 horas), mientras que no se muestra una pérdida significativa del metil-SS(O)-alil después de 6 días (Lawson 1998).

#### **2.5.9.1.7.2. Transformación**

Los estudios con *A. sativum* fresco, deshidratado y en aceite indican que los trisulfuros se forman primero, seguidos por los disulfuros que son tan estables como los tetrasulfuros. Al mezclarse la alicina o alil metanotiosulfato sin solventes o con solventes mediamente polares, se produce principalmente 3-vinil-[4H]-1,2-ditiína (51%), 2-vinil-[4H]-1,3-ditiína (19%) y en menor proporción sulfuros (18%) y ajoeno (12%) (Córdova 2010).

Los tiosulfatos en *A. sativum* al mezclarse con agua se transforman principalmente en dialil tiosulfido, dialil disulfido, y alil metil trisulfido. La velocidad de formación de los sulfidos incrementa considerablemente con el calentamiento, así como durante la destilación con vapor (Córdova 2010).

Al utilizarse alicina pura se obtiene ajoeno (55%), vinil-diitinas (34%) y algunos sulfidos (0-11%) (Gómez 2008). Por el contrario, al mezclarse la alicina o alil-metano-tiosulfato con

solventes de baja polaridad (cloroformo, éter, hexano, aceites vegetales), se producen principalmente 1, 3 vinil-ditiina (51%), 1,2-vinil-diitina (19%) y en menor cantidad ajoeno (12%) y otros sulfidos (18%) (Lawson 1998). Por el contrario, al mezclarse con solventes de polaridad intermedia como etanol se produce principalmente dialil trisulfido (73%), algunos dialil disulfidos (8%) y ajoeno (8%); Por su parte, con metanol se produce principalmente dialil trisulfido (83%) y dialil disulfido (10%), pero solo pequeñas cantidades de ajoeno (1%), vinil-diitina (1%) y otros sulfidos (5%) (Lawson 1993).

A temperaturas altas (aproximadamente 100 °C) se forman compuestos de polisulfuros siguiendo la ruta de S-alilmercaptocisteína, alilmercaptano, alilperitol y posiblemente alil hidrotrisulfido (Munchberg *et al.* 2007).

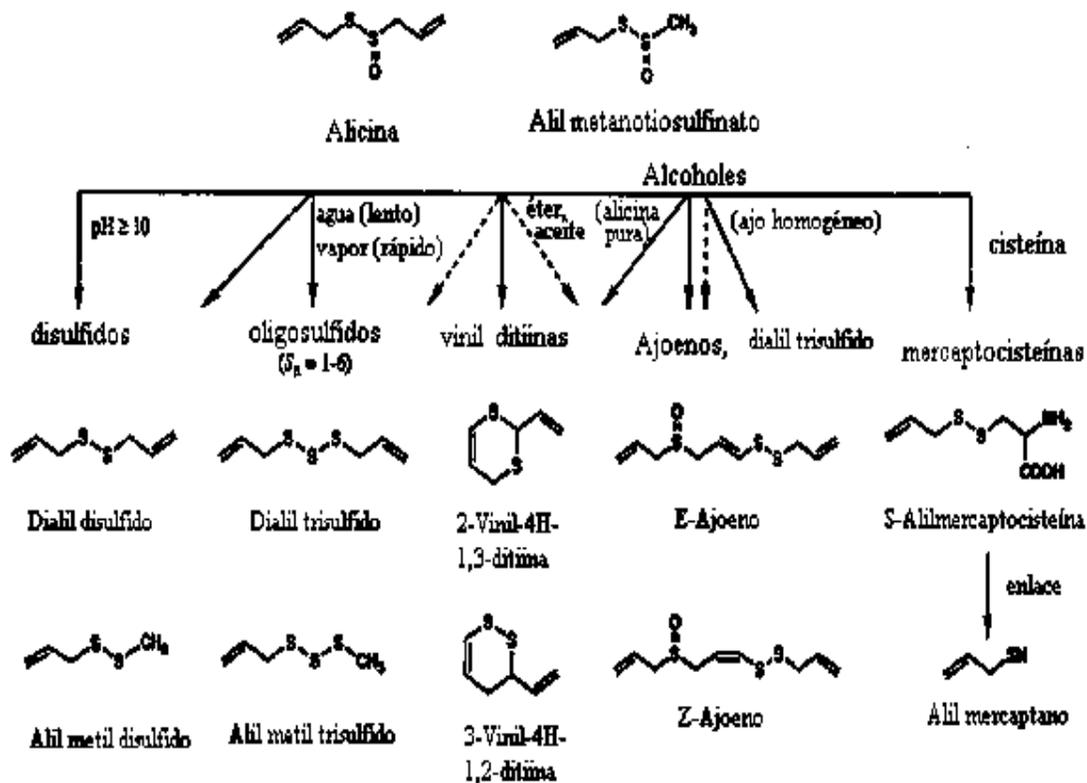


Figura 9. Principales transformaciones de los tiosulfatos de *Allium sativum* (Gómez 2008).

### 2.5.9.1.8. Mecanismo de acción antihelmíntico putativo

Algunos parásitos que se alimentan de sangre emplean enzimas proteasas (endo o exoproteasas). Algunas de estas enzimas se encuentran en los productos de ES de los parásitos y juegan un papel esencial en los procesos celulares, digestivos, alimenticios, inflamatorios, cicatrizantes y sobre todo en la evasión de la respuesta inmune (Sajid y McKerrow 2002) (**Cuadro 7**) (Williamson *et al.* 2003).

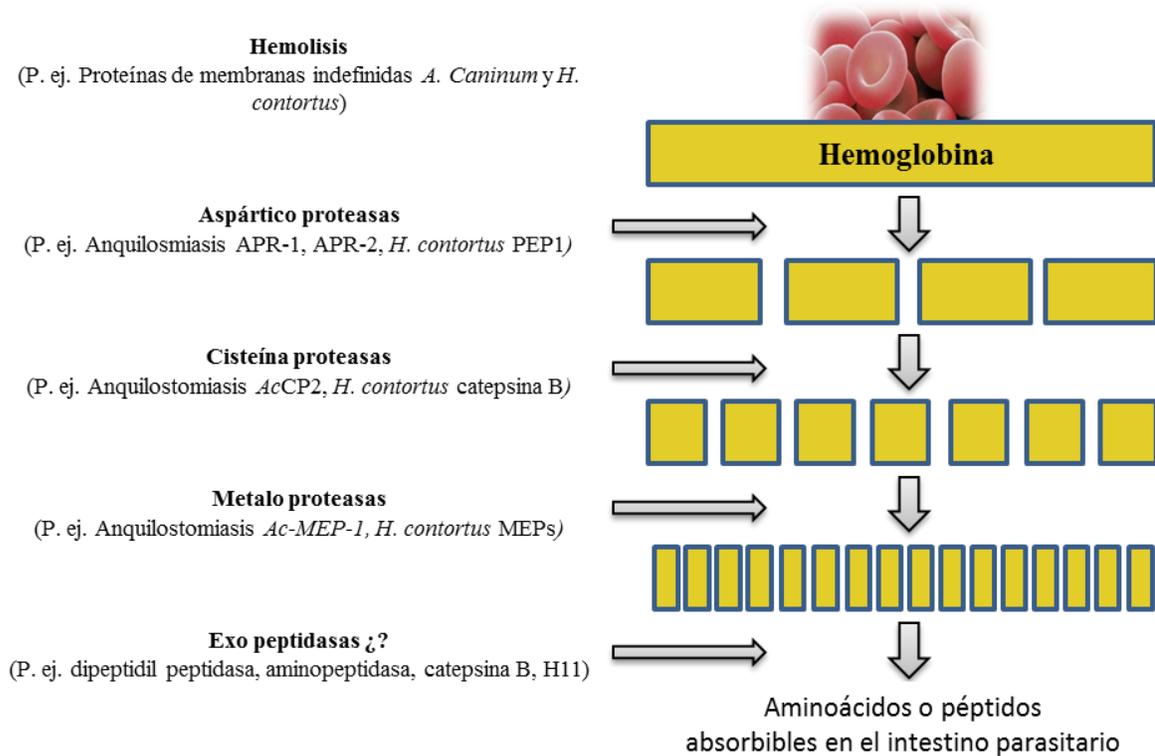
Es posible que la migración larvaria sea facilitada por proteasas. La actividad fibrinolítica y anticoagulante mostrada por larvas de tercer y cuarto estadio, así como larvas adultas podrían indicar un papel para facilitar la migración por el sistema sanguíneo o a través de los tejidos (Cardona *et al.* 2008).

**Cuadro 7.** Proteasas de *H. contortus* con actividad conocida.

| Enzima                 | Clase                | Acción conocida/supuesta función        | Localización                           |
|------------------------|----------------------|---|--|
| AC-1, AC-5             | Cisteína cathepsin B | Digestión de la sangre                  | Intestino                              |
| MEP1, MPE4             | Metallo-nepilisina   | Se alimentan de sangre                  | Microvellosidades                      |
| HMCP-1, HMCP-4, HMCP-6 | Cisteína cathepsin B | Se alimentan de sangre                  | Microvellosidades                      |
| Pep1                   | Aspártico nemepsin   | digestión de hemoglobina                | Microvellosidades (adultos)            |
| H11                    | Amino-peptidasa      | Enzima nativa, afinidad por hemoglobina | Microvellosidades (estadios larvarios) |

**Fuente:** adaptado de Williamsom *et al.* 2003.

Las enzimas proteasas se dividen en: aspártico-proteasas, tiol-proteasas, metalo-proteasas, cisteína-proteasas (**FIG. 10**) (Anthony *et al.* 2005).



**Figura 10.** Cascada proteolítica putativo responsable de la degradación de hemoglobina en el intestino de nemátodos hematófagos (adaptado de Williamson *et al.* 2003).

**Ante ello, se han sugerido posibles mecanismos de acción para los compuestos azufrados, la actividad varía de acuerdo a la especie parasitaria:**

- 1) Los precursores o los tiosulfatos reaccionan con grupos sulfhidrilo o derivados de la cisteína alterando las membranas parasitarias (Williams y Lamprecht 2008).
- 2) Inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina reduciendo la formación o reestructuración de membranas dañadas (Williams y Lamprecht 2008).
- 3) Inhibición de las proteasas de cisteína alterando la acción fibrinolítica y hemolítica del parásito interfiriendo con su alimentación (Said y Mckerrow 2002, Williamson *et al.* 2003).

4) Inhabilitación del alcohol deshidrogenasa enzima implicada en diversos procesos metabólicos fundamentales (Williamson *et al.* 1991).

5) Inhibición de la tiorredoxina glutatión reductasa importante en los helmintos, la cual desempeña un papel como primera línea de defensa contra el daño oxidativo originado no sólo por oxidantes endógenos, sino también por las células del sistema inmunológico del huésped. Tanto macrófagos como neutrófilos pueden liberar en la superficie del parásito enormes cantidades de anión super óxido y óxido nítrico que dan origen a peróxido de hidrogeno, además de potentes oxidantes tales como el radical hidroxilo y peroxinitrito (Agorio *et al.* 2003).

6) Actividad nutracéutica, aumentando la actividad inmunomoduladora, estimulando la proliferación de linfocitos y la fagocitosis de macrófagos, así como la estimulación de la liberación del interferón gamma. Diferentes extractos de *A. sativum* han demostrado estimular la actividad fagocitaria de los macrófagos, a la vez que incrementan la actividad de células natural killer, IL-2 (interleukina-2), TNF (factor de necrosis tumoral) y gamma-interferón, factores que pueden incurrir en el establecimiento y viabilidad del parásito dentro del huésped (Gurley *et al.* 2005).

### 2.5.9.2. *Artemisia ludoviciana*

El estafiate (*A. ludoviciana*) pertenece a la familia Asteraceae. Esta cuenta con más de 30 000 especies. Es una planta perene que crece en terrenos o parcelas de zonas rurales y se desarrolla en climas templados o secos llegando a medir hasta 1.5 m de alto, florece entre Septiembre y Noviembre (Villaseñor 1993, Panero y Funk 2002, Heike 2009).

Se distribuye en el norte y centro del país, sobre todo en el altiplano, Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa 1998). El estado de Michoacán ocupa

el tercer lugar en riqueza del género Asteraceae, teniendo a consideración 82 especies y 27 géneros (Cué-Bär 2006).

**Cuadro 8.** Descripción técnica de *Artemisia ludoviciana*.

|                          |   |
|--------------------------|---|
| <b>Familia</b>           | Asteraceae  |
| <b>Sub familia</b>       | Asteroidae  |
| <b>Género</b>            | <i>Artemisia</i>  |
| <b>Especie</b>           | <i>Artemisia ludoviciana</i> ssp. mexicana  |
| <b>Planta</b>            | Hierba perenne  |
| <b>Sistema radicular</b> | Principalmente un rizoma  |
| <b>Tallos</b>            | Varios tallos a partir de una base rizomatosa, estriado y anguloso, flocoso-tomentoso, de 3-5 mm de ancho en la base y 1-1.5 m de alto.   |
| <b>Hojas</b>             | Alternas, glabras, sésiles con pecíolo corto y ancho, lineares elípticas, a veces agrupados en las axilas de una hoja, de hasta 15 cm de largo, de 1-10 mm de ancho.  |
| <b>Flores</b>            | Cabezuelas péndulas; involucreo. campanulado, brácteas de 6 a 16 de 2-4 mm de largo; receptáculo hemisférico; flores periféricas de 5-12, sus corolas angostamente cilíndricas, de 1 a 1.5 mm de largo; flores del disco de 6 a 15, sus corolas tubulosas o con la garganta campanulada, de $\pm$ 2 mm de largo, teñidos de púrpura, pero luego pasando a color paja. |

**Fuente:** Heike 2009.

#### 2.5.9.2.1. Uso etnobotánico

Entre los múltiples usos medicinales de *A. ludoviciana* se encuentran el tratamiento de la diarrea, disentería, parásitos gastrointestinales, dolor abdominal, vómito y antiespasmódico. Para el tratamiento de parasitosis se aconseja mezclar con ajeno (*Artemisia absinthium*), epazote (*Teloxys ambrosioides*) y hierbabuena (*Mentha piperita*) (Anónimo 2009)

### 2.5.9.2.2. Composición fitoquímica

El aceite esencial proveniente de las hojas de *A. ludoviciana* se caracteriza por un alto contenido de monoterpenos y sesquiterpenos oxigenados con un resto 5-etil-tetrahidro-5-metil-2-furanilo. Entre los componentes principales encontramos: 1, 8 cineol (22%), alcanfor (15.9%) y devanona (11.5%) (Blust y Hopkins 1987), así como hexanal, (2*E*)-hexanal, trieno santolina, 2,5-diethenyl-2-metil-tetrahidro furano, triciclono,  $\alpha$ -tujona, mirceno canfeno, thuja-2, 4 (10)-dieno, sabineno, artemiseole,  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mesitileno,  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, limoneno, cis-arbusculone,  $\gamma$ -terpineno, filifoleno, isoforona, chrysanthemone, borneol, terpinen-4-ol, para-cymenl-8-ol,  $\alpha$ -terpineol, mirtenol, trans-carveol, ni-davanone, acetato bornilo, cistreo-devanafuran, davana ether, artedouglasia óxido A, artedouglasia óxido D, devanona B, óxido de artedouglasia B, ridentina B, rupicolina A y B, rupina (Jakupovic 1991, Lopes *et al.* 2008). Por su parte, Ruíz *et al.* (1993), aislaron los flavonoides eupatilina, jaceosidina, junto con sitosterol y las LST douglanina, lodovicina A, B y C, 1 $\alpha$ , 3 $\alpha$ -dihidroxiarbuscalina B, santamarina, arglanina, artemorina, chrisartenina B y armefolina (Lee y Geissman 1970, Ruíz *et al.* 1993). Mientras que, Anaya *et al.* (2014), lograron aislar la eupatilina, jaceosidina, salvinina y ácido 3,5-dicafeoilquínico como componentes principales de la infusión acuosa de hojas.

### 2.5.9.2.3. Información farmacológica

El aceite esencial es rico en compuestos fenólicos (terpenos y fenilpropanoides). Las LST se han descrito como los componentes activos de una gran variedad de plantas, estos compuestos se han utilizado como antivirales, antibacterianos, antifúngicos, antiinflamatorios, citotóxicos y antiparasitarios (Závala *et al.* 2002, Said Fernández *et al.* 2005, Monroy y Castillo 2007).

### 2.5.9.2.4. Reacciones adversas

Se indica que el extracto hidroalcohólico no es tóxico, pero la acción del jugo gástrico hace más lenta la digestión (Anónimo 2009). Por su parte, Anaya *et al.* (2014), no encontraron

signos aparentes de toxicidad en ratas sometidas a dosis máximas de 5 000 mg/kg del extracto etanólico y el aceite esencial de *A. ludoviciana*.

#### 2.5.9.2.5. Mecanismo de acción antihelmíntico putativo

Hay pocos estudios que apoyan las propiedades terapéuticas de *A. ludoviciana* contra PGI. No obstante, se han evaluado los extractos y aceites esenciales sobre *Trichomona vaginalis*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* con resultados variables (Said *et al.* 2005, Calzada *et al.* 2006, Calzada *et al.* 2007).

El mecanismo mediante el cuál el EC de *A. ludoviciana* ejerce un efecto antiparasitario no es del todo claro. Sin embargo, se considera que sus efectos se deben en parte a las LST. Estos compuestos se encuentran principalmente en la familia Asteraceae (Compositae) y constituyen uno de los mayores grupos genéticamente homogéneos, el cual comprende más de 6 000 estructuras aisladas (Schmidt 2006). Las LST actúan como un sistema de defensa en las plantas contra la depredación (Schmidt 2006). Se caracterizan por ser compuestos amargos e insaponificables, además poseen un anillo de  $\gamma$ -lactona que en la mayoría de los casos se presenta modificado en forma de  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona. Son las propiedades alquilantes del anillo lactónico las que han sido consideradas como responsables de la amplia actividad biológica de estas plantas (Anaya *et al.* 2001).

Las LST poseen un resto  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado en el anillo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona (exo-o endocíclico) capaz de producir reacciones de adición con grupos tiol (-SH) o amino pertenecientes a proteínas, enzimas o ácidos nucleicos produciendo una interrupción de las funciones macromoleculares y redox (Arantes *et al.* 2011). Además del anillo  $\alpha$ -metileno- $\gamma$ -lactona, otros grupos están involucrados en la actividad biológica de las LST, tal como  $\alpha,\beta$ -ciclopentenonas, ésteres insaturados en las cadenas laterales y epóxidos (Zhang *et al.* 2005).

Es posible que la alimentación y la migración de larvas L<sub>4</sub> y parásitos adultos hematófagos sea facilitada por proteasas (Anthony *et al.* 2005, Cardona *et al.* 2008). Algunas de estas enzimas se encuentran en los productos de ES de los parásitos y juegan un papel esencial en los procesos celulares, digestivos, alimenticios, inflamatorios, cicatrizantes y sobre todo en la

evasión de la respuesta inmune (Sajid y McKerrow 2002) (**Cuadro 7**) (Williamson *et al.* 2003). Se contempla que las LST inactivan proteínas al unirse específicamente a los grupos tiol (-SH) de las proteasas interfiriendo con su motilidad y alimentación (Zhang *et al.* 2005). Tal podría ser el caso de lo reportado por Molan *et al.* (2003), quienes encontraron que el EC de LST de *Cichorium intybus* presentó una actividad inhibitoria en larvas L<sub>3</sub> gastrointestinales de *Dictyocaulus* sp.

Por otra parte, Zhu *et al.* (2013), evaluaron el aceite esencial, 1,8-cineol y alcanfor de *Artemisia lancea* encontrando una actividad ovicida con los primeros dos frente a *H. contortus*, mientras que el alcanfor no presentó suficiente actividad. En tanto, el desarrollo larvario se vio afectado por el aceite esencial, 1, 8-cineol y alcanfor en un 93.6%, 65.2% y 57% respectivamente. En el ensayo de migración sólo se observaron efectos con el aceite esencial y 1,8-cineol. Por otra lado, Anthony *et al.* (2005), mencionan que el terpineno-4-ol, posee una acción tripanocida, además de una acción inhibitoria sobre *T. brucei*. Dichos compuestos también se encuentran presentes en el aceite de *A. ludoviciana* lo que sugiere que la actividad antihelmíntica puede estar asociada a los dos componentes principales de la planta, así como a la interacción de otros compuestos terpenoides. Cabe resaltar, Acharya *et al.* (2014), no encontraron resultados favorables con el extracto de *A. ludoviciana* en la inhibición de la eclosión de huevos y migración larvaria de *H. contortus*.

### 3. HIPÓTESIS

Los extractos etanólicos digeridos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* poseen actividad antihelmíntica sobre huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*.

---

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antihelmíntica *in vitro* de los extractos etanólicos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* sobre huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*.

### 4.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Evaluar los extractos etanólicos crudos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* sobre la actividad de la microflora ruminal a partir de la producción de gas *in vitro*.
- 2) Comparación espectroscópica de los extractos etanólicos crudos y digeridos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana*.
- 3) Evaluar *in vitro* de los extractos etanólicos crudos y digeridos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* sobre huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*.

## 5. RESULTADOS

## CAPÍTULO 1

### **EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *ALLIUM SATIVUM*, *ALLIUM CEPA* Y *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MICROFLORA RUMINAL A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO***

ARTÍCULO POR ENVIAR A LA REVISTA “...”

## EVALUACIÓN DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *ALLIUM SATIVUM*, *ALLIUM CEPA* Y *ARTEMISIA LUDOVICIANA* SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA MICROFLORA RUMINAL A PARTIR DE LA PRODUCCIÓN DE GAS *IN VITRO*

A.I. Huerta-Melgarejo<sup>a\*</sup>, J. Herrera-Camacho<sup>a</sup>, M.A. Gómez-Hurtado<sup>b</sup>, R.E.N. del Río-Torres<sup>b</sup>, D. Cabrera-Jiménez<sup>c</sup>, R. González-Garduño<sup>d</sup> y C. E. Orozco-Durán<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México.

<sup>b</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, edificio-B1, ciudad universitaria, C.P. 58030, Morelia, Michoacán, México.

<sup>c</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México.

<sup>d</sup> Universidad Autónoma de Chapingo, Unidad Regional Universitaria Sursureste, km 7 Carretera Teapa-Vicente Guerrero, C.P. 86800, Teapa, Tabasco, México.

### RESUMEN

Encontrar alternativas terapéuticas para el control de parásitos gastrointestinales en rumiantes ha llevado a evaluar diversos extractos vegetales *in vitro*, generalizando sus efectos antes de ser validados *in vivo*, independientemente del efecto negativo que estos pudiesen tener sobre la microflora ruminal. El objetivo del presente estudio fue evaluar los extractos etanólicos de *Allium sativum*, *Allium cepa* y *Artemisia ludoviciana* sobre la actividad de la microflora ruminal utilizando la técnica de producción de gas *in vitro*. La producción de gas por tratamiento no presentó ningún efecto significativo ( $P>0.05$ ) a los tres niveles de inclusión utilizados (30, 40 y 50%). Sin embargo, *A. sativum* mostró una mayor actividad al 50% ( $10.317\pm 3.252$ ;  $11.382\pm 4.208$  y  $11.786\pm 4.05$ ) sobre la microflora ruminal aumentando la producción de gas proveniente de la cinética de fermentación del sustrato, mientras que *A. cepa* se comportó mejor al 30% ( $10.159\pm 2.802$ ;  $9.611\pm 2.802$  y  $7.875\pm 1.96$ ) y *A. ludoviciana* lo hizo al 40% ( $8.907\pm 2.571$ ;  $9.366\pm 2.438$  y  $8.163\pm 2.145$ ). En cuanto a la producción de gas *in vitro* entre tratamiento el nivel de inclusión al 50% se comportó de manera significativa ( $P<0.05$ ) respecto a los otros dos niveles, siendo el más noble con la microflora ruminal. Estos resultados muestran el potencial de la técnica de producción de gas *in vitro* como una alternativa para evaluar los posibles efectos de los extractos con potencial antihelmíntico antes de su aplicación *in vivo*. Por otra parte, permite recuperar los extractos digeridos a fin de evaluar si mantienen su efecto antiparasitario posterior a un proceso de digestión ruminal simulado.

**Palabras clave:** *producción de gas in vitro*, *microflora ruminal*, *extracto vegetal*, *digestibilidad ruminal* y *cinética de fermentación*.

## INTRODUCCIÓN

El sector agropecuario en México contribuye a la economía nacional con 609, 262 millones de pesos anuales, siendo éste un motor importante para el desarrollo de la industria nacional, proporcionando alimento, materias primas, fuentes de empleo, entre otros bienes (Becerril *et al.*, 2007; INEGI, 2014a).

La superficie destinada para la actividad ganadera en este país se calcula aproximadamente en 100 millones de hectáreas. Entre dicha actividad destacan los sistemas de producción mixta de rumiantes, los cuales basan sus estrategias de alimentación en el pastoreo continuo (INEGI, 2012), factor que predispone a la infestación de los animales con parásitos gastrointestinales (PG) comprometiendo su bienestar y salud, reduciendo su productividad (Montalvo *et al.*, 2006; Arece *et al.*, 2008).

Tradicionalmente, el control de los PG se basa en el uso de productos químicos. El empleo irracional de estos fármacos ha generado pérdidas cuantiosas para la ganadería, graves daños ecológicos y serios problemas de resistencia parasitaria (Sackett *et al.*, 2006). Aunado a esta situación, la demanda de productos orgánicos ha llevado a la búsqueda de estrategias complementarias para el control de los PG (Waller y Thamsborg, 2004). Entre los cuales destacan el uso de plantas con potencial forrajero, aceites esenciales y extractos vegetales (Avello y Cisternas, 2010).

En la actualidad, se han evaluado *in vitro* e *in vivo* diversas plantas y extractos vegetales en el control de PG con resultados alentadores pero variables (Athanasiadou y Kyriazakis, 2004; Hernández *et al.*, 2008). No obstante, se ha prestado poca atención a los efectos que estos pudiesen ocasionar *in vivo* sobre la microflora ruminal; por sus acciones bactericidas, antimicóticas y antiprotozoarias (Benkeblia, 2004; López *et al.*, 2008) que alteren la digestibilidad y utilización de nutrientes para el mantenimiento animal.

Por lo tanto, la optimización de la producción en el rumiante, requiere el mantenimiento de las condiciones adecuadas del medio ruminal que garanticen su equilibrio y funcionamiento (Leng *et al.*, 1995). La técnica de producción de gas *in vitro*, es un sistema de alta capacidad operativa y bajo costo (Bruni y Chilibrostes, 2001) que permite predecir la digestibilidad de los alimentos por acción de la microflora ruminal, mediante la producción de gas originada por la cinética de fermentación del alimento (Wawrzkiwicz y Danelón, 2004; Posada y Noguera, 2005). Esto ha impulsado a contemplar dicha técnica para la evaluación previa de los extractos vegetales con potencial antihelmíntico *in vitro* antes de su aplicación *in vivo*. Que permita determinar el efecto de los mismos sobre la microflora ruminal. Por otro lado, sirve como un modelo, a partir del cual se puedan recuperar los extractos digeridos con el fin de medir su actividad posterior al proceso de digestión ruminal simulado.

El presente estudio tuvo como objetivo evaluar la actividad de los extractos vegetales de *Allium sativum*, *Allium cepa* y *Artemisia ludoviciana* sobre la microflora ruminal mediante la técnica de producción de gas *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** El estudio se realizó en el Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (IIAF) de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) ubicado en Tarímbaro, Michoacán, el cual se localiza entre las coordenadas 19° 48' de latitud norte y 101° 11' de longitud oeste, a una altitud de 1,860 msnm. Posee un clima templado con una temperatura media de 18.4 °C y una precipitación media anual de 777 mm (García, 1988).

**Material vegetal.** Los bulbos de ajo (*A. sativum*) y cebolla (*A. cepa*) se obtuvieron en los mercados locales de Morelia, Michoacán. Se seleccionaron frutos sanos, sin daños aparentes. Las plantas completas de estafiate (*A. ludoviciana*) se colectaron entre los meses de septiembre a noviembre (McVaugh, 1984) del 2013 y 2014 en el municipio de Irtzio, Michoacán, ubicado entre las coordenadas 19° 64' latitud norte y 101° 41' longitud oeste; que se encuentra a una altitud de 2,226 msnm y cuenta con una temperatura media de 14-18 °C (INEGI, 2014b). La planta de estafiate fue identificada y clasificada como *Artemisia ludoviciana spp., mexicana* por el departamento de botánica de la facultad de biología de la U. M. S. N. H. con No. de registro: IEB-246452, y depositada en el herbario del Instituto de Ecología A.C. de Pátzcuaro, Michoacán.

**Obtención de los extractos completos.** La obtención de extractos completos de *A. sativum* y *A. cepa* se realizó utilizando material fresco, mientras que para *A. ludoviciana* el material vegetal se secó previamente por ocho días a temperatura ambiente. El proceso de maceración se llevó a cabo colocando en frascos de cristal 300 g de cada muestra en trozos pequeños (2-3 mm), utilizando como solvente de extracción etanol al 96% en cantidad suficiente para cubrir el material vegetal, por 72 h a temperatura ambiente con agitación manual (5 minutos/día). Transcurrido este periodo se procedió a filtrar la solución. El material filtrado se concentró en un rota-evaporador (marca Ika HB10 basic® modelo RV10B599) con vacío. Este proceso se realizó por triplicado hasta la completa extracción del material vegetal. Los extractos se conservaron en frascos ámbar a 4 °C para su uso posterior (Ortuño, 2006). El rendimiento para cada extracto se calculó mediante la siguiente fórmula:  $RE = (V/P) \times 100$ , donde RE=Rendimiento del extracto vegetal; V=Volumen del extracto obtenido y P=Peso inicial de la muestra vegetal (Guamán, 2012).

**Actividad de los extractos completos sobre la microflora ruminal.** Se utilizó la técnica descrita por Mauricio *et al.* (1999) para evaluar la cinética de producción de gas *in vitro*, producto de la degradación de la materia vegetal por la microflora ruminal. Para ello, se incubaron (ECOSHEL®, modelo 9023A) por triplicado viales de cristal de 125 mL a los que se adiciono 1 g de avena deshidrata (65 °C por 24 h) y molida, 80 mL de solución nutritiva y 20 mL de líquido ruminal (LR) de vacas Holstein adultas, colectado mediante una sonda orogástrica acoplada a una bomba de vacío manual. Las vacas estuvieron alimentadas con una dieta basada en heno de avena y alfalfa. Una vez colonizados los frascos por la microflora ruminal (16 h) de acuerdo al punto máximo de producción de gas *in vitro*, se adicionaron de manera individual los extractos completos al 30% (0.2997 mg), 40% (0.3996 mg) y 50% (0.4995 mg). Los porcentajes se obtuvieron en relación al gramo (0.999 mg) de avena. De igual manera, se integraron frascos para el estándar (heno de alfalfa), testigo (heno de avena) y blanco (LR y solución nutritiva). La presión se registró mediante la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60 y 72 h utilizando un transductor de presión (Lutron®, Modelo

PS-9302) acoplado aún lector digital. El experimento se realizó por triplicado (Theodorou *et al.*, 1994; Posada y Noguera, 2005).

**Análisis estadístico.** La actividad de los extractos completos sobre la microflora ruminal, se evaluó mediante un análisis de varianza factorial (ANOVA) con mínima diferencia significativa ( $\alpha=0.05$ ). La comparación de muestras múltiples que presentaron diferencias significativas ( $P<0.05$ ), se realizó mediante una prueba de Tukey utilizando el paquete estadístico STATGRAPHICS® Centurión XV.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Rendimiento de los extractos completos.** El mayor rendimiento se obtuvo con el extracto etanólico de *A. cepa* (**Cuadro 1**), si bien no existen reportes sobre el rendimiento de esta planta, este puede deberse a su alto contenido de agua (90%) (Roque *et al.*, 2007). Mientras que, con el extracto de *A. sativum* se obtuvo un menor rendimiento, debido a que posee menor porcentaje de humedad (70%) (Benklebia, 2004), (**Cuadro 1**). Sin embargo, el rendimiento del *A. sativum* fue mayor a lo indicado por Durán *et al.* (2007), quienes obtuvieron un 31.2% mediante un proceso de maceración en frío con etanol al 75%, estos autores sugieren que el uso de este solvente permite un mayor rendimiento con respecto a otros, debido a la concentración de compuestos fenólicos y azufrados presentes en las plantas de estudio.

Para la extracción de *A. ludoviciana* los solventes más utilizados son cloruro de metileno, metanol, cloroformo y hexano debido a la alta concentración en compuestos terpénicos (Ruiz *et al.*, 1993). Lee y Geissman (1970), realizaron extracciones con cloroformo de una cantidad de 8.5 kg de material seco, obteniendo un rendimiento de 2.49% (212 g). Por su parte, Ruíz *et al.* (1993) a partir de 11 kg de macerado con hexano y cloruro de metileno, obtuvieron un rendimiento de 3.72% (410 g). Mientras que, Anaya *et al.* (2014) utilizando 300 g de planta sometida a hidrodestilación con cloruro de metileno-metanol (1:1), obtuvieron un rendimiento de 10% (30 g). Por otro lado, Estrada *et al.* (2012), mediante maceración en frío utilizando hexano, cloruro de metileno y metanol lograron un rendimiento del 57%, 12.7% y 15.4% respectivamente.

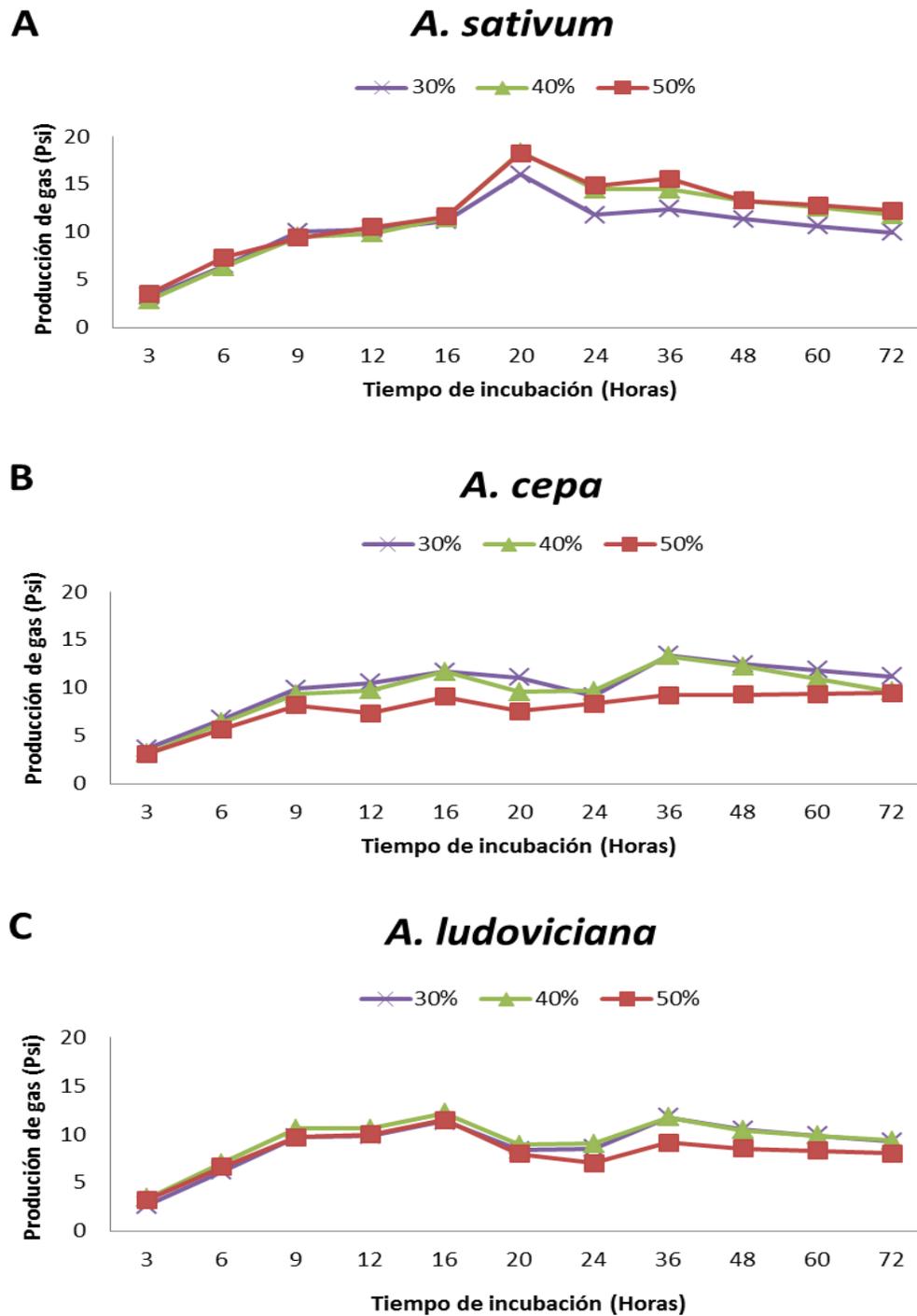
Por consiguiente, el rendimiento obtenido en el presente estudio mediante maceración en frío con etanol al 96 % y extracción a 39 °C, superó lo indicado en la literatura. No obstante, los valores encontrados con *A. ludoviciana* (**Cuadro 1**) se encuentran dentro de los parámetros normales. La variabilidad observada en el rendimiento de los extractos puede deberse a las características físicas, químicas y ambientales del material vegetal tales como origen, temporada y proceso de recolección, humedad, madurez y partes empleadas para extracción, que incurran en un aumento o disminución en la concentración de sus compuestos, así como en la metodología y solvente de extracción (Makkar, 2003; Barrabí y Arece 2013). Todos los extractos exhibieron un fuerte olor característico de la planta.

**Cuadro 1.** Rendimiento de los extractos etanólicos naturales.

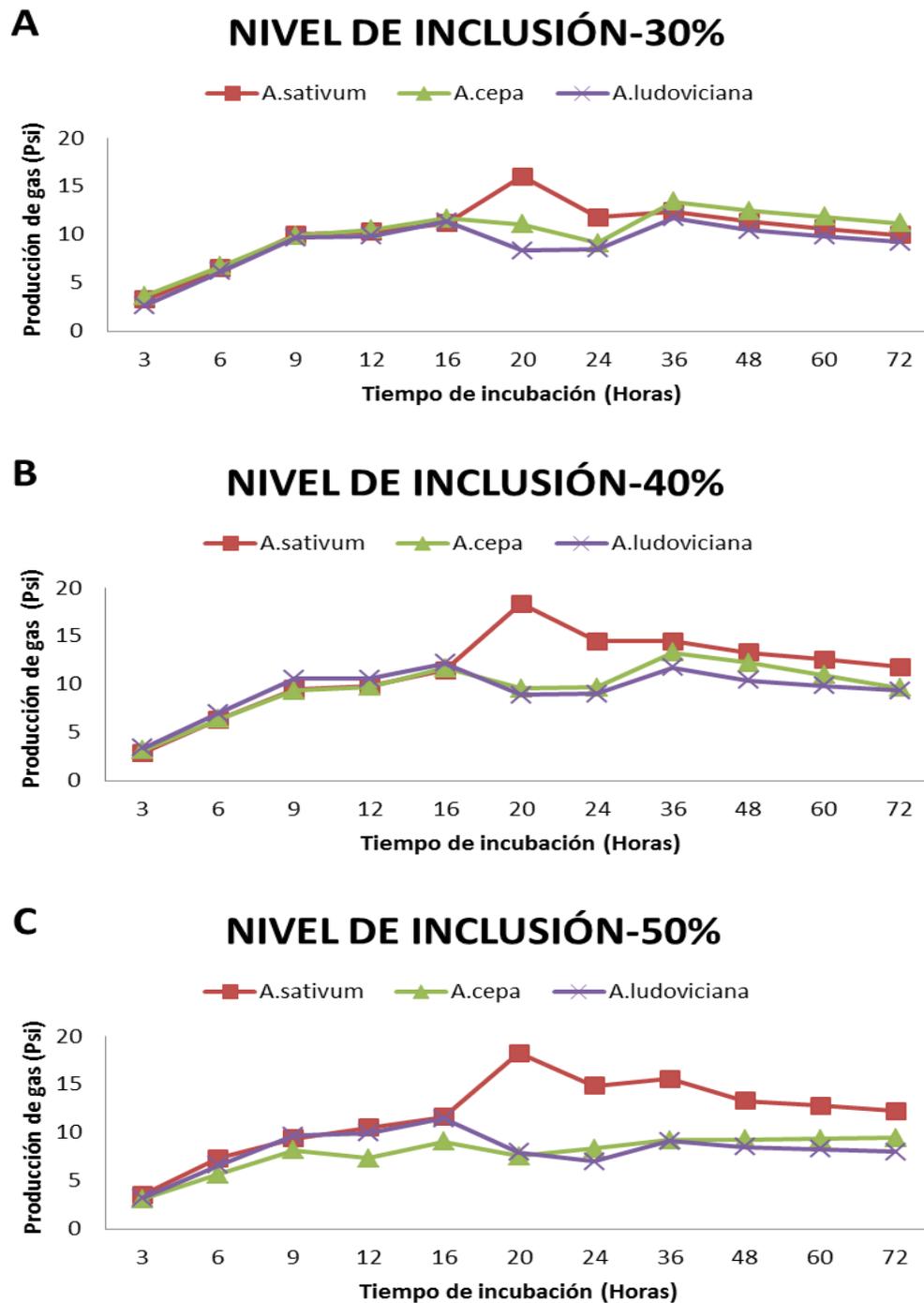
| Muestra               | Peso inicial (g) | Rendimiento por maceración (g) |         |         | Rendimiento (%) |
|-----------------------|------------------|--------------------------------|---------|---------|-----------------|
|                       |                  | Primera                        | Segunda | Tercera |                 |
| <i>A. sativum</i>     | 300              | 42.08                          | 32.17   | 21.71   | 31.98           |
| <i>A. cepa</i>        | 300              | 52.96                          | 47.90   | 31      | 43.95           |
| <i>A. ludoviciana</i> | 300              | 18.07                          | 8.78    | 4.47    | 10.44           |

**Actividad de los extractos completos sobre la microflora ruminal.** Se realizaron inclusiones a diferentes niveles de concentración de los extractos crudos por 72 h, para evaluar su efecto sobre la microflora ruminal a partir de la producción de gas *in vitro*, la cual es originada por la degradación del sustrato incubado. La **FIG. 1**, muestra que la dinámica de producción de gas *in vitro* no se vio del todo afectada ( $P>0.05$ ) por algunos de los tres niveles de inclusión utilizados para este experimento. La **FIG. 1A**, refleja un incremento en la producción de gas a medida que aumenta el nivel de inclusión de *A. sativum*, por su parte, en la **FIG. 1B**, el aumento en la producción de gas es inversamente proporcional al nivel de inclusión de *A. cepa*, mientras que, la **FIG. 1C** muestra un mejor comportamiento utilizando el 40% de extracto de *A. ludoviciana*.

Al comparar los niveles de inclusión entre tratamientos (**FIG. 2**) no se encontraron anomalías sobre la cinética de producción de gas *in vitro* ( $P>0.05$ ) a los niveles de inclusión del 30% (**FIG. 2A**) y 40% (**FIG. 2B**) respectivamente; sin embargo el nivel de inclusión al 50% (**FIG. 2C**) mostró diferencias significativas ( $P<0.05$ ), resaltado *A. sativum* del resto de los extractos evaluados (**Cuadro 2**).



**Figura 1.** Efecto del nivel de inclusión (30, 40 y 50%) dentro de tratamientos sobre la producción de gas *in vitro* (Psi). **FIG. 1A)** *A. sativum* ( $P=0.6576$ ), **FIG. 1B)** *A. cepa* ( $P=0.1080$ ) y **FIG. 1C)** *A. ludoviciana* ( $P=0.5003$ ).



**Figura 2.** Comparación de los niveles de inclusión entre tratamientos sobre la producción de gas *in vitro* (Psi). **FIG. 2A)** Nivel de inclusión del 30% ( $P=0.4649$ ), **FIG. 2B)** Nivel de inclusión 40% ( $P=0.2964$ ) y **FIG. 2C)** Nivel de inclusión 50% ( $P=0.0051$ ).

**Cuadro 2.** Efecto del nivel de inclusión al 50% entre tratamientos sobre la producción de gas *in vitro* (Psi).

| Nivel de inclusión    | Producción de gas <i>In vitro</i> (Psi) |
|-----------------------|---|
| <i>A. sativum</i>     | 11.786 ±4.052                           |
| <i>A. cepa</i>        | 7.875 ±1.963                            |
| <i>A. ludoviciana</i> | 8.163 ±2.145                            |

Al parecer el extracto completo de *A. sativum* favorece la producción de gas *in vitro* a medida que aumenta el nivel de inclusión, esto puede deberse a que cerca del 30% de materia fresca (32.60g por cada 100g) se encuentra integrada por hidratos de carbonos no estructurales, algo similar sucede con *A. cepa* quien almacena sustancias de reserva (fructosa, sacarosa y fructanos) pero menor cantidad (5.3-6.9g por cada 100g) (García y Sánchez *et al.*, 2005), reduciendo su disponibilidad como alimento en el mantenimiento y actividad de la microflora ruminal (Angulo *et al.*, 2005). De acuerdo con, Kamra *et al.* (2006, 2008), el extracto de *A. sativum* favorece la actividad de los microorganismos ruminales sin afectar las enzimas que degradan la fibra y materia seca de los alimentos.

De acuerdo con Patra *et al.* (2006, 2010), los metabolitos extraídos en etanol y metanol a partir del *A. sativum* y *A. cepa* parecen no afectar la fermentación ruminal, ambos estudios concuerdan con el aumento en el número de protozoarios. Prins (1991) menciona que los protozoarios son importantes en la digestión de carbohidratos no estructurales, intervienen en el fraccionamiento físico del alimento y juegan un papel importante como reguladores del pH ruminal, favoreciendo la digestión y acción de otros microorganismos.

Sin embargo, el extracto completo de *A. cepa* exhibió una disminución en la producción de gas *in vitro* a medida que incrementa el nivel de inclusión (**FIG. 1B**), lo mismo se apreció con el extracto completo de *A. ludoviciana* (**FIG. 1C**). A pesar de que la mayoría de los compuestos que ingresan al rumen son metabolizados y convertidos en nutrientes, la reducción en la digestibilidad de estos extractos puede deberse a que existen otros compuestos antinutricionales que por acción directa (Benkeblia, 2004; Anthony *et al.*, 2005) o a través de sus metabolitos secundarios pueden ocasionar diversos efectos sobre la fermentación y salud animal (Roige y Tapia, 1996). Tal como lo sugiere, Patra y Saxena (2010), quienes mencionan que los compuestos orgánicos de azufre y flavonoides parecen tener efectos directos en contra de los protozoarios metanógenos, lo cual puede interferir con la función de otros microorganismos.

En el caso de, *A. ludoviciana* no existen estudios detallados de su efecto sobre la microflora ruminal, sin embargo su baja digestibilidad y por ende disminución en la producción de gas, bien puede deberse a su alta concentración en compuestos fenólicos y terpénicos, los cuales poseen efectos bactericidas, fungicidas y protozoaricidas (Závala *et al.*, 2002, Calzada *et al.*, 2006), o bien que la mayoría de estos compuestos están formados por anillos aromáticos, lo cual dificulta su degradación (Lopes *et al.*, 2008).

Aunque en la mayoría de los casos, los compuestos activos en los extractos vegetales no han sido plenamente identificados, enzimas vegetales tales como: proteasas de cisteína o

metabolitos secundarios; alcaloides, glucósidos y taninos han demostrado propiedades antiparasitarias dosis-dependientes (Ayas *et al.*, 2008). Algunos otros compuestos activos como las saponinas, taninos, glucósidos cianogénicos, oxalatos, cumarinas y lactonas sesquiterpénicas propias de algunas plantas como es el caso de *A. ludoviciana*, pueden tener efectos anti nutricionales disminuyendo la ingesta de alimento; inhibiendo la fermentación ruminal y la síntesis de proteína microbiana (Pesoa, 2001).

No obstante, la microflora ruminal tiene la capacidad de adaptarse en forma gradual a la ingestión prolongada de ciertos compuestos, que permite al animal adquirir mayor tolerancia (Mcsweeney *et al.*, 1999). Por otro lado, la capacidad de biotransformar diferentes compuestos dando origen a sustancias intermedias o finales que son absorbidas por el tracto gastrointestinal (Roige y Tapia, 1996). El efecto que estos compuestos puedan ejercer sobre el propio rumen o el animal dependerá del nivel de consumo, del tipo de metabolitos producidos y de la absorción de los mismos (Carmona, 2007). Por tal motivo, resulta indispensable evaluar previamente el efecto de los extractos con potencial antiparasitario sobre la microflora ruminal, antes de generalizar su efecto y probarlos *in vivo*.

## CONCLUSIONES

La información obtenida permitió conocer la actividad de los extractos crudos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* sobre la microflora ruminal con la finalidad de poder ser utilizados posteriormente en evaluaciones antiparasitarias *in vitro*. Las concentraciones pertinentes de cada extracto que no interfieran con la actividad de la microflora ruminal y por consiguiente con la digestibilidad, podrían estimar dosis más certeras para las evaluaciones de estudios antiparasitarios *in vivo*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al estudiante de maestría Angel Ivan Huerta Melgarejo para la realización de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Anaya, E. G. D., Rivero, C. I., Rivera, C. J., y Mata, R. (2014). Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1):416-425.
- Angulo, R. A., Noguera, R. R., y Berdugo, J. A. (2005). El búfalo de agua (*Bubalus bubalis*) un eficiente utilizador de nutrientes: aspectos sobre fermentación y digestión ruminal. *Livestock Research for Rural Development*, 17(67).
- Anthony, J. P., Fife, L., y Smith, H. (2005). Plant active components a resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, 21(10):462-468.
- Arece, J., López, Y., Aróstica, N., Olivares, J., Rodríguez-Diego, J. G., y Torres-Hernández, G. (2008). Evaluación de cuatro antiparasitarios frente a estrongilidos gastrointestinales de ovinos. *Revista de salud animal*, 30(3):180-183.

- Athanasiadou, S., y Kyriazakis, I. (2004). Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition*, 63(04):631-639.
- Avello, M., y Cisternas, F. I. (2010). Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. *Revista Médica de Chile*, 138(10):1288-1293.
- Ayaz, E., Turel, I., Gul, A., y Yilmaz, O. (2008). Evaluation of the anthelmintic activity of garlic (*Allium sativum*) in mice naturally infected with *Aspicularis tetraptera*. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*, 3(2):149-152.
- Barrabí-Puerta, M., y Arece-García, J. (2013). Actividad antihelmíntica *in vitro* de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario. *Revista de Salud Animal*, 35(2):103-108.
- Becerril, T. O. U., Licea, G. R., y Hernández, J. J. R. (2011). Eficiencia técnica del sector agropecuario de México: Una perspectiva de análisis envolvente de datos. *Economía*, 36(31):85-110.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-Food Science and Technology*, 37(2):263-268.
- Bruni, M. de los A., y Chilibrostes, P. (2001). Simulación de la digestión ruminal por el método de la producción de gas. *Archivo Latinoamericano de Producción Animal*, 9 (1):43-51.
- Calzada, F., Yépez, M. L., y Aguilar, A. (2006). *In vitro* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *Journal of Ethnopharmacology*, 108(3):367-370.
- Carmona Agudelo, J. C. (2007). Efecto de la utilización de arbóreas y arbustivas forrajeras sobre la dinámica digestiva en bovinos. *Revista Lasallista de Investigación*, 4(1):40-50.
- Durán, M. A., Gonzales, P. A., y Cardona, L. (2007). Obtención y caracterización de la oleoresina del ajo (*Allium sativum*). *Scientia et Technica*, 1(37).
- Estrada, S. S., Sánchez, R. A., Navarrete, V. G., Castillo, E. P., Villalobos, M. R., y Ibarra, B. M. (2012). Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rats smooth muscle tissues. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2):513-518.
- García E. (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 217 pp.
- García, G. J. J., y Sánchez, M. F. J. (2005). Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *ALAN*. 50(3).
- Guamán, M. (2012). Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* (Asteraceae) de la provincia de Loja. Tesis de Licenciatura. Escuela de bioquímica y farmacia. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. 37 pp.
- Hernández-Orduño, G., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Reyes Ramírez, R. R., Hoste H., y Calderón Quintana, J. A. (2008). *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gaureri*, *Havardia albicans* and Quebracho tannin extracts on a mexican strain of *Haemonchus contortus* L3 larvae. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(2):191-197.
- INEGI Instituto de Estadística, Geografía e informática. (2014b). Mapa de Irtazio. <http://codigo-postal.es.mapawi.com/mexico/7/morelia/2/833/16053/irtazio/58333/40019/> (03 de Octubre de 2014).

- INEGI, Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2012). Características del sector agropecuario y forestal en Michoacán de Ocampo. Censo agropecuario 2007. México. pp. 23-33pp.
- INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2014<sup>a</sup>). Producto interno bruto a precios corrientes. Cifras durante el segundo trimestre de 2014. [http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/notasinformativas/pib\\_precr/ni-pibcr.pdf](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/notasinformativas/pib_precr/ni-pibcr.pdf) (21 de agosto de 2014).
- Kamra, D. N., Agarwal, N., y Chaudhary, L. C. (2006). Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. *International congress series*, 1293:156-163.
- Kamra, D. N., Patra, A. K., Chatterjee, P. N., Kumar, R., Agarwal, N., y Chaudhary, L. C. (2008). Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Animal Production Science*, 48(2):175-178.
- Lee, K. H., y Geissman, T. A. (1970). Sesquiterpene lactones of artemisia constituents of *A. ludoviciana ssp. mexicana*. *Phytochemistry*, 9(2):403-408.
- Leng, R. A., Choo, B. S., y Arreaza, C. (1995). Tecnologías prácticas para optimizar la utilización de alimentos en rumiantes. *Pastos y Forrajes*, 18(1).
- Lopes, L. D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., y Kolodziejczk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of Artemisia essential oils. *Phytochemistry*, 69(8):1732-1738.
- Makkar, H. P. S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49(3):241-256.
- Mauricio, R. M. (1999). Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forage. Tesis de doctorado. The University of Reading. Reading, UK. 281 pp.
- McSweeney, C. S., Palmer, B., Bunch, R., y Krause, D. O. (1999). Isolation and characterization of proteolytic ruminal bacteria from sheep and goats fed the tannin-containing shrub legume *Calliandra calothyrsus*. *Applied and environmental microbiology*, 65(7): 3075-3083.
- McVaugh, R. (1984). Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western México. Vol. 12. "Compositae". University of Michigan Herbarium Ann Arbor. pp. 174-75, 374-75, 886-87.
- Montalvo, X., López, M. Vázquez, V. Liéban, E., y Mendoza, G. (2006). Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a Febendazol e Ivermectina en la región Noroeste del estado de Tlaxcala. *Técnica Pecuaria México*, 44(1):81-90.
- Ortuño, S. M. F. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyane. Vol. 276. España. 96 pp.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., y Agarwal, N. (2006). Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts *in vitro* gas production test. *International Congress Series*, 1293:176-179.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., y Agarwal, N. (2010). Effects of extracts of spice on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3):511-520.
- Patra, A. K., y Saxena, J. (2010). A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. *Phytochemistry*, 71(11):1198-1222.

- Pesoa, L. M. (2001). Actividade ovicida *in vitro* de plantas medicinais contra *Haemonchus contortus*. Tesis de Maestría. Universidade Estadual do Ceará. Brasil. 68 pp.
- Posada, S. L., y Noguera, R. R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Archive for rural development*, 17(4).
- Prins, R. A. (1991). The rumen ciliates and their functions. En: J. P. Jouany (Ed) RUMEN MICROBIAL METABOLISM AND RUMINANT DIGESTION. Paris. pp. 44-50.
- Roige, M. B., y Tapia, M. O. (1996). Efecto de algunos tóxicos de origen vegetal y fúngico en el rumen. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 28(1):5-16.
- Ruiz, C. A., Cano, E. A., y Delgado, G. (1993). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana ssp. mexicana*. *Phytochemistry*, 33(5):1113-1115.
- Sackett, D., Holmes, H., Abbott, K., Jephcott, S., y Barber, M. (2006). Assessing the economic cost of endemic disease on the profitability of Australian beef cattle and sheep producers. *Meat Livestock Australia Fast Fact* 87.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., y France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3):185-197.
- Waller, P. J., y Thamsborg, S. M. (2004). Nematode control in 'green' ruminant production systems. *Trends in Parasitology*, 20(10):493-497.
- Wawrzkiwicz, M., y Danelón, J. L. (2004). Mejoramiento de la técnica de producción de gas *in vitro* para evaluar alimentos para rumiantes. Nuevo recipiente de incubación. *Revista argentina de producción animal*, 24(3-4):187-197.
- Zavala, S. M. A., Pérez, G. S., Pérez, G. C., Sánchez, S. D., y Arias, G. L. (2002). Antidiarrhoeal activity of nonanal, an aldehyde isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology*, 40(4):263-268.

## CAPÍTULO 2

### **EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *A. SATIVUM*, *A. CEPA* Y *A. LUDOVICIANA* SOBRE HUEVOS Y LARVAS INFECTANTES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* Y *TRICHOSTRONGYLUS COLUBRIFORMIS***

ARTÍCULO POR ENVIAR A LA REVISTA “...”

## EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *A. SATIVUM*, *A. CEPA* Y *A. LUDOVICIANA* SOBRE HUEVOS Y LARVAS INFECTANTES DE *HAEMONCHUS CONTORTUS* Y *TRICHOSTRONGYLUS COLUBRIFORMIS*

A.I. Huerta-Melgarejo<sup>a\*</sup>, J. Herrera-Camacho<sup>a</sup>, M.A. Gómez-Hurtado<sup>b</sup>, R.E.N. del Río-Torres<sup>b</sup>, D. Cabrera-Jiménez<sup>c</sup>, R. González-Garduño<sup>d</sup>, y C. E. Orozco-Durán<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México.

<sup>b</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH). Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, edificio-B1, ciudad universitaria, C.P.58030, Morelia, Michoacán, México.

<sup>c</sup> Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, C.P. 58880, Tarímbaro, Michoacán, México.

<sup>d</sup> Universidad Autónoma de Chapingo, Unidad Regional Universitaria Sursureste, km 7.5, carretera Teapa-Vicente Guerrero, C.P. 86800, Teapa, Tabasco, México.

### RESUMEN

Con el objeto de evaluar la actividad antihelmíntica del extracto etanólico crudo y digerido de ajo (*A. sativum*), cebolla (*A. cepa*) y estafiate (*A. ludoviciana*) se diseñó un experimento para estudiar su efecto sobre la eclosión de huevos y motilidad larvaria de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*. Se evaluaron diversos tratamientos, los cuales corresponden a los extractos crudos (*ECA*, *ECC*, *ECE*) y digeridos (*EDA*, *EDC*, *EDE*) de cada una de las plantas. Como controles positivos se utilizó albendazol (*ABZ*) en los ensayos de eclosión de huevos y thiabendazol (*TBZ*) para los ensayos de motilidad larvaria, así como extracto de líquido ruminal (*EDLr*) y extracto digerido de avena (*EDAv*), mientras que como control negativo se empleó agua. Los extractos crudos y digeridos de *A. cepa* fueron los únicos que presentaron una actividad significativa en los ensayos de eclosión de huevos para ambas cepas. Mientras que, los extractos crudos y digeridos de *A. sativum* sólo fueron positivos para el ensayo de eclosión de huevos con *H. contortus*. Ningún tratamiento mostró efectividad sobre larvas del tercer estadio (*L*<sub>3</sub>) de las cepas evaluadas. En conclusión, los extractos digeridos mostraron un mejor comportamiento a menor concentración respecto de los extractos crudos en los ensayos de eclosión de huevos.

**Palabras claves:** nemátodos, *extracto vegetal*, *ensayo parasitarios in vitro*.

## INTRODUCCIÓN

Los nemátodos gastrointestinales (NGI) representan una de las primeras limitantes en los sistemas de producción ovina en pastoreo (Moreno *et al.*, 2010). Aquellos son responsables de pérdidas económicas importantes debido a la reducción en la productividad del hospedero, retraso en el crecimiento, disminución en la fecundidad y alta mortalidad en animales susceptibles (Torres-Acosta y Hoste, 2008; Barrabí y Arece, 2013).

En los últimos años el control parasitario se ha basado en el uso exclusivo de compuestos químicos, lo que ha favorecido el aumento en la resistencia de los NGI a los antihelmínticos (AH) comerciales incrementando los problemas sanitarios y productivos de los animales (Jabbar *et al.*, 2006; Geurden *et al.*, 2014).

Actualmente, se hace imprescindible disminuir los residuos de medicamentos en los productos o derivados de origen animal, así como incentivar la protección ambiental y reducir los costos de producción por el uso irracional de compuestos químicos convencionales. Esto ha originado un interés en la búsqueda de métodos alternativos para el control parasitario (Molento, 2009).

Ante ello, se han evaluado varias opciones para el control parasitario como: el uso de hongos nematófagos (Ojeda-Robertos *et al.*, 2008), desarrollo de vacunas contra nemátodos (Vercruyse *et al.*, 2014), selección genética de animales resistentes (Greer, 2008), inmunonutrición (Nox *et al.*, 2006) y el uso de extractos vegetales (EV) ricos en metabolitos secundarios (MS) (Athanasiadou y Kyriazakis, 2004; Hernández *et al.*, 2008), estos últimos constituyen una alternativa orgánica que permite reducir la presión de selección de los NGI hacia los AH (Hernández *et al.*, 2014).

Entre las plantas con indicios etnobotánicos para el control de parásitos gastrointestinales (PGI) se encuentran el ajo (*Allium sativum*) y la cebolla (*Allium cepa*) (Osuna *et al.*, 2005). Sin embargo, los resultados científicos no han aportado pruebas definitivas en su actividad biológica (Bastidas 1969, Iqbal *et al.*, 2001, Prieto *et al.*, 2005, Burke *et al.*, 2009, Worku *et al.*, 2009, Mikail 2010). Mientras que, para el estafiate (*Artemisia ludoviciana*) no hay suficiente información que respalde su eficacia antihelmíntica (Acharya *et al.*, 2014). Sin embargo, plantas pertenecientes al mismo género han resultado de gran utilidad para este fin (Iqbal *et al.*, 2004; Tariq *et al.*, 2009; Zhu *et al.*, 2013).

La supuesta propiedad antiparasitaria de los EV ha sido causa de controversia, debido a que no existe una correlación significativa entre los test *in vitro* e *in vivo* como lo muestran los estudios de resistencia antihelmíntica a las drogas sintéticas (Athanasiadou y Kyriazakis 2004, Moreno *et al.* 2010). La discrepancia de los resultados podría atribuirse a factores como el origen del material vegetal y metodología de extracción, o bien a la farmacocinética, biodisponibilidad y farmacodinamia de los EV dentro del huésped.

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad antiparasitaria *in vitro* de los extractos completos y digeridos de *Allium sativum*, *Allium cepa* y *Artemisia ludoviciana*, sobre huevos y larvas infectantes de *Haemonchus contortus* y *Trichostrongylus colubriformis*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Localización.** Las pruebas parasitológicas *in vitro* se realizaron en la Unidad Regional Universitaria Sursureste de la Universidad Autónoma Chapingo (URUSSE-UACH) ubicada en Teapa, Tabasco. Las muestras fecales para la colecta de huevos de nemátodos se obtuvieron de ovinos de una unidad de producción ubicada en Pueblo Nuevo, municipio de Salto de Agua, Chiapas, México, la cual se localiza entre las coordenadas 17° 34' de latitud norte y 92° 29' de longitud oeste, a una altitud de 85 msnm. Posee un clima Af (m) w'' (1') g, cálido húmedo con lluvias todo el año con una temperatura media de 26.6 °C y una precipitación media anual 3 289 mm (García, 1988).

**Material vegetal.** Los bulbos de ajo (*A. sativum*) y cebolla (*A. cepa*) se obtuvieron en los mercados locales de Morelia, Michoacán. Se seleccionaron frutos sanos, sin daños aparentes. Las plantas completas de estafiate (*A. ludoviciana*) se colectaron entre los meses de septiembre a noviembre (McVaugh, 1984) del 2013 y 2014 en el municipio de Irtazio, Michoacán, ubicado entre las coordenadas 19° 64' latitud norte y 101° 41' longitud oeste; que se encuentra a una altitud de 2, 226 msnm y cuenta con una temperatura media de 14-18 °C (INEGI, 2014b). La planta de estafiate fue identificada y clasificada como *Artemisia ludoviciana spp., mexicana* por el departamento de botánica de la facultad de biología de la U. M. S. N. H. con No. de registro: IEB-246452, y depositada en el herbario del Instituto de Ecología A.C. de Pátzcuaro, Michoacán.

**Obtención de los extractos vegetales.** La obtención de los extractos completos de *A. sativum* y *A. cepa* se realizó utilizando material fresco, mientras que para *A. ludoviciana* el material vegetal se secó previamente por ocho días a temperatura ambiente. El proceso de maceración se llevó a cabo colocando en frascos de cristal 300 g de cada muestra en trozos pequeños (2-3 mm), utilizando como solvente de extracción etanol al 96% (en una relación 1:2 p/v) por 72 h a temperatura ambiente con agitación manual (5 minutos/día). Transcurrido este periodo se procedió a filtrar la solución. El material filtrado se concentró en un rota-evaporador (Ika HB10 basic®, modelo RV10B599) con vacío. El proceso se realizó por triplicado hasta la completa extracción del material vegetal. Los extractos se conservaron en frascos ámbar a 4 °C para su uso posterior (Ortuño, 2006). El rendimiento de cada extracto completo se calculó mediante la siguiente fórmula:  $RE = (V/P) \times 100$ , donde RE=Rendimiento del extracto vegetal; V=Volumen del extracto obtenido y P=Peso inicial de la muestra vegetal (Guamán, 2012).

**Digestión ruminal simulada de los extractos vegetales completos.** Se utilizó la técnica descrita por Mauricio *et al.* (1999) para evaluar la cinética de gas *in vitro*. Se incubaron (ECOSHEL®, modelo 9023A) por triplicado viales de cristal de 125 mL a los que se adicionó 1 g de avena deshidrata (65 °C por 24 h) y molida (2 mm), 80 mL de solución nutritiva (Wawrkiewicz y Danelón, 2004) y 20 mL de líquido ruminal (LR) de vacas Holstein adultas, colectado mediante una sonda orogástrica acoplada a una bomba de vacío manual. Las vacas estuvieron alimentadas con una dieta basada en heno de avena y alfalfa. Una vez colonizados los frascos por la microflora ruminal (16 h) de acuerdo al punto máximo de producción de gas *in vitro*, se adicionaron de manera individual los extractos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* al 30% (0.2997 mg), 40% (0.3996 mg) y 50% (0.4995 mg). Los porcentajes se obtuvieron en relación al gramo (0.999 mg) de avena. Por otra parte, se integraron frascos para el estándar (heno de alfalfa), testigo (heno de avena) y blanco (LR y solución nutritiva). La

presión se registró mediante la producción de gas a las 3, 6, 9, 12, 16, 20, 24, 36, 48, 60 y 72 h utilizando un transductor de presión (Lutron®, modelo PS-9302) acoplado a un lector digital. Una vez transcurrido el tiempo los frascos se almacenaron en frío para su posterior filtrado. El experimento se realizó por triplicado (Theodorou *et al.*, 1994; Posada y Noguera, 2005).

**Recuperación de los extractos vegetales post digestión.** El líquido de los frascos se filtró de manera individual con ayuda de una bomba de vacío. El medio recuperado se centrifugó (Beckman Coulter™, modelo Avanti™ J-25) por 10´/4 °C/10 000 rpm para eliminar los solutos. Posteriormente, el líquido obtenido se sometió por triplicado a una extracción por partición utilizando como solvente acetato de etilo (AcOEt) en una relación 1:2 v/v. La porción de AcOEt se recuperó mediante rota-evaporación (Ika HB10 basic®, modelo RV10B599) con vacío por 25´/39 °C/ 250 rpm. Los extractos digeridos recuperados de *A. sativum* (EDA), *A. cepa* (EDC), *A. ludoviciana* (EDE), avena (EDAv) y LR (EDLr) se mantuvieron en frascos color ámbar a 4 °C hasta su posterior uso. El rendimiento para los tres primeros se calculó mediante la siguiente fórmula:  $RE = (V/P)$ , donde (RE=Rendimiento del extracto vegetal Digerido, V=Volumen del extracto obtenido y P=Peso inicial de la muestra vegetal) (Guamán, 2012).

**Manejo de los animales.** Se utilizaron cuatro corderos BlackBelly como donadores de huevos, con una edad aproximada de ocho meses y un peso promedio de 24 Kg (24±2), los cuales se mantuvieron en jaulas metabólicas y se alimentaron con una dieta en base a pasto remolino (*Paspalum notatum*), grama amarga (*Paspalum conjugatum*), concentrado (sorgo molido, salvadillo de trigo y pasta de coco), sales minerales y agua *ad libitum* (Kearl, 1982). Los ovinos se desparasitaron previamente con albendazol (ABZ, 10 mg/kg<sup>-1</sup>) hasta eliminar la infección natural. Consecutivamente, se infectaron dos animales vía intra-ruminal con 6,000 L<sub>3</sub> de *H. contortus* y otros dos corderos con 10,000 L<sub>3</sub> de *T. colubriformis* de un aislamiento de Tabasco, pertenecientes a la Universidad Autónoma de Chapingo.

**Toma de muestras y recuperación de huevos.** A los 35 días post-infección de los corderos, se tomaron 30 g de muestra fecal del recto de ovinos infectados y se procesaron mediante la técnica de Mc Master (Thienpont *et al.*, 1986) para determinar los conteos fecales (promedio, 300 huevos por gramo de heces/hpg).

Se formó un pool con 10 g de heces y se mezclaron con solución salina saturada (d=1.20, como líquido de flotación). Inmediatamente, se centrifugó (Rolco, modelo 2036) en tubos cónicos (Falcon®) de 50 mL por espacio de 10´ a 2000 rpm. El sobrenadante se filtró y se lavó con agua corriente utilizando un tamiz del número 100 (0.088 mm, Mont-inox) acoplado a otro del número 400 (0.037 mm, Mont-inox). Después, los huevos recuperados del segundo tamiz se mezclaron con 10 mL de solución saturada de azúcar (d=1.28, como líquido de flotación) y se centrifugaron por espacio de 15´ a 2000 rpm. Por último, el anillo formado en la parte intermedia del tubo se recuperó con ayuda de una pipeta pasteur y se lavó con agua a corriente utilizando el tamiz del número 400. Los huevos recuperados de este tamiz (aproximadamente 10 mL) se colocaron en un tubo cónico de 15 mL. La concentración de huevos por mL se estimó a partir de 10 alícuotas de 10 µL ajustando el volumen para tener una concentración final de 100 huevos por cada 100 µL (Botura *et al.*, 2013).

**Recuperación de larvas.** Se realizaron coprocultivos en cajas de petri a partir de heces de animales que alcanzaron conteos superiores a los 200 hpg (González *et al.*, 2003). Los cultivos se mantuvieron durante ocho días a temperatura ambiente, transcurrido este periodo las larvas se recuperaron mediante la técnica de Baermann (Thienpont *et al.*, 1986; Valdez, 2006) y se almacenaron en un matraz de cultivo celular (CORNING®) de 250 mL.

**Desvainamiento larval.** Las larvas recuperadas se expusieron a una solución de hipoclorito de sodio al 0.187% realizando tres lavados consecutivos con agua destilada y centrifugando por espacio de 5' a 2000 rpm. La concentración de L<sub>3</sub> se cuantificó mediante alícuotas de 10  $\mu$ L ajustando el volumen final para tener una concentración de 100 L<sub>3</sub> por cada 100  $\mu$ L (González *et al.*, 2010).

**Ensayo de eclosión de huevos (EEH).** Se realizó a partir de modificaciones a la técnica descrita por Marie-Magdeleine *et al.* (2010). Se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos (NUNC-Polysorb) en las cuales se depositaron 100  $\mu$ L huevos (80-100 huevos) por pocillo para ser enfrentados con los diferentes extractos de plantas. La primera columna de la placa se ajustó a 200  $\mu$ L por pocillo adicionando 80  $\mu$ L de agua destilada y 20  $\mu$ L de tratamiento o control. A partir de esta columna se tomaron 100  $\mu$ L de cada tratamiento o control y se realizaron diluciones seriadas determinando las siguientes concentraciones: extractos completos: ECA (139.61, 69.81, 34.90, 17.45, 8.73, 4.36, 2.18, 1.09, 0.55 y 0.27 mg/mL<sup>-1</sup>), ECC (123.59, 61.80, 30.90, 15.45, 7.72, 3.86, 1.93, 0.97, 0.48 y 0.24 mg/mL<sup>-1</sup>), ECE (10.25, 5.13, 2.56, 1.28, 0.64, 0.32, 0.16, 0.08, 0.04 y 0.02 mg/mL<sup>-1</sup>); extractos digeridos: EDA (1.78, 0.89, 0.44, 0.22, 0.11, 0.05, 0.02, 0.01, 0.007 y 0.003 mg/mL<sup>-1</sup>), EDC (1.92, 0.95, 0.47, 0.24, 0.12, 0.06, 0.03, 0.01, 0.007 y 0.004 mg/mL<sup>-1</sup>) y EDE (2.38, 1.19, 0.59, 0.29, 0.14, 0.07, 0.03, 0.01, 0.009 y 0.005 mg/mL<sup>-1</sup>); controles positivos: albendazol/ABZ (2.5, 1.25, 0.63, 0.31, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 mg/mL<sup>-1</sup>), ED<sub>Av</sub> (1.30, 0.65, 0.32, 0.16, 0.16, 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.003 mg/mL<sup>-1</sup>), ED<sub>Lr</sub> (0.37, 0.18, 0.09, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005, 0.002, 0.001 y 0.0007 mg/mL<sup>-1</sup>) y control negativo: Agua. A continuación, las placas se incubaron por 48 h a 28 °C, transcurrido el tiempo se detuvo la eclosión con 100  $\mu$ L de solución de Lugol. El porcentaje de eclosión se calculó del volumen total del pozo (5 alícuotas de 20  $\mu$ L). Cada ensayo se realizó por triplicado (Kamarai y Abdul, 2011; Barrabí y Arece, 2013).

**Ensayo de motilidad larvaria (EML).** Se realizó a partir de una modificación a la técnica de motilidad de nemátodos adultos descrita por Marie-Magdeleine *et al.* (2010). El efecto de los tratamientos y controles experimentales sobre la motilidad larvaria se evaluó con las mismas dosis descritas en el EEH, con la excepción que como control positivo se utilizó tiabendazol (TBZ). Posteriormente, las placas se incubaron por 24 h a 28 °C, transcurrido el periodo se determinó el porcentaje de mortalidad larvaria. El porcentaje de mortalidad larvaria se calculó del volumen total del pozo (5 alícuotas de 20  $\mu$ L) considerando el siguiente criterio después de 10 segundos: larvas vivas (enroscadas o con movimiento) y larvas muertas (rectas o enroscadas sin movimiento).

Se han observado problemas para lograr una buena repetitividad debido a la reversión de la parálisis larvaria (García *et al.*, 2003), por lo cual antes de la lectura las larvas L<sub>3</sub> se estimularon agregando 50  $\mu$ L de agua caliente (50 °C) a cada pocillo (Kotze *et al.*, 2004). Cada ensayo se realizó por triplicado (O'Grady y Kotze, 2004; Kotze *et al.*, 2005).

**Análisis estadístico.** Los datos obtenidos en los EEH y EML fueron analizados mediante la función Probit para determinar la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) y dosis letal máxima (DL<sub>99</sub>) utilizando el programa SAS (SAS, 1999) en base al siguiente modelo estadístico:

$$\text{Pr (Respuesta)} = C + (1-C) F (X'\beta) = C + (1-C) \Phi (b_0 + b_1 \times \log_{10} (\text{Dosis}))$$

Donde:

Pr Probabilidad de una respuesta.

C Tasa de respuesta natural (proporción de individuos que responden a la dosis cero).

$\beta$  Vector de parámetros estimados.

F Función de distribución acumulativa (Normal).

X Vector de variables explicativas.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

**Rendimiento de los extractos completos.** El mayor rendimiento se obtuvo con el extracto etanólico de *A. cepa* (**Cuadro 1**), esto puede deberse a su alto contenido en agua (90%) (Roque *et al.*, 2007). Por consiguiente, el extracto de *A. sativum* arroja un menor cantidad respecto de su contenido de humedad (70%) (**Cuadro 1**) (Benklebia, 2004). En relación a este último, el rendimiento fue mayor a lo reportado por Durán *et al.* (2007), quienes obtuvieron un 31.2% mediante un proceso de maceración en frío con etanol al 75%. A su vez, estos autores sugieren que el uso de etanol permite un rendimiento superior al obtenido con otros solventes orgánicos, en parte por la afinidad de los compuestos fenólicos y azufrados a este solvente.

En relación con, *A. ludoviciana*, los solventes más utilizados para la obtención de sus MS son el cloruro de metileno, metanol, cloroformo y hexano producto de su afinidad por los compuestos terpénicos presentes en esta planta (Ruiz *et al.*, 1993). Lee y Geissman (1970), realizaron extracciones con cloroformo de una cantidad de 8.5 kg de materia seca obteniendo un rendimiento de 2.49% (212 g). Por su parte, Ruíz *et al.* (1993), a partir de 11 kg de macerado con hexano y cloruro de metileno obtuvieron un rendimiento de 3.72% (410 g). Mientras, Anaya *et al.* (2014), utilizando 300 g de planta sometida a hidrodestilación con cloruro de metileno-metanol (1:1 v/v), obtuvieron un rendimiento de 10% (30 g). Por otro lado, Estrada *et al.* (2012), mediante maceración en frío utilizando hexano, cloruro de metileno y metanol lograron un rendimiento del 57%, 12.7% y 15.4% respectivamente.

De acuerdo a lo anterior, el rendimiento obtenido mediante maceración en frío con etanol al 96 % y extracción a 39 °C superó lo indicado en la literatura. Los valores encontrados con *A. ludoviciana* se encuentran dentro de los parámetros normales (**Cuadro 1**). La variabilidad observada en el rendimiento de los extractos puede adjudicarse al origen, temporada, proceso de recolección y partes utilizadas del material vegetal, así como a la metodología y solvente utilizado en la extracción (Makkar, 2003; Barrabí y Arece, 2013).

**Rendimiento de los extractos digeridos.** No existen reportes acerca del rendimiento de los extractos digeridos. Cabe mencionar, que el EDE fue quien presentó el mejor rendimiento (**Cuadro 1**). El resultado puede vincularse con la alta cantidad de compuestos fenólicos y terpénicos presentes en la planta, la mayoría de ellos multicíclicos o compuestos por anillos

aromáticos (López *et al.*, 2008) dificultando su degradación ruminal. Aunado a lo anterior, el efecto antibacteriano, antifúngico y antiprotozoario que posee la planta podría afectar la microflora ruminal influyendo en su digestibilidad (Závala *et al.*, 2002). Por su parte, los extractos de *A. sativum* y *A. cepa* obtuvieron un menor rendimiento producto de su capacidad para suscitar la digestión de sus compuestos (Kamra *et al.*, 2008). Esto se debe a que cerca del 30% (32.60g por cada 100 g) de materia seca de *A. sativum* se encuentra integrada por hidratos de carbonos no estructurales (fructosa, sacarosa y fructanos), similar a lo reportado en *A. cepa* quien almacena sustancias de reserva, pero en menor cantidad (5.3-6.9g por cada 100g) (García y Sánchez *et al.*, 2005). Estos productos sirven como alimento esencial en el mantenimiento y actividad de la microflora ruminal (Angulo *et al.*, 2005).

De acuerdo a, Patra *et al.* (2006, 2010), los metabolitos extraídos en etanol y metanol a partir del *A. sativum* y *A. cepa* parecen no afectar la fermentación ruminal, ambos estudios concuerdan con el aumento en el número de protozoarios. Prins (1991), menciona que los protozoarios son importantes en la digestión de carbohidratos no estructurales, intervienen en el fraccionamiento físico del alimento y juegan un papel importante como reguladores del pH ruminal, favoreciendo la digestión y acción de otros microorganismos (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1.** Rendimiento de los extractos etanólicos crudos y digeridos por gramo de materia fresca.

| Muestra vegetal       | Extracto completo | Extracto digerido |
|-----------------------|-------------------|-------------------|
|                       | Rendimiento (%)   | Rendimiento (%)   |
| <i>A. sativum</i>     | 31.98             | 3.60              |
| <i>A. cepa</i>        | 43.95             | 5.50              |
| <i>A. ludoviciana</i> | 9.49              | 6.50              |

**Ensayo de eclosión de huevos.** El análisis Probit en los EEH con *H. contortus* mostró una tasa de mortalidad natural (C) del 7 al 23 % (primer ensayo, 20-23%; segundo ensayo, 7-11% y tercer ensayo, 11-16%), mientras que en *T. colubriformis* la mortalidad fue del 15 al 68% (primer ensayo, 15-18%; segundo ensayo, 62-65% y tercer ensayo, 66-68%). Para el resto de huevos sobrevivientes (1-C), la ordenada al origen (b0) y la pendiente de la regresión (b1) se puede observar para cada uno de los extractos y por cada repetición para *H. contortus* (Cuadro 2) y *T. colubriformis* (**Cuadro 3**).

El comportamiento de ABZ frente a *H. contortus* obtuvo una DL50 de 0.02 mg/ml-1 y una DL99 de 0.39 mg/ml-1. Mientras, *T. colubriformis* no presentó tendencia sobre la eclosión (**Cuadro 3**). Los aislamientos de *H. contortus* en un estudio previo mostraron poca resistencia antihelmíntica, mientras que en el caso de *T. colubriformis* se había probado con anterioridad en la misma unidad de producción una fuerte resistencia antihelmíntica hacia albendazol, levamisol e ivermectina (González *et al.*, 2003).

La alta mortalidad natural observada en *T. colubriformis* puede estar ligada a la inmunidad de los animales utilizados como donadores, mismos que fueron expuestos a una infección previa durante dos meses, y posiblemente durante la segunda infección la respuesta inmune adquirida fue alta, por lo que la tasa de eclosión fue muy baja. Algunos autores mencionan que a medida que la edad de los animales aumenta, estos desarrollan una respuesta inmunitaria adquirida

que se caracteriza por disminuir el establecimiento de infecciones larvarias, limitando el número de parásitos adultos, reduciendo la fecundidad de las hembras y la viabilidad de los huevos (Barger, 1993; McClure, 2000; Vanimiseti, 2003).

En las evaluaciones sobre la eclosión de huevos, el ECA arrojó un efecto significativo ( $P < 0.01$ ) sobre ambas cepas, mientras que el ECC solo fue efectivo contra *T. colubriformis* (Cuadro 2 y 3). Sin embargo, Carmona (2007), comenta que los EV se transforman por interacción del medio gastrointestinal formando productos con efectos sin definir (Carmona 2007). Por su parte, Córdova (2010), menciona que los productos derivados del reordenamiento de los compuestos azufrados son muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones dependiendo de la temperatura y pH. Mientras que, Alonso (2004), expone que los compuestos azufrados al entrar en contacto con el agua originan productos con una mayor estabilidad y por consiguiente con una mejor actividad biológica. Tal y como se observó en los resultados ( $P < 0.01$ ) del EDA y EDC, quienes exhibieron concentraciones bajas en comparación con sus homólogos naturales (**Cuadro 2 y 3**) en los EEH, debido quizá a la transformación de los compuestos azufrados al momento de entrar en contacto con el líquido ruminal.

No obstante, el ECE sólo mostró un efecto significativo sobre *T. colubriformis* contrario a lo observado con *H. contortus*. Esto concuerda con, Acharya *et al.* (2014), quienes no encontraron una actividad significativa *in vitro* del extracto de *A. ludoviciana* sobre la eclosión de huevos de *H. contortus*. Cabe señalar, que los resultados con *T. colubriformis* deben ser tomados con reserva debido a la alta mortalidad natural (68%), ya que los datos pueden no ser repetibles debido a que no fueron significativas la mayoría de las pruebas (**Cuadro 3**).

Abundando al respecto, los resultados con *A. ludoviciana* tanto para los EEH y los EML deberán considerarse posteriormente. Foster *et al.* (2011), mencionan que el efecto sobre la eclosión de huevos o el desarrollo larvario podría deberse a compuestos secundarios de la planta que sobreviven al transcurso a través del aparato gastrointestinal y que interfieren con enzimas o mecanismos de sobrevivencia del parásito. Entre los metabolitos secundarios que mantienen este mecanismo se encuentran los taninos condensados (Athanasiadou *et al.*, 2001, Arece *et al.*, 2013), pero se han contemplado algunos otros metabolitos como las lactonas sesquiterpénicas (LST) (Foster *et al.*, 2011), las cuales se encuentran en alta concentración en *A. ludoviciana*. Como referente, Molan *et al.* (2003), evaluaron la actividad *in vitro* del extracto de *Cichorium intybus* sobre larvas L1 y L3 de *Dictyocaulus viviparus* usando como medio de cultivo líquido ruminal y abomasal, encontrando un efecto significativo de los taninos en el líquido ruminal, pero las LST resultaron más efectivas en contra de las L3 usando fluido abomasal, lo que indica que estos compuestos no se ven afectados por el pH del fluido. Lo cual sugiere que el ECE necesita de posteriores estudios para descartar su efecto antihelmíntico.

Existen informes de una respuesta positiva en ensayos *in vitro* para *A. sativum* como para *A. cepa* contra PGI (Iqbal *et al.*, 2001; Seleheen *et al.*, 2004; Urban, 2008; Navaneetha *et al.* 2009; Melhorn *et al.*, 2011; Reda, 2012), pero los resultados no son del todo claros en los estudios *in vivo* (Bastidas, 1969; Iqbal *et al.*, 2001; Prieto *et al.*, 2005; Burke *et al.*, 2009; Worku *et al.*, 2009; Mikail, 2010) o necesitan de una alta concentración para ejercer un efecto letal (Erol *et al.*, 2008). Tal como se observa en los resultados de la presente investigación

(cuadro 4 y 7). Aunque, una alta concentración del extracto puede causar efectos negativos sobre la microflora ruminal, interfiriendo con la digestibilidad y el aprovechamiento de nutrientes comprometiendo la salud del animal (Bodas *et al.*, 2012; Arelovich, 2013). Por lo cual es necesario evaluar previamente el efecto *in vitro* de los extractos vegetales con potencial parasitario sobre la microflora ruminal.

De esta manera, la actividad antihelmíntica de los extractos vegetales *in vivo* puede estar sujeta a la farmacocinética, biodisponibilidad y farmacodinamia de los EV (Chagas y Vieira, 2007). Lo que explicaría la variabilidad de los resultados *in vitro* con los resultados *in vivo*.

**Cuadro 2.** Evaluación del comportamiento de los extractos etanólicos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* en los bioensayos *in vitro* sobre la mortalidad de huevos de *H. contortus* a las 48 horas.

| Extracto    | Repetición 1                 |                |                  |                  | Repetición 2                 |                |                  |                    | Repetición 3                 |                |                      |                     |
|-------------|------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------------------|----------------|------------------|--------------------|------------------------------|----------------|----------------------|---------------------|
|             | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                  |                  | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                  |                    | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                      |                     |
|             | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub> | DL <sub>99</sub> | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub> | DL <sub>99</sub>   | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>     | DL <sub>99</sub>    |
| <b>ABZ</b>  |                              |                | -                | -                | **                           | *              | 0.02             | 0.39               | **                           | ns             | 6.88E <sup>-15</sup> | 0.57                |
| <b>ELr</b>  | **                           | **             | 0.14             | 0.23             | **                           | ns             | 0.10             | 0.22               | ns                           | ns             | 0.10                 | 0.13                |
| <b>EDAv</b> | ns                           | ns             | 1.23             | 1.56             | ns                           | ns             | 0.71             | 0.88               | **                           | *              | 49.82                | 3.78E <sup>4</sup>  |
| <b>ECA</b>  | **                           | **             | 32.17            | 99.14            | *                            | *              | 24.87            | 346.96             | **                           | **             | 57.34                | 143.4               |
| <b>EDA</b>  | **                           | **             | 0.06             | 0.38             | ns                           | ns             | 0.05             | 0.12               | **                           | **             | 0.13                 | 0.24                |
| <b>ECC</b>  | **                           | *              | 50.21            | 50721            | ns                           | ns             | 34.57            | 5.77E <sup>6</sup> | *                            | *              | 40.91                | 7302                |
| <b>EDC</b>  | **                           | **             | 0.05             | 0.13             | ns                           | ns             | 0.12             | 0.15               | **                           | **             | 0.30                 | 0.58                |
| <b>ECE</b>  | ns                           | ns             | 2.67             | 3.37             | **                           | **             | 3.07             | 7.42               | **                           | ns             | 3.13E <sup>6</sup>   | 1.54E <sup>17</sup> |
| <b>EDE</b>  | ns                           | **             | 0.85             | 1.96             | ns                           | **             | 0.92             | 3.21               | ns                           | ns             | 1.36                 | 1.65                |

**Cuadro 3.** Evaluación del comportamiento de los extractos etanólicos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* en los bioensayos *in vitro* sobre la mortalidad de huevos de *T. colubriformis* a las 48 horas.

| Extracto | Repetición 1                 |                |                  |                  | Repetición 2                 |                |                    |                     | Repetición 3                 |                |                    |                     |
|----------|------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------------------|----------------|--------------------|---------------------|------------------------------|----------------|--------------------|---------------------|
|          | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                  |                  | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                    |                     | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                    |                     |
|          | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub> | DL <sub>99</sub> | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>   | DL <sub>99</sub>    | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>   | DL <sub>99</sub>    |
| ABZ      |                              |                | -                | -                | **                           | ns             | 8.46E <sup>5</sup> | 9.19E <sup>19</sup> | **                           | ns             | 2.91E <sup>8</sup> | 1.11E <sup>26</sup> |
| ELr      | **                           | **             | 9.6              | 1277             | ns                           | ns             | 0.09               | 0.12                | ns                           | ns             | 0.13               | 0.15                |
| EDAv     | **                           | **             | 0.12             | 0.19             | ns                           | *              | 0.96               | 26.4                | ns                           | ns             | 53.01              | 2.08E <sup>5</sup>  |
| ECA      | ns                           | ns             | 1.41             | 1.87             | ns                           | ns             | 12.44              | 183.59              | ns                           | ns             | 115.33             | 302.42              |
| EDA      | ns                           | ns             | 39.79            | 48.64            | ns                           | ns             | 0.03               | 0.05                | **                           | **             | 0.03               | 0.18                |
| ECC      | ns                           | ns             | 0.12             | 0.15             | *                            | **             | 4.59               | 679.13              | **                           | **             | 23.9               | 71.88               |
| EDC      | **                           | **             | 32.15            | 1.08             | **                           | **             | 0.02               | 1.32                | **                           | **             | 0.15               | 0.27                |
| ECE      | ns                           | **             | 2.17             | 13.87            | ns                           | ns             | 3.83               | 5.10E <sup>4</sup>  | **                           | **             | 6.37               | 17.05               |
| EDE      | ns                           | ns             | 0.9              | 1.21             | ns                           | ns             | 0.32               | 0.40                | ns                           | ns             | 1.63               | 1.87                |

**Cuadro 4.** Promedio de los resultados significativos de los ensayos de eclosión de huevos.

| Extracto | <i>H. contortus</i>          |                      | <i>T. colubriformis</i>      |                       |
|----------|------------------------------|----------------------|------------------------------|-----------------------|
|          | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                      | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                       |
|          | DL50                         | DL99                 | DL50                         | DL99                  |
| ABZ      | 0.02*                        | 0.39*                | 1.46E <sup>8</sup> *         | 5.55E <sup>25</sup> * |
| ELr      | 0.14*                        | 0.23*                | 9.6*                         | 1277*                 |
| EDAv     | 49.82*                       | 3.78E <sup>4</sup> * | 0.54                         | 13.29                 |
| ECA      | 38.12                        | 196.5                | 43.06*                       | 1.63E <sup>2</sup> *  |
| EDA      | 0.1                          | 0.31                 | 0.03*                        | 0.18*                 |
| ECC      | 45.6                         | 29E <sup>3</sup>     | 14.24                        | 375.50                |
| EDC      | 0.18                         | 0.36                 | 10.77                        | 0.89                  |
| ECE      | 3.07*                        | 7.42*                | 4.27                         | 15.46                 |
| EDE      | 0.89                         | 2.6                  | 0.95*                        | 1.16*                 |

\*promedio no significativo basado número de repeticiones negativas.

**Ensayo de motilidad larvaria.** Los EML (**Cuadro 5 y 6**) no arrojaron efecto significativo ( $P > 0.01$ ) para algunos de los compuestos evaluados en las presentes cepas. Considerando que las concentraciones se encuentran en mg/ml<sup>-1</sup>, las dosis requeridas para inhibir la motilidad larvaria en un 50% son elevadas (**Cuadro 7**).

El comportamiento de Tiabendazol frente ambas cepas no presentó resultados significativos ( $P > 0.05$ ) (**Cuadro 5 y 6**), la tendencia sobre la resistencia de *H. contortus* a la familia de los bencimidazoles ha sido reportada con anterioridad (Saenz *et al.*, 1991; Limon y Saenz, 1997; Torres-Acosta, 2003) al igual que en *T. colubriformis* (González *et al.*, 2014).

**Cuadro 5.** Evaluación del comportamiento de los extractos etanólicos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* en los bioensayos *in vitro* sobre la mortalidad de larvas L<sub>3</sub> de *H. contortus* a las 24 horas.

| Extracto    | Repetición 1                 |                |                      |                      | Repetición 2                 |                |                      |                       | Repetición 3                 |                |                      |                      |
|-------------|------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|------------------------------|----------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|----------------------|----------------------|
|             | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                      |                      | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                      |                       | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                      |                      |
|             | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>     | DL <sub>99</sub>     | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>     | DL <sub>99</sub>      | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>     | DL <sub>99</sub>     |
| <b>TBZ</b>  | **                           | ns             | 2.99E <sup>-12</sup> | 7.68E <sup>-23</sup> | **                           | ns             | 4.07E <sup>18</sup>  | 1.34E <sup>43</sup>   | **                           | ns             | 1.14E <sup>6</sup>   | 6.85E <sup>15</sup>  |
| <b>ELr</b>  | **                           | ns             | 1.20E <sup>13</sup>  | 4.65E <sup>30</sup>  | **                           | ns             | 1.85E <sup>5</sup>   | 2.27E <sup>12</sup>   | **                           | ns             | 6.31E <sup>5</sup>   | 3.54E <sup>15</sup>  |
| <b>EDAv</b> | **                           | ns             | 71.62                | 1.67E <sup>5</sup>   | ns                           | ns             | 1.05E <sup>99</sup>  | 4.21E <sup>133</sup>  | **                           | *              | 3.73                 | 77.95                |
| <b>ECA</b>  | **                           | *              | 369.6                | 2.12E <sup>4</sup>   | *                            | ns             | 2.94E <sup>3</sup>   | 3.71E <sup>5</sup>    | **                           | ns             | 1.04E <sup>9</sup>   | 1.10E <sup>21</sup>  |
| <b>EDA</b>  | **                           | ns             | 2.39E <sup>4</sup>   | 9.15E <sup>10</sup>  | **                           | *              | 75.70                | 2.01E <sup>5</sup>    | **                           | ns             | 8.89E <sup>5</sup>   | 1.47E <sup>3</sup>   |
| <b>ECC</b>  | **                           | *              | 4.58E <sup>4</sup>   | 1.05E <sup>-10</sup> | **                           | ns             | 1.98E <sup>-65</sup> | 6.30E <sup>-151</sup> | **                           | ns             | 9.55E <sup>-11</sup> | 2.52E <sup>-24</sup> |
| <b>EDC</b>  | **                           | ns             | 1.93E <sup>13</sup>  | 2.19E <sup>30</sup>  | **                           | ns             | 6.51E <sup>-4</sup>  | 5.36E <sup>11</sup>   | **                           | ns             | 2.06E <sup>3</sup>   | 3.57E <sup>13</sup>  |
| <b>ECE</b>  | **                           | **             | 1.61E <sup>3</sup>   | 5.81E <sup>7</sup>   | **                           | **             | 5.84                 | 132.23                | **                           | *              | 11.83                | 1.69E <sup>3</sup>   |
| <b>EDE</b>  | **                           | ns             | 2.71E <sup>-22</sup> | 7.06E <sup>-46</sup> | **                           | ns             | 2.35E <sup>8</sup>   | 3.71E <sup>19</sup>   | **                           | **             | 1.27E <sup>3</sup>   | 1.10E <sup>6</sup>   |

**Cuadro 6.** Evaluación del comportamiento de los extractos etanólicos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana* en los bioensayos *in vitro* sobre la mortalidad de larvas L<sub>3</sub> de *T. colubriformis* a las 24 horas.

| Extracto    | Repetición 1                 |                |                      |                       | Repetición 2                 |                |                    |                      | Repetición 3                 |                |                     |                      |
|-------------|------------------------------|----------------|----------------------|-----------------------|------------------------------|----------------|--------------------|----------------------|------------------------------|----------------|---------------------|----------------------|
|             | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                      |                       | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                    |                      | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                |                     |                      |
|             | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>     | DL <sub>99</sub>      | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>   | DL <sub>99</sub>     | b <sub>0</sub>               | b <sub>1</sub> | DL <sub>50</sub>    | DL <sub>99</sub>     |
| <b>TBZ</b>  | **                           | ns             | 2.01E <sup>-11</sup> | 6.63E <sup>-24</sup>  | **                           | ns             | 34860              | 2.32E <sup>13</sup>  | ns                           | **             | 0.45                | 5.98                 |
| <b>ELr</b>  | **                           | **             | 4.6E <sup>-176</sup> | 4.07E <sup>-242</sup> | *                            | ns             | 3.9E <sup>-8</sup> | 1.10E <sup>-11</sup> | **                           | ns             | 1.03E <sup>70</sup> | 2.68E <sup>152</sup> |
| <b>EDAv</b> | **                           | ns             | 9.07E <sup>5</sup>   | 6.79E <sup>14</sup>   | ns                           | ns             | 1.29               | 1.68                 | **                           | **             | 3.29                | 45.8                 |
| <b>ECA</b>  | **                           | ns             | 1.93E <sup>37</sup>  | 1.05E <sup>89</sup>   | **                           | ns             | 1.05E <sup>8</sup> | 1.60E <sup>19</sup>  | **                           | ns             | 7.67E <sup>47</sup> | 5.54E <sup>18</sup>  |
| <b>EDA</b>  | ns                           | ns             | 3.09                 | 9.42                  | **                           | ns             | 1457               | 2.73E <sup>8</sup>   | **                           | *              | 137.91              | 262451               |
| <b>ECC</b>  | **                           | ns             | 3.16E <sup>-8</sup>  | 2.26E <sup>-23</sup>  | **                           | ns             | 9.7E <sup>18</sup> | 7.77E <sup>38</sup>  | ns                           | ns             | 146.44              | 199.99               |
| <b>EDC</b>  | **                           | ns             | 64.01                | 2.35E <sup>4</sup>    | **                           | ns             | 25523              | 7.31E <sup>12</sup>  | **                           | ns             | 102.32              | 85309                |
| <b>ECE</b>  | **                           | **             | 9.97                 | 39.40                 | **                           | ns             | 57521              | 1.89E <sup>11</sup>  | **                           | *              | 36.68               | 2.49E <sup>3</sup>   |
| <b>EDE</b>  | ns                           | ns             | 17.79                | 54.24                 | **                           | ns             | 4422               | 4.19E <sup>10</sup>  | **                           | ns             | 4.61E <sup>14</sup> | 9.60E <sup>33</sup>  |

**Cuadro 7.** Promedio de los resultados significativos en los ensayos de motilidad larvaria.

| Extracto    | <i>H. contortus</i>          |                       | <i>T. colubriformis</i>      |                        |
|-------------|------------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------|
|             | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                       | Dosis (mg/ml <sup>-1</sup> ) |                        |
|             | DL50                         | DL99                  | DL50                         | DL99                   |
| <b>TBZ</b>  | 1.36E18*                     | 4.47E <sup>42</sup> * | 0.45                         | 5.98                   |
| <b>ELr</b>  | 4E <sup>12</sup> *           | 1.55E <sup>30</sup> * | 4.6E <sup>-176</sup>         | 4.07E <sup>-242</sup>  |
| <b>EDAv</b> | 3.73                         | 77.95                 | 3.29                         | 45.8                   |
| <b>ECA</b>  | 369.6                        | 2.12E <sup>4</sup>    | 2.56E <sup>47</sup> *        | -3.50E <sup>88</sup> * |
| <b>EDA</b>  | 75.7                         | 2.01E <sup>5</sup>    | 137.91                       | 2.62E <sup>5</sup>     |
| <b>ECC</b>  | 4.58E <sup>4</sup>           | 1.05E <sup>-10</sup>  | 3.24E <sup>17</sup> *        | 2.59E <sup>38</sup> *  |
| <b>EDC</b>  | 6.43E <sup>12</sup> *        | 7.30E <sup>29</sup> * | -8.56E <sup>3</sup> *        | 2.44E <sup>12</sup> *  |
| <b>ECE</b>  | 5.43                         | 1.95E <sup>7</sup>    | 23.33                        | 1.26E3                 |
| <b>EDE</b>  | 1.27E <sup>3</sup>           | 1.10E <sup>6</sup>    | 1.54E <sup>14</sup> *        | -3.2E <sup>33</sup> *  |

\*promedio no significativo basado número de repeticiones negativas.

Aun cuando estos resultados *in vitro* resultan interesantes, es difícil su comparación en sistemas *in vivo*, debido a las diferencias físico-químicas que no pueden ser replicadas en laboratorio. Por lo cual, se hace necesario estandarizar una metodología que permita vincular el comportamiento de los productos vegetales *in vitro* con los resultados *in vivo*.

## CONCLUSIÓN

Las plantas evaluadas se eligieron debido a reportes etnobotánicos y científicos sobre su actividad antihelmíntica. Los extractos completos y digeridos de *A. sativum* y *A. cepa* presentaron una tendencia significativa en la eclosión de huevos para ambas cepas. Sin embargo, los extractos digeridos mostraron un mejor comportamiento a menor concentración en los ensayos de eclosión de huevos. Ninguno de los extractos evaluados mostró actividad en los ensayos de motilidad larvaria para *H. contortus* y *T. colubriformis*.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada al estudiante de maestría Angel Iván Huerta Melgarejo para la realización de esta investigación.

## LITERATURA CITADA

- Acharya, J., Hildreth, M. B., y Neil, R. R. (2014). *In vitro* screening of forty medicinal plant extracts from the United States Northern Great Plains for anthelmintic activity. *Veterinary Parasitology*, 201(1-2):75-81.
- Alonso, J. R. 2004. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. Corpus, Buenos Aires, Argentina. 905-911 pp.

- Anaya, E. G. D., Rivero, C. I., Rivera, C. J., y Mata, R. (2014). Hypoglycemic properties of some preparations and compounds from *Artemisia ludoviciana* Nutt. *Journal of Ethnopharmacology*, 155(1):416-425.
- Angulo, F. 2005. Nematodosis gastrointestinales. En: Manual de ganadería doble propósito, Ed. Astro-Data. Venezuela, Maracaibo. 337-383 pp.
- Arece, J., Roche, Y., López, Y., y Molina, M. (2012). Efecto *in vitro* del extracto acuoso de *Dichrostachys cinerea* (L.) Wight & Arn. en el desarrollo de las fases exógenas de strongílidos gastrointestinales de ovinos. *Pastos y Forrajes*, 35(3):301-309.
- Arelovich, H. M. (2013). Elementos minerales. Su impacto en la fermentación rumina. *Revista argentina de producción animal*, 28(3):235-253.
- Athanasiadou, S., Kyriazakis, I., Jackson, F., y Coop, R. L. (2001). Direct anthelmintic effects of condensed tannins towards different gastrointestinal nematodes of sheep: *in vitro* and *in vivo* studies. *Veterinary Parasitology*, 99(3):205-219.
- Athanasiadou, S., y Kyriazakis, I. (2004). Plant secondary metabolites: antiparasitic effects and their role in ruminant production systems. *Proceedings of the Nutrition Society*, 63(04):631-639.
- Barger, I. A. (1993). Influence of sex and reproductive status on susceptibility of ruminants to nematode parasitism. *International Journal of Parasitology*, 23(4):463-469.
- Barrabí-Puerta, M., y Arece-García, J. (2013). Actividad antihelmíntica *in vitro* de extracto acuoso de hojas y semillas de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). I. Inhibición de la eclosión de huevos y del desarrollo larvario. *Revista de Salud Animal*, 35(2):103-108.
- Bastidas, G. J. (1969). Effect of ingested garlic on *Necator americanus* and *Ancylostoma caninum*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 18(6): 920-923.
- Benkeblia, N. (2004). Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *LWT-Food Science and Technology*, 37(2):263-268.
- Bodas, R., Prieto, N., García-González, R., Andrés, S., Giráldez, F. J., y López, S. (2012). Manipulation of rumen fermentation and methane production with plant secondary metabolites. *Animal Feed Science and Technology*, 176(1):78-93.
- Botura, M. B., dos Santos, J. D. G., da Silva, G. D., de Lima, H. G., de Oliveira, J. V. A., de Almeida, M. A. O., y Branco, A. (2013). *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr.(sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. *Veterinary Parasitology*, 192(1):211-217.
- Burke, J. M., Wells, A., Casey, P., y Kaplan, R. M. (2009b). Herbal dewormer fails to control gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 160(1):168-170.
- Burke, J. M., Wells, A., Casey, P., y Miller, J. E. (2009a). Garlic and papaya lack control over gastrointestinal nematodes in goats and lambs. *Veterinary Parasitology*, 159(2):171-174.
- Chagas, A. C. de S., y Vieira, L. de S. (2007). *Azadirachta indica* (Neem) action in goats gastrointestinal nematodes. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 44:49-55.
- Córdova B. M de A. 2010. Extracción y purificación de la alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca, México. pp. 5-13.
- Durán, M. A., Gonzales, P. A. y Cardona, L. (2007). Obtención y caracterización de la oleoresina del ajo (*Allium sativum*). *Scientia et Technica*, 1(37).

- Erol, A., Idris, T., Abdurrahman, G., y Orhan. Y. (2008). Evaluation of the anthelmintic activity of garlic (*Allium sativum*) in mice naturally infected with *Aspicularis tetrapte*. *Recent Patent Anti-Infective Drug Discovery*, 3(2):149-152.
- Estrada, S. S., Sánchez, R. A., Navarrete, V. G., Castillo, E. P., Villalobos, M. R. y Ibarra, B. M. (2012). Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rats smooth muscle tissues. *Journal of Ethnopharmacology*, 139(2):513-518.
- Foster, J. G., Cassida, K. A., y Turner, K. E. (2011). *In vitro* analysis of the anthelmintic activity of forage chicory (*Cichorium intybus* L.) sesquiterpene lactones against a predominantly *Haemonchus contortus* egg population. *Veterinary parasitology*, 180(3): 298-306.
- García, E. (1988). Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 217 pp.
- García, G. J. J., y Sánchez, M. F. J. (2005). Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *ALAN*, 50(3).
- García, J. P., Sánchez, M. A. A. y Vázquez, F. A. R. 2003. Resistencia a antihelmínticos en rumiantes: Métodos de diagnóstico y situación en España. *MG Mundo Ganadero* 14(156):36-43.
- Geurden, T., Hoste, H., Jacquiet, P., Traversa, D., Sotiraki, S., di Regalbono, A. F., Tzanidakis, N., Kostopouloud, D., Gaillac, C., Privat, S., Giangaspero, A., Zanardello, C., Noé, L., Vanimisetti, B., y Bartram, D. (2014). Anthelmintic resistance and multidrug resistance in sheep gastro-intestinal nematodes in France, Greece and Italy. *Veterinary Parasitology*, 201(1):59-66.
- González, G. R., Cordero, O. J. C., Torres, H. G., Arece, G. J. y Mendoza, de G. P. 2010. (2010). Efecto del hipoclorito de sodio y extracto de cítricos en la reducción de la infestación con nematodos gastrointestinales resistentes a antihelmínticos en ovinos de pelo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 1(2):179-187.
- González, G. R., López, A. M. E., Ojeda, R. N., Liéban, H. E. y Mendoza, de G. P. (2014). Diagnóstico *in vitro* y en campo de resistencia antihelmíntica en nematodos gastrointestinales de pequeños rumiantes. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 46(3):399-405.
- González, G. R., Torres, H. G., Nuncio, O. M. G. J., Cuéllar, O. J. A., y Zermeño, G. M. E. (2003). Detección de eficiencia antihelmíntica en nematodos de ovinos de pelo con la prueba de reducción de huevos en heces. *Livestock Research for Rural Development*, 87-99.
- Greer, A. W. (2008). Trade-offs and benefits: implications of promoting a strong immunity to gastrointestinal parasites in sheep. *Parasite immunology*, 30(2):123-132.
- Guamán, M. 2012. Determinación de la composición química, propiedades físicas y actividad biológica del aceite esencial de *Gnaphalium elegans* (*Asteraceae*) de la provincia de Loja. Tesis de Licenciatura. Escuela de bioquímica y farmacia. Universidad Técnica Particular de Loja. Ecuador. 37 pp.
- Hernández, M. M., Pérez, C., Bolio, G. I., De la Cruz, P., Pérez, M., y Hernández, G. I. (2014). Alternativas fitoterapéuticas para el control de parásitos de animales de pequeños productores. *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal AICA*, 4:292-293.
- Hernández-Orduño, G., Torres-Acosta, J. F. J., Sandoval-Castro, C. A., Aguilar-Caballero, A. J., Reyes-Ramírez, R. R., Hoste, H., y Calderón-Quintana, J.A. 2008. (2008). *In vitro* anthelmintic effect of *Acacia gauderi*, *Havardia albicans* and Quebracho tannin

- extracts on a mexican strain of *Haemonchus contortus* L3 larvae. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 8(2):191-197.
- Iqbal, Z., Lateef, M., Ashraf, M. y Jabbar, A. (2004). Anthelmintic activity of *Artemisia brevifolia* in sheep. *Journal of Ethnopharmacology*, 93(2): 265-268.
- Iqbal, Z., Nadeem, Q. K., Khan, M. N., Akhtar, M. S., y Waraich, F. N. (2001). *In vitro* anthelmintic activity of *Allium sativum*, *Zingiber officinale*, *Curcubita mexicana* and *Ficus religiosa*. *International Journal of Agriculture and Biology*, 3(4):454-457.
- Jabbar, A., Iqbal, Z., Kerboeuf, D., Muhammad, G., Khan, M. N. y Afaq, M. (2006). Anthelmintic resistance: the state of play revisited. *Life sciences*, 79(26): 2413-2431.
- Kamarai, C. y Abdul, R.A. (2011). Efficacy of antihelmintic properties of medicinal plant extracts against *Haemonchus contortus*. *Research in Veterinary Science*, 91(3): 400-404.
- Kamra, D. N., Patra, A. K., Chatterjee, P. N., Kumar, R., Agarwal, N., y Chaudhary, L. C. (2008). Effect of plant extracts on methanogenesis and microbial profile of the rumen of buffalo: a brief overview. *Animal Production Science*, 48(2):175-178.
- Knox, M. R., Torres-Acosta, J. F. J., y Aguilar-Caballero, A. J. (2006). Exploiting the effect of dietary supplementation of small ruminants on resilience and resistance against gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 139(4): 385-393.
- Kotze, A. C., Clifford, S., O'Grady, J., Behnke, J. M. y McCarthy, J. S. (2004). An *in vitro* larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and strongylides species. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 71(5): 608-616.
- Kotzea, A. C., Colemanb, G. T., Maic, A. y McCarthyd, J. S. (2005). Field evaluation of anthelmintic drug sensitivity using *in vitro* egg hatch and larval motility assays with *Necator americanus* recovered from human clinical isolates. *International Journal for Parasitology*, 35(4):445-453.
- Limon, N. E., y Saenz, F. M. A. (1997). Efectividad en ovinos del albendazol y oxfendazol administrados solos o combinados contra nematodos resistentes y susceptibles al tiabendazol. *Técnica Pecuaria México*, 35(1).
- Lopes-Lutz, D., Alviano, D. S., Alviano, C. S., y Kolodziejczyk, P. P. (2008). Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. *Phytochemistry*, 69(8):1732-1738.
- Makkar, H. P. S. (2003). Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds. *Small Ruminant Research*, 49(3):241-256.
- Marie-Magdeleine, C., Hoste, H., Mahieu, M., Varo, H., y Archimede, H. (2010). *In vitro* effects of Cucurbitamoschata seed extracts on *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*, 161(1):99-105.
- Mauricio, R. M. 1999. Comparison of bovine rumen liquor and bovine faeces as inoculum for an *in vitro* gas production technique for evaluating forage. Tesis de doctorado. The University of Reading, Reading, UK. 281 pp.
- McClure, S. 2000. Sheep immunity to gastrointestinal nematode parasite- Review 2000. CSIRO Mac master laboratory. Armidale, Australia. 14 pp.
- McVaugh, R. (1984). Flora Novo-Galiciana. A descriptive account of the vascular plants of Western Mexico. "Compositae" (Vol. 12). University of Michigan Herbarium Ann Arbor. pp. 174, 175, 374, 375, 751, 886, 887.

- Mehlhorn, H., Al-Quraishy, S., Al-Rasheid, K. A., Jatzlau, A., y Abdel-Ghaffar, F. (2011). Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections. *Parasitology Research*, 108(4):1041-1046.
- Mikail, H.G. (2010). Phytochemical screening, elemental analysis and acute toxicity of aqueous extract of *Allium sativum* L. bulbs in experimental rabbits. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(4): 322-326.
- Molan, A. L., Duncan, A. J., Barry, T. N., y McNabb, W. C. (2003). Effects of condensed tannins and crude sesquiterpene lactones extracted from chicory on the motility of larvae of deer lungworm and gastrointestinal nematodes. *Parasitology International*, 52(3):209-218.
- Molento, M. B. (2009). Parasite control in the age of drug resistance and changing agricultural practices. *Veterinary Parasitology*, 163(3):229-234.
- Navaneetha, L. K., y Veerakumari, L. (2009). Effect of *Allium sativum* on the phosphoenolpyruvate carboxykinase and pyruvate kinase activity of *Haemonchus contortus* *in vitro*. *Pharmacognosy Magazine*, 5(20):430-432.
- O'Grady, J., y Kotze, A.C. (2004). *Haemonchus Contortus*: *in vitro* drug screening assays with the adult life stage. *Experimental Parasitology*, 106(3):164-172.
- Ojeda-Robertos, N. F., de Jesus Torres-Acosta, J. F., Aguilar-Caballero, A. J., Ayala-Burgos, A., Cob-Galera, L. A., Sandoval-Castro, C. A... y de Gives, P. M. (2008). Assessing the efficacy of *Duddingtonia flagrans* chlamydospores per gram of faeces to control *Haemonchus contortus* larvae. *Veterinary Parasitology*, 158(4):329-355.
- Ortuño, S. M. F. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Aiyane. Vol. 276. España. 96 pp.
- Osuna-Torres, L., Tapia-Pérez, M. E., Aguilar-Contreras, A. (2005). Plantas medicinales de la medicina tradicional mexicana para tratar afecciones gastrointestinales: Estudio etnobotánico, fitoquímico y farmacológico. Ed. Universidad de Barcelona, España. pp. 40-60.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., y Agarwal, N. (2006). Effect of spices on rumen fermentation, methanogenesis and protozoa counts *in vitro* gas production test. *International Congress Series*, 1293:176-179.
- Patra, A. K., Kamra, D. N., y Agarwal, N. (2010). Effects of extracts of spice on rumen methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feeds *in vitro*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(3):511-520.
- Posada, S. L., y Noguera, R. R. (2005). Técnica *in vitro* de producción de gases: Una herramienta para la evaluación de alimentos para rumiantes. *Archive for Rural Development*, 17(4).
- Prieto, A., Auro de O.A., Fernández, A., y Pérez, M.B. (2005). El empleo de medicina natural en el control de enfermedades de organismos acuáticos y potencialidades de uso en Cuba y México. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 8(1):38-49.
- Prins, R. A. 1991. The rumen ciliates and their functions. Rumen microbial metabolism and ruminant digestion. INRA Editions. Paris, Cedex. pp. 39-52.
- Reda, G. M. (2012). Efficacy of *Allium sativum* (garlic) against experimental cryptosporiosis. *Alexandria Journal of Medicine*, 48(1): 59-66.
- Roque, A. C., Gordillo, P. I. M., Díaz, E. J. B., Nájera, O. A. A., Gómez, Y. y Villicaña, M. (2007). Alternativa alimentaria para aumentar el consumo de cebolla (*Allium cepa*) en el estado de Chiapas. *Lacandonia* 1(1):77-82.

- Ruíz, C. A., Cano, E. A., y Delgado, G. (1993). Sesquiterpene lactones and flavonoids from *Artemisia ludoviciana* ssp. Mexicana. *Phytochemistry*, 33(5):1113-1115.
- Sáenz, M., Campos, R., Ibarra, G., Zapata, M., y Lizárraga, G. (1991). Diagnóstico *in vitro* de una población de *Haemonchus contortus* de caprino resistente al thiabendazo. *Técnica Pecuaria en Mexico*, 29(3):1-5.
- Saleheen, D., Atif, A. S., y Masoon, Y. M. (2004). Antileishmanial activity of aqueous onion extract. *Fitoterapia*, 75: 9-13.
- Statistical Analysis System (SAS), 1991. Institute Inc. Cary.SAS/STAT. Guide for Personal Computers. Version 6.03, Cary, NC, USA.
- Tariq, K. A., Chishti, M. Z., Ahmad, F., y Shawl, A. S. (2009). Anthelmintic activity of extracts of *Artemisia absinthium* against ovine nematodes. *Veterinary Parasitology*, 160(1):83-88.
- Theodorou, M. K., Williams, B. A., Dhanoa, M. S., McAllan, A. B., y France, J. (1994). A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal feed science and technology*, 48(3):185-197.
- Thienpont, D., Rochette, F., y Vanparijs, O. F. J. (1986). Diagnóstico de las helmintiasis por medio del examen coprológico. (J. R. Foundation., Ed.). Beerse, Bélgica.
- Torres-Acosta, J. F. J., Villarroel-Álvarez, M. S., Rodríguez-Arévalo, F., Gutiérrez-Segura, I., y Alonso-Díaz, M. A. (2003). Diagnóstico de nematodos gastrointestinales resistentes a bencimidazoles e imidazotiazoles en un rebaño caprino de Yucatán, México. *Revista Biomedica*, 14(2):75-81.
- Torres-Acosta, J. F. J., y Hoste, H. (2008). Alternative or improved methods to limit gastrointestinal parasitism in grazing sheep and goats. *Small Ruminant Research*, 77(2):159-173.
- Urban, J., Kokoska, L., Langrova, I., y Matejkova, J. (2008). *In vitro* anthelmintic effects of medicinal plants used in Czech Republic. *Pharmaceutical Biology*, 46(10-11):808-813.
- Valdez, E. 2006. Estudios observacionales de las parasitosis gastrointestinales en ovinos y caprinos del municipio de Tiquicheo, Michoacán. Tesis de Licenciatura. Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo. México. 31 pp.
- Vanimisetti, H. B. 2003. Genetics of resistance to *Haemonchus contortus* infections in sheep. Thesis Master of Science, Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia. pp. 1-73.
- Veerakumari, L., y Lakshmi, K. N . (2006). *In vitro* effect of *Allium sativum* on lactate dehydrogenase activity of *Haemonchus contortus*. *Journal of Veterinary Parasitology*, 20(1): 93-96.
- Vercruyse, J., Schetters, T. P. M., Knox, D. P., y Claerebout, E. (2014). Control of parasitic disease using vaccines: an answer t drug resistance? *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties*, 26(1):105-115.
- Wawrzkievicz, M. y Danelón, J. L. (2004). Mejoramiento de la técnica de producción de gas *in vitro* para evaluar alimentos para rumiantes. Nuevo recipiente de incubación. *Revista Argentina de Producción Animal*, 24(3-4):187-197.
- Worku, M., Franco, R., y Baldwin, K. (2009). Efficacy of garlic as an anthelmintic in adult Boer goats. *Archives of Biological Sciences Belgrade*, 61(1): 135-140.
- Závala, S. M. A., Pérez, G. S., Pérez, G. C., Sánchez, S. D. y Arias, G. L. (2002). Antidiarreal activity of pentanal, an Aldehyde Isolated from *Artemisia ludoviciana*. *Pharmaceutical Biology*, 404: 263-268.

Zhu, L., J. L. Dai, L. Yang y J. Qiu. 2013. *In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Veterinary Parasitology*, 195(1):112-117.

---

## 6. DISCUSIÓN GENERAL

### 6.1. Efecto de los extractos completos sobre la microflora ruminal

Encontrar alternativas terapéuticas para el control de parásitos gastrointestinales en rumiantes ha llevado a evaluar diversos extractos vegetales *in vitro*, generalizando sus efectos antes de ser validados *in vivo* (Athanasiadou y Kyriazakis 2004) independientemente del efecto negativo que estos pudiesen tener sobre la microflora ruminal.

La digestión fermentativa en el rumen provee de células microbianas, las cuales suministran de proteína (P) al animal y ácidos grasos volátiles (AGV). Los protozoarios, bacterias y hongos existentes en el rumen-retículo son responsables de la digestión de la mayoría de los nutrientes (Leng *et al.* 1995). El tipo de dieta, el nivel energético y nitrogenado de la ración influyen en la concentración y composición de la fauna ruminal a través de la acción directa o indirecta sobre el pH y la tasa de pasaje del contenido ruminal (Cerreño *et al.* 2013). Por lo tanto, la optimización de la producción en el rumiante requiere el mantenimiento de las condiciones adecuadas del medio ruminal que garanticen su equilibrio y funcionamiento (Leng *et al.* 1995).

En el caso de los extractos probados en esta investigación, su efecto sobre la Pgas, la cual, permite predecir la digestibilidad de los alimentos por acción de la microflora ruminal mediante la Pgas originada por la cinética de fermentación del alimento (Posada y Noguera, 2005).

Al parecer el extracto completo de *A. sativum* favorece la Pgas a medida que aumenta el nivel de inclusión, esto puede deberse a que cerca del 30% de materia fresca (32.60g por cada 100g) se encuentra integrada por hidratos de carbonos no estructurales (fructosa, sacarosa y fructanos), algo similar sucede con *A. cepa* quien almacena sustancias de reserva pero en menor cantidad (5.3-6.9g por cada 100g) (García y Sánchez *et al.* 2005). Esto podría reducir su disponibilidad como alimento en el mantenimiento y actividad de la microflora ruminal (Angulo *et al.* 2005). Kamra *et al.* (2006, 2008), mencionan que el extracto de *A. sativum*

favorece la actividad de los microorganismos ruminales sin afectar las enzimas que degradan la fibra y materia seca de los alimentos.

De acuerdo a, Patra *et al.* (2006, 2010), los metabolitos extraídos de *A. sativum* y *A. cepa* parecen no afectar la fermentación ruminal, ambos estudios concuerdan con el aumento en el número de protozoarios. Prins (1991), menciona que los protozoarios son importantes en la digestión de carbohidratos no estructurales, intervienen en el fraccionamiento físico del alimento y juegan un papel importante como reguladores del pH ruminal, favoreciendo la digestión y acción de otros microorganismos.

Sin embargo, el EC de *A. cepa* exhibió una disminución en la Pgas a medida que se incremento el nivel de inclusión, lo mismo se apreció con el EC de *A. ludoviciana*. A pesar de que la mayoría de los compuestos que ingresan al rumen son metabolizados y convertidos en nutrientes, la reducción en la digestibilidad de estos extractos puede deberse a que existen otros compuestos antinutricionales que por acción directa o a través de sus MS pueden ocasionar diversos efectos sobre la fermentación y salud animal (Roige y Tapia 1996).

Por un lado, puede deberse al efecto bactericida, fungicida y protozoaricida que poseen los EC (Benkeblia 2004, Anthony *et al.* 2005). Tal como lo sugiere, Patra y Saxena (2010), quienes mencionan que los compuestos orgánicos de azufre y flavonoides presentes en *A. cepa* parecen tener efectos directos en contra de los protozoarios metanógenos, lo cual puede interferir con la función de otros microorganismos.

En el caso de *A. ludoviciana* no existen estudios detallados de su efecto sobre la microflora ruminal, sin embargo su baja digestibilidad y disminución en la Pgas puede deberse a su alta concentración en compuestos fenólicos y terpénicos, los cuales poseen efectos bactericidas, fungicidas y protozoaricidas (Závala *et al.* 2002, Calzada *et al.* 2006), o bien a que la mayoría de estos compuestos están formados por anillos aromáticos, lo cual dificultaría su degradación (Lopes *et al.* 2008).

Aunque en la mayoría de los casos los compuestos activos en los EV no han sido plenamente identificados, enzimas vegetales tales como proteasas de cisteína o MS como alcaloides,

glucósidos y taninos han demostrado propiedades antiparasitarias dosis-dependientes (Ayas *et al.* 2008). Algunos otros compuestos activos como las saponinas, taninos, glucósidos cianogénicos, oxalatos, cumarinas y LST propias de algunas plantas como es el caso de *A. ludoviciana* pueden tener efectos anti nutricionales disminuyendo la ingesta de alimento, inhibiendo la fermentación ruminal y la síntesis de proteína microbiana (Pesoa 2001).

No obstante, la microflora ruminal tiene la capacidad de adaptarse en forma gradual a la ingestión prolongada de ciertos compuestos, permitiéndole al animal adquirir mayor tolerancia a diversos MS (Mcsweeney *et al.* 1999). Por otro lado, le permite biotransformar diferentes MS dando origen a sustancias intermedias o finales que son absorbidas por el tracto gastrointestinal (Roige y Tapia 1996). El efecto que estos compuestos puedan ejercer sobre el propio rumen o el animal dependerá del nivel de consumo, del tipo de metabolitos producidos y de la absorción de los mismos (Carmona 2007). Por tal motivo, resulta indispensable evaluar previamente el efecto de los EV con potencial antiparasitario sobre la microflora ruminal *in vitro* antes de generalizar sus efectos *in vivo*.

## 6.2. Mecanismo de acción antihelmíntica de los extractos vegetales

La infección por parásitos gastrointestinales en rumiantes representa un problema para la ovinocultura (Moreno *et al.* 2010). En las últimas décadas su control se ha basado en el uso exclusivo de productos químicos, esto ha favorecido el creciente desarrollo en la resistencia parasitaria con lo que se han incrementado los problemas sanitarios y productivos de los animales (Geurden *et al.* 2014).

Actualmente el concepto de inocuidad ha tomado importancia, por lo que es necesario disminuir los residuos de medicamentos en los productos de origen animal y promover la protección ambiental (Molento 2009).

Esto ha llevado a la búsqueda de métodos alternativos para el control parasitario, resaltando el uso de plantas y EV. Entre las plantas con indicios etnobotánicos para el tratamiento de PGI se encuentran *Allium sativum* y *Allium cepa* (Osuna *et al.* 2005). Sin embargo, los resultados

científicos no han aportado pruebas definitivas en su actividad biológica. Por su parte, para *A. ludoviciana* no hay suficiente información que respalde su eficacia AH (Acharya *et al.* 2014). Aunque se han reportado efectos satisfactorios en protozoarios (Said *et al.* 2005, Calzada *et al.* 2006, Calzada *et al.* 2007). Sin embargo, plantas pertenecientes al mismo género han resultado de gran interés por sus efectos positivos sobre nemátodos gastrointestinales (Iqbal *et al.* 2004; Tariq *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2013).

La evaluación *in vitro* de los EV con posible actividad antiparasitaria ha demostrado ser una estrategia preliminar previo a su aplicación *in vivo*, debido a que los EV están en contacto directo con los huevos o parásitos. Esto permite ahorrar tiempo, disminuir costos y minimizar el uso de animales (Geary *et al.* 1999, Athanasiadou y Kyriazakis 2004). No obstante, la supuesta actividad antiparasitaria de los EV ha sido causa de controversia a pesar del conocimiento de sus propiedades profilácticas y terapéuticas ya que no existe una correlación significativa entre los estudios *in vitro* e *in vivo* como lo muestran los estudios de RAH a las drogas sintéticas (Moreno *et al.* 2010). En un estudio realizado por Costa *et al.* (2008), observaron que al utilizar el extracto de etanol y acetato de etilo a dosis de 50 mg/mL de partes aéreas de *Azadirachta indica* sobre *H. contortus* se reducía su desarrollo en 68.1% y 87.1% respectivamente. Por el contrario, las evaluaciones *in vivo* de ovinos infectados con *H. contortus* y *T. colubriformis* que recibieron dosis de 3 mg/kg de peso corporal de un extracto etanólico acuoso (70%, v/v) de las semillas de *Azadirachta indica* redujeron en un 5.3% el conteo hpg, pero no hubo un efecto en el conteo de GA al decimo tercer día post-tratamiento (Hördegen *et al.* 2003).

La discrepancia en los resultados podría atribuirse a diversos factores tal como el origen del material vegetal; ya que los constituyentes químicos pueden variar entre plantas de la misma especie, género y región debido a diferencias genéticas y medioambientales, estado fenológico, partes de la planta empleadas para los estudios y almacenamiento. Por otra parte, esta la metodología y el solvente empleado para la extracción, y finalmente uno de los puntos con mayor importancia para los estudios *in vivo* lo encontramos en la farmacocinética, biodisponibilidad y farmacodinamia de los EV (Makkar 2003, Chagas y Vieira 2007).

Un punto a considerar al momento de establecer una relación de los resultados *in vitro* con los resultados *in vivo*, sería la transformación de los EV en diferentes compuestos producto de la degradación digestiva del huésped, dando origen a sustancias intermedias o finales (Roige y Tapia 1996). El efecto que estos puedan ejercer sobre el huésped o el sistema gastrointestinal dependerá de la parte de la planta o tipo de extracto consumido, del nivel de consumo, del tipo de metabolitos producidos por la digestión y del nivel de absorción de los mismos (Carmona 2007).

Si se contextualiza el efecto de los extractos sobre los parásitos gastrointestinales dentro del huésped, paralelamente se deberán contemplar varias hipótesis:

### **1) El efecto directo de los extractos completos sobre los parásitos.**

Se ha vislumbrado informes de una respuesta por parte de los extractos de *A. sativum* (Iqbal *et al.* 2001, Urban 2008, Navaneetha *et al.* 2009, Mehlhorn *et al.* 2011) y *A. cepa* (Seleheen *et al.* 2004, Mehlhorn *et al.* 2011, Reda 2012) en ensayos parasitarios *in vitro*. Sin embargo, estos no han sido del todo satisfactorios *in vivo* (Bastidas 1969, Iqbal *et al.* 2001, Prieto *et al.* 2005, Burke *et al.* 2009, Worku *et al.* 2009, Mikail 2010). Erol *et al.* (2008), mencionan que para los estudios *in vivo* a veces se necesita de concentraciones altas para ejercer un efecto letal. Esto se pudo apreciar en los resultados para ambos ensayos con los extractos de *A. sativum*, *A. cepa* y *A. ludoviciana*. Considerando que las concentraciones se trabajaron en  $\text{mg/ml}^{-1}$ , las dosis requeridas para inhibir la motilidad larvaria en un 50% son demasiado elevadas.

### **2) El efecto de los productos derivados de la degradación de los extractos sobre algún órgano en el huésped.**

Puede ser que los EC o los productos derivados de la degradación ruminal susciten un estímulo sobre algún órgano del huésped, promoviendo con ello el desalojo del parásito. Calzada *et al.* (2010), encontraron una actividad leve a moderada de los extractos metanólicos de las hojas de *A. ludoviciana* para inducir una hiperperistalsis en ratas a una dosis de 300

mg/kg, factor que pudiese ayudar en la expulsión de los parásitos intestinales como *T. colubriformis*.

### **3) El efecto de los extractos como nutraceutico en el organismo.**

El extracto o sus derivados de la degradación actúan como nutraceutico estimulando el sistema inmunológico, promoviendo con ello una reacción de defensa a partir de la producción de especies reactivas de oxido. Reyes y Gallegos (2011), mencionan que algunas lectinas presentes en las plantas actúan como inmunomoduladores de la respuesta inmune. De acuerdo con Chittezhath y Kuttan (2006), las plantas del género *Allium* pueden comportarse como nutraceuticos promoviendo una acción inmunomoduladora de la respuesta inmune. *A. sativum* contiene tres lectinas: QR-1, QR-2 y QR-3 que estimulan la actividad fagocitaria de los macrófagos a la vez que incrementan la actividad de las células natural killer, de la interleucina-2 (IL-2), del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), así como la liberación de interferón gamma, lo cual puede afectar el establecimiento y viabilidad del parásito dentro del huésped (Gurley *et al.* 2005, Clement *et al.* 2010,).

### **4) El comportamiento de los extractos vegetales o sus derivados de la degradación dentro del huésped.**

Se ha sugerido que los EV dentro del huésped pueden actuar por dos rutas generales: En primer lugar, los extractos completos se transforman por interacción del medio gastrointestinal formando nuevos compuestos. De acuerdo con, Córdova (2010), los productos derivados del reordenamiento de los tiosulfinatos son muy reactivos y experimentan un gran número de transformaciones dependiendo de la temperatura y pH. Mientras tanto, Alonso (2004), menciona que los compuestos azufrados al entrar en contacto con el agua originan productos con una mayor actividad biológica y por consiguiente mayor estabilidad. Bien podría ser el caso de los resultados hallados con *A. sativum* y *A. cepa* quienes muestran un efecto significativo en los ensayos de eclosión de huevos con *H. contortus* y *T. colubriformis*. Esto se debe quizá a la transformación de los extractos al momento de estar en contacto con el líquido ruminal.

En segundo lugar, se ha sugerido que el efecto sobre los huevos, desarrollo y motilidad larvaria podría deberse a los compuestos que sobreviven al transcurso del aparato gastrointestinal, y que posteriormente interfieren con enzimas o mecanismos de sobrevivencia del parásito. Con respecto a los siguiente, Foster *et al.* (2011), sugieren que las LST o los productos de degradación de los extractos o forrajes pueden escapar del rumen ejerciendo alguna actividad antihelmíntica en el abomaso, tracto gastrointestinal o en las heces. Tal como sugiere, Molan *et al.* (2003), quienes encontraron que el extracto de LST de *Cichorium intybus* presentó una actividad inhibitoria en larvas L<sub>3</sub> gastrointestinales de *Dictyocaulus sp.*, en líquido ruminal, pero con mayor efecto en el líquido abomasal, lo que indica que este extracto no se vio afectado por el pH del fluido.

Los resultados en la presente investigación sobre los ensayos de eclosión de huevos con *A. ludoviciana*, planta rica en lactonas sesquiterpénicas, no arrojaron datos significativos ( $P>0.05$ ) para *H. contortus*, contrario a lo observado con *T. colubriformis*.

Cabe señalar que ningún EC y ED exhibió datos significativos sobre la motilidad larvaria o se necesitan de altas concentraciones para ejercer un efecto letal. En este contexto es importante señalar que las evaluaciones sólo se realizaron a nivel ruminal, por lo que es necesario ampliar los estudios para dilucidar si los productos derivados de la degradación de los EV mantienen un efecto antiparasitario en los apartados gástricos posteriores al rumen.

Por otra parte, se ha vislumbrado la posibilidad de que los extractos o sus productos derivados de la degradación, gozan de un mecanismo de acción sobre las enzimas o mecanismos de sobrevivencia del parásito. Frente a ello, las proteasas han tomado gran interés. Estas forman parte de los componentes esenciales de la cutícula, así como de los productos de ES o antígenos somáticos (Bakker *et al.* 2008), los cuales juegan un papel importante en la alimentación, digestión, cicatrización, evasión de la respuesta inmune y diversos procesos celulares (Sajid y McKerrow 2002, Williamson *et al.* 2003). En relación con lo anterior, Cardona *et al.* (2008), sugieren que las proteasas podrían facilitar la actividad fibrinolítica y anticoagulante de algunas larvas y parásitos, ayudando con ello en su alimentación y migración a través del sistema sanguíneo o de los tejidos. Los tiosulfatos y sus precursores,

al igual que las LST reaccionan con grupos sulfhídrico (tiol) derivados de la cisteína o grupos amino pertenecientes a proteínas, enzimas o ácidos nucleicos, lo cual conduce a la interrupción de las funciones macromoleculares y redox (Arantes *et al.* 2011) alterando los procesos fisiológicos del parásito (Said y Mckerrow 2002, Williamson *et al.* 2003, Williams y Lamprecht 2008).

En el caso de los tiosulfatos se ha contemplado la inhibición de la tiorredoxina glutatión reductasa, importante en los helmintos. Esta desempeña un papel como primera línea de defensa contra el daño oxidativo, originado no sólo por oxidantes endógenos, sino también por las células del sistema inmunológico del huésped (James *et al.* 2009). Esta documentado, que tanto macrófagos como neutrófilos pueden liberar en la superficie del parásito enormes cantidades de anión superóxido y óxido nítrico que dan origen a peróxido de hidrógeno, además de potentes oxidantes, tales como el radical hidroxilo y peroxinitrito (Agorio *et al.* 2003).

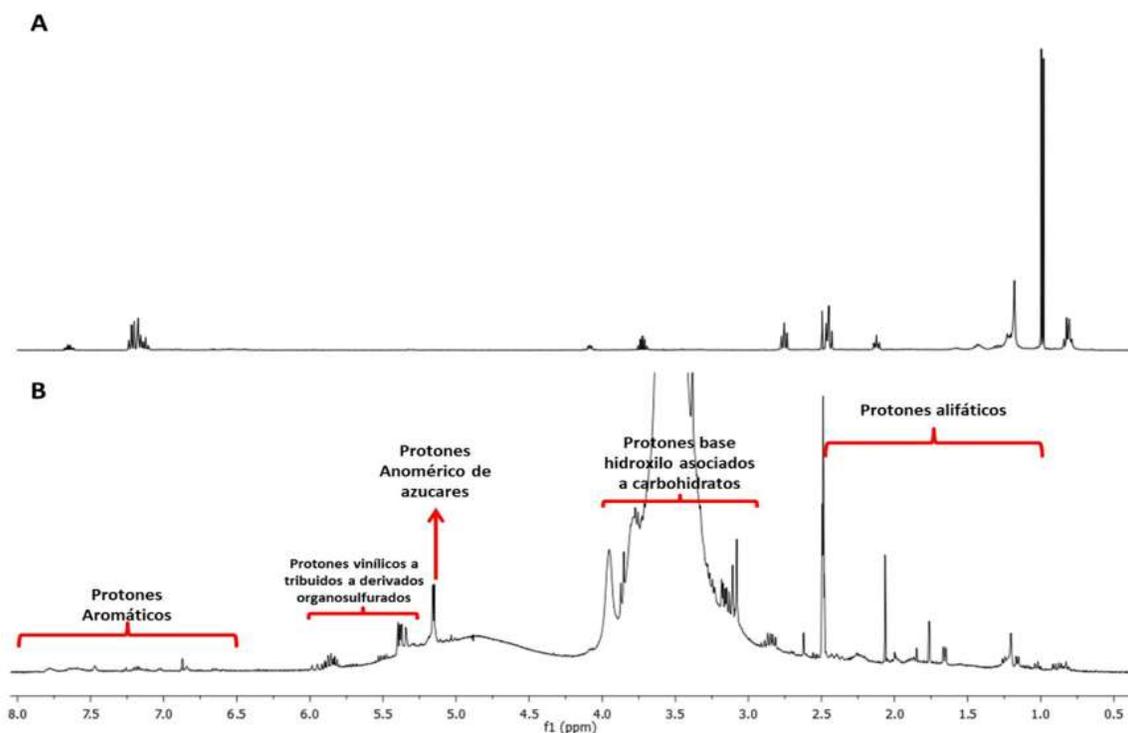
Por otro lado, puede existir una inhibición de la biosíntesis de fosfatidilcolina aumentando la acumulación de fosfatidiletanolamina reduciendo la formación o restructuración de membranas dañadas (Williams y Lamprecht 2008), o bien inhabilitar la alcohol deshidrogenasa, enzima implicada en diversos procesos metabólicos para los parásitos (Williamson *et al.* 1991).

Aun cuando estos resultados *in vitro* resultan interesantes, es difícil su comparación en sistemas *in vivo*, debido a las diferencias físico-químicas que no pueden ser replicadas en laboratorio. En síntesis, se hace necesario estandarizar una metodología que permita vincular el comportamiento de los productos vegetales *in vitro* con los resultados *in vivo*.

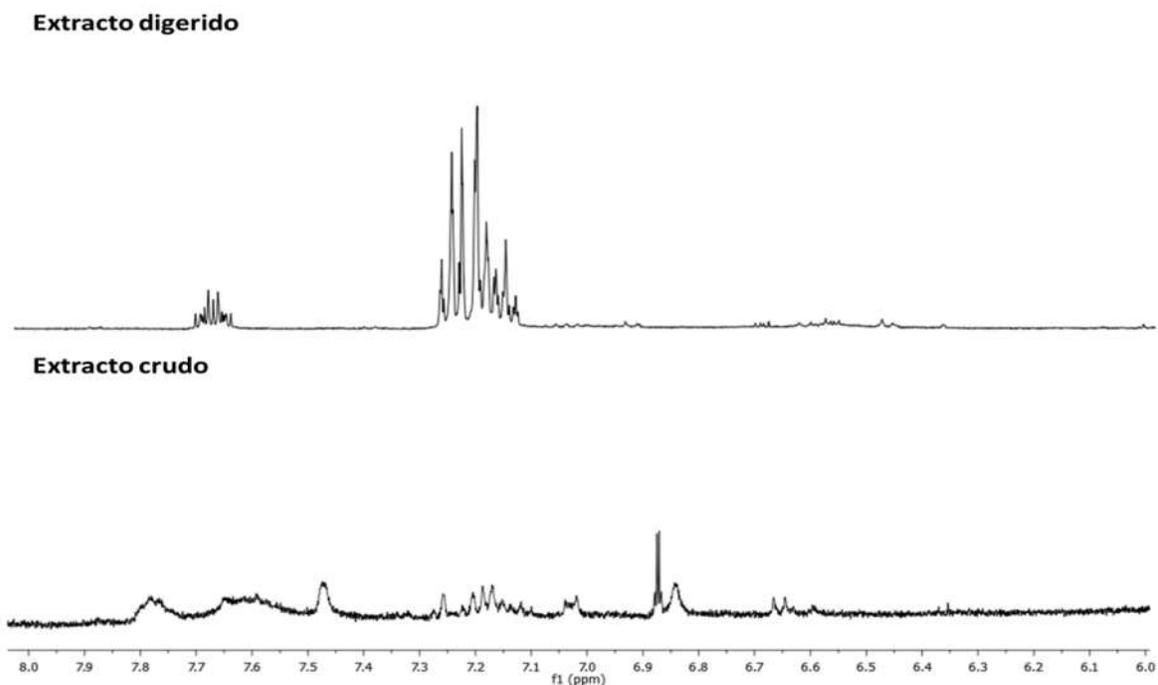
### **6.3. Comparación espectroscópica de lo extractos etanólicos crudos y digeridos**

Todos los extractos vegetales obtenidos fueron analizados mediante RMN de protón ( $^1\text{H}$ ) utilizando dimetilsulfóxido deuterado (D-6, 400 Mhz) con la finalidad de determinar su naturaleza y abundancia.

El análisis de espectros de RMN de  $^1\text{H}$  del EC de *A. sativum* presentó diversos desplazamientos. Se pudo apreciar entre 6-5.3 ppm las señales atribuidas a los derivados organosulfurados descritas por Rabinkov *et al.* (1998). Mientras a 5.36 ppm se apreció la señal característica del protón anomérico del azúcar, al igual que diversas señales de protones base hidroxilo (4-3 ppm) asociadas con azúcares. En el ED las señales de los azúcares mencionados anteriormente desaparecieron. Mientras que en el ED prevalecieron algunas señales de protones aromáticos (**FIG. 11**). Sin embargo, éstas se modificaron a grupos hidroxilo posiblemente por acción de la MR (**FIG. 12**).



**Figura 11.** Comparativo de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto digerido (**A**) y crudo (**B**) de *A. sativum*.



**Figura 12.** Comparativo de RMN de  $^1\text{H}$  de la región aromática de *A. sativum*.

Los resultados encontrados con el extracto crudo y digerido de *A. cepa* (**FIG. 13**) son similares a los obtenidos con *A. sativum* (**FIG. 11**). Posiblemente los compuestos con grupos hidroxilo sufrieron modificaciones químicas, ya que aún se observan algunas señales entre 3.7 y 3.2 ppm (**FIG. 13**). Por su parte, los compuestos aromáticos del ED de *A. cepa* sufrieron un proceso de degradación similar a lo observado con *A. sativum* (**FIG. 14**).

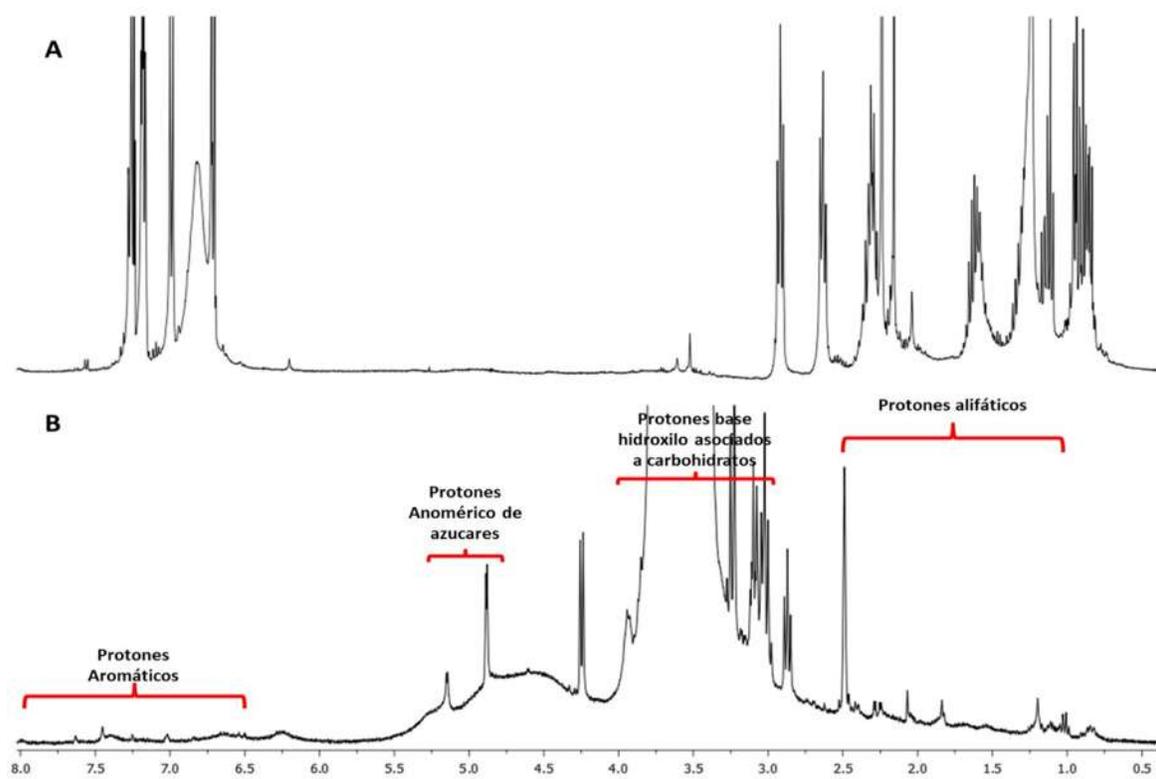


Figura 13. Comparativo de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto digerido (A) y crudo (B) de *A. cepa*.

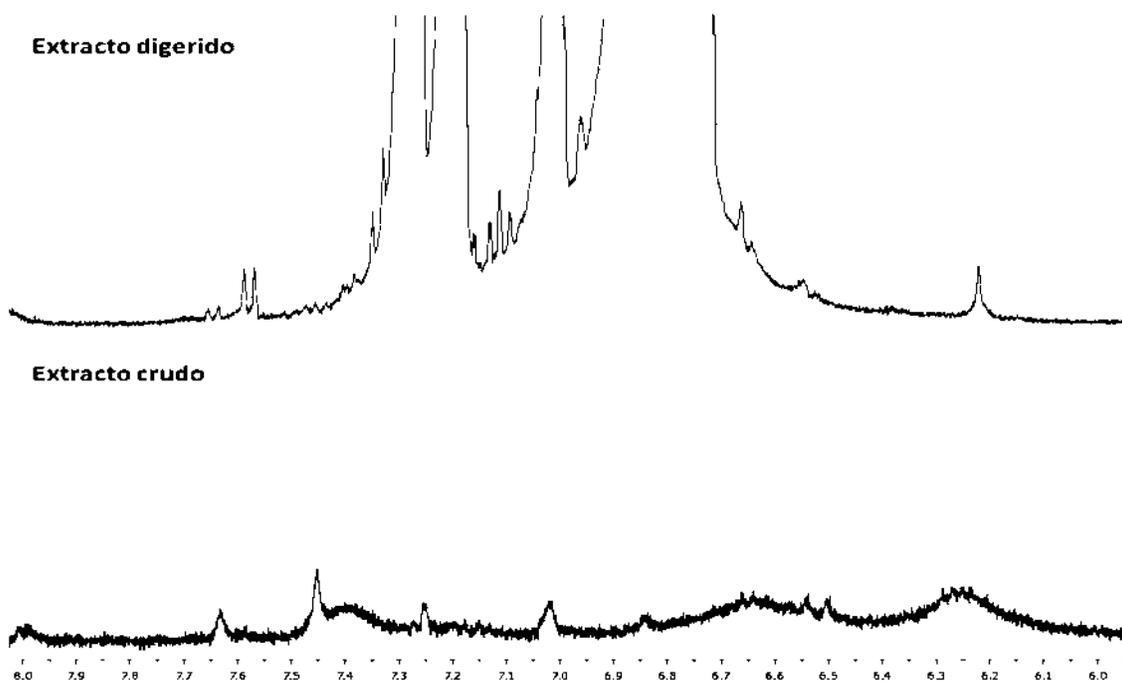
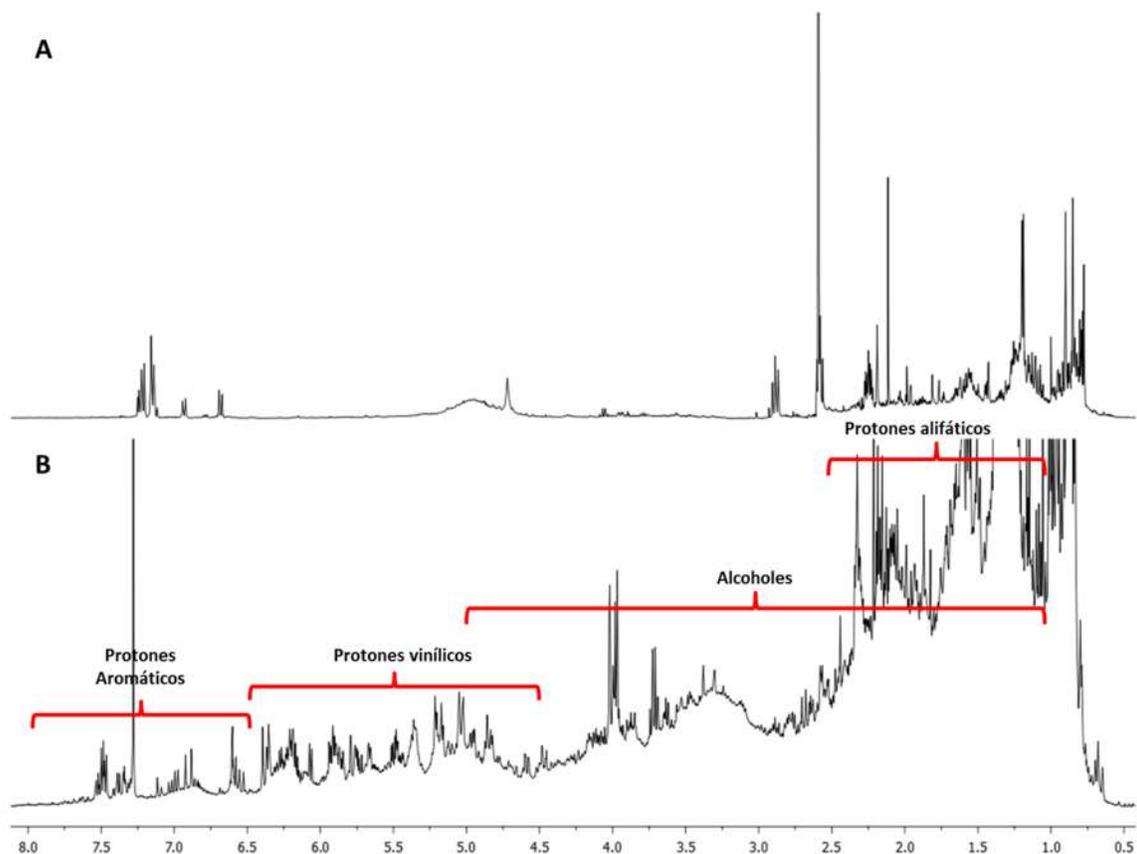


Figura 14. Comparativo de RMN de  $^1\text{H}$  de la región aromática de *A. cepa*.

El espectro del ED de *A. ludoviciana* muestra que los protones base alcohol (5-1 ppm) presentan una mayor degradación en relación a los demás grupos presentes en el extracto. Los compuestos vinílicos se mantienen en proporción, al igual que los grupos aromáticos, quizás debido a su baja degradación por la MR (FIG. 15).



**Figura 15.** Comparativo de RMN de  $^1\text{H}$  del extracto digerido (A) y crudo (B) de *A. ludoviciana*.

Es importante señalar que los comparativos espectroscópicos mantuvieron una estrecha relación con los resultados encontrados en ambos experimentos de este trabajo. En los ensayos sobre el efecto de los EC en la MR (Artículo 1). *A. sativum* mostró la mayor  $P_{\text{gas}}$  *in vitro* originada por el proceso degradativo del sustrato. Contrario a los resultados obtenidos con *A. ludoviciana* quien presentó la menor  $P_{\text{gas}}$ , debido posiblemente al efecto directo del EC sobre la MR o a la baja digestibilidad de sus compuestos (Závala *et al.* 2002, Calzada *et al.* 2006,

Lopes *et al.* 2008). Estos datos concuerdan con los espectros del ED de cada tratamiento (**FIG. 11, 13**).

En cuanto a los ensayos parasitarios a nivel ruminal *in vitro*, el ED de *A. cepa* fue el único que arrojó un efecto significativo en ambas cepas. Ninguno de los extractos crudos o digeridos de los tratamientos evaluados, tuvo una actividad significativa sobre las larvas L3 de las cepas utilizadas (**Artículo 2**). No obstante, los grupos químicos que se observan en los espectros de los ED de cada uno de los tratamientos (**FIG. 11, 13, 15**), pudieran mantener un efecto posterior al proceso de degradación ruminal *in vivo*. Foster *et al.* (2011), sugieren que las LST o los productos de degradación de los EC o forrajes pueden escapar del rumen ejerciendo alguna actividad antihelmíntica en el abomaso, tracto gastrointestinal o en las heces. Por su parte, Molan *et al.* (2003), evaluaron el EC de LST de *Cichorium intybus* sobre larvas L3 de *Dictyocaulus* sp., encontrando una actividad inhibitoria en líquido ruminal, pero con mayor efecto en el líquido abomasal, lo que indica que este extracto no se vio afectado por el pH del fluido. Esto puede ser el caso para *A. ludoviciana* quien esta constituida principalmente por LST (Said Fernández *et al.* 2005).

Los datos obtenidos en este estudio, están destinados a servir como información preliminar para comprender el comportamiento de los extractos vegetales utilizados como antiparasitario dentro del huésped. Esto con el objetivo de estandarizar una metodología que permita vincular los resultados obtenidos en los ensayos parasitarios *in vitro* con los resultados obtenidos en los ensayos *in vivo*.

---

## 7. PERSPECTIVAS

A partir de los estudios y discusiones presentados en esta tesis, las perspectivas de trabajos futuros se orientan en tres direcciones. En primer plano, estarían los trabajos destinados a complementar los aspectos del efecto de los extractos vegetales con potencial antiparasitario sobre la digestibilidad animal. Otro punto de interés a abordar en conjunto sería, evaluar el potencial de los extractos para disminuir la producción de gas metano en los rumiantes.

En un segundo plano, se encontrarían las evaluaciones parasitológicas *in vitro* de los extractos crudos con potencial antihelmíntico y la comparación con sus derivados digeridos. En el presente estudio se abordó este comparativo con los extractos recuperados de una digestión ruminal simulada. Por lo tanto, sería interesante acoplar una técnica de digestión abomasal simulada. Todo ello, enfocado a conocer si los ED mantienen algún efecto antiparasitario posterior al proceso digestivo.

Finalmente, sería de utilidad la corroboración de los resultados *in vitro* con estudios *in vivo*. Para ello, sería necesario suplementar a los animales con el EC, posteriormente recuperar el ED ruminal y abomasal para poder llevar a cabo las comparaciones con los extractos recuperados *in vitro*.

Aun cuando estos resultados *in vitro* resultan interesantes, es difícil su comparación en sistemas *in vivo* debido a las diferencias físico-químicas que no pueden ser replicadas en laboratorio. Por lo cual, se hace necesario estandarizar un sistema bajo condiciones ruminales y abomasaes *in vitro* que permita obtener una correlación significativa entre los ensayos *in vitro* e *in vivo*, tal como lo muestran los estudios de RAH a las drogas sintéticas. Con ello se reduciría el tiempo en las evaluaciones, el uso de animales de acuerdo al criterio de las tres “R”, los costos por alimentación y la mano de obra.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdel, G. F., M. Semmler., K. A. Al-Rasheid., B. Strassen., K. Fischer., G. Aksu y H. Mehlhorn. 2011. **The effects of different plant extracts on intestinal cestodes and on trematodes.** *Parasitology Research* 108 (4): 979-984.
- Acevedo, R. P. M del C. 2011. Los hongos nematófagos como control biológico contra nematodos gastrointestinales de rumiantes. En EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES PARASITARIAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS. Quiroz, R. H., Figueroa, C.J.A., Ibarra, V. F. y López, A. M.E. (Ed). México, D.F. Pp.354-363.
- Agorio, A., C. Chalar, S. Cardozo y G. Salinas. 2003. **Alternative mRNAs arising from trans-splicing code for mitochondrial and cytosolic variants of *Echinococcus granulosus* thioredoxin glutathione reductase.** *Journal of Biological Chemistry* 278 (15): 12920-12928.
- Aguilar, Caballero, A. J., J. F. J Torres-Acosta, R. C. Sarmiento, H. Hoste y C. A. Sandoval-Castro. 2008. **Inmunidad contra los nemátodos gastrointestinales: la historia caprina.** *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 9 (1): 73-82.
- Aguilar-Caballero, A. J.; J. F. J. Torres-Acosta, H. Hoste, C. A. Sandoval-Castro y M. López-Flores. 2005. **Effect of supplementary feeding with energy and/or protein on the resilience and resistance of criollo kids against *Haemonchus contortus*.** Congress of Novel Approaches to the control of helminth parasites of livestock. Worm Control or worm management: new paradigms in integrated control. Mérida, Yucatán, México. Pp. 29.
- Ahmed, M., M. D. Laing y I. V. Nsahlai. 2013. **In vitro anthelmintic activity of crude extracts of selected medicinal plants against *Haemonchus contortus* from sheep.** *Journal of Helminthology* 87 (02): 174-179.
- Alonso-Díaz, M.A., J. F. J. Torres Acosta, C. A. Sandoval-Castro y C. M. Capetillo-Leal. 2010. **Polyphenolic compounds of nutraceutical trees and the variability of their biological activity measured by two methods.** *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 12 (3): 649-656.
- Alunda, J. M., F. Angulo-Cubillán y M. Cuquerella. 2003. **Immunization against ovine haemonchosis with three low molecular weight somatic antigens of adult *Haemonchus contortus*.** *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 50(2): 70-74.
- Álvarez-Sánchez, M.A., R.C. Mainar-Jaime, J. Pérez-García, F. A. Rojo-Vázquez. 2002. **A review of the methods for the detection for anthelmintic resistance.** *Revista Ibérica de Parasitología* 62: 51-59.
- Andrews, S. J., N. J. K. Hole, E. A. Munn y T. P. Rolph. 1995. **Vaccination of sheep against haemonchosis with H11, a gut membrane-derived protective antigen from the adult parasite: prevention of the periparturient rise and colostral transfer of protective immunity.** *International Journal for Parasitology* 25 (7): 839-846.
- Andrews, S. J., T. P. Rolph, E. A. Munn y M. A. Taylort. 1997. **Duration of protective immunity against ovine haemonchosis following vaccination with the nematode gut membrane antigen H11.** *Research in Veterinary Science* 62 (3): 223-227.
- Anónimo 2009. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. Estafiate. México, D.F.

- Arece J. 2008a. **Algunas consideraciones para el control parasitario en ovinos.** Curso-Taller: Tecnologías sostenibles para la producción de ganado menor. Universidad de Ciego Ávila (UNICA), Cuba. 21-25 de Octubre. Pp. 1-14.
- Arece J. y J. Rodríguez. 2003. **Parasitismo Gastrointestinal de ovino en Cuba.** *Revista ACPA* 4. Cuba.
- Arece J. y Rodríguez, J. G. 2010. **Dinámica de las larvas infestantes de estrogilidos gastrointestinales en ovinos en pastoreo.** *Pastos y Forrajes* 33 (1): 1-1.
- Arranz N., A. I. Haza, A. García, L. Möller, J. Rafter y P. Morales 2007. **Protective effects of organosulfur compounds towards N-nitrosamines-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE/HepG2) assay.** *Food and Chemical Toxicology* 45 (9): 1662-1669.
- Bahmani, M., Golshahi, H., Mohsenzadegan, A., Ahangarani, M. G., y Ghasemi, E. 2013. **Comparative assessment of the anti-*Limnatis nilotica* activities of *Zingiber officinale* methanolic extract with levamisole.** *Comparative Clinical Pathology*, 22(4): 667-670.
- Barger, I. A., L. F. Le Jambre, J. R. Georgi y H. I. Davies. 1985. **Regulation of *Haemonchus contortus* populations in sheep exposed to continuous infection.** *International Journal for Parasitology* 15 (5): 529-533.
- Beasley, A. M., L. P. Kahn, y R. G. Windon. 2010. **The periparturient relaxation of immunity in Merino ewes infected with *Trichostrongylus colubriformis*: parasitological and immunological responses.** *Veterinary Parasitology* 168 (1): 60-70.
- Beech, R. N., R. K. Prichard y M. E. Scott. 1994. **Genetic variability of the beta-tubulin genes in benzimidazole-susceptible and-resistant strains of *Haemonchus contortus*.** *Genetics* 138 (1): 103-110.
- Beg A. Z y I. Ahmad. 2000. **Effect of *Plumbago zeylanica* extract and certain curing agents on multidrug resistant bacteria of clinical origin.** *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (8-9): 841-844.
- Behnke, J. M., D. M. Menge y H. Noyes. 2009. ***Heligmosomoides bakeri*: a model for exploring the biology and genetics of resistance to chronic gastrointestinal nematode infections.** *Parasitology* 136 (12): 1565-1580.
- Bhagyalakshmi, N., R. Thimmaraju, L. Venkatachalam, K. C. Murthy y R. V. Sreedhar. 2005. **Nutraceutical applications of garlic and the intervention of biotechnology.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 45 (7-8): 607-621.
- Blackhall, W. J., H. Y. Liu, M. Xu, R. K. Prichard y R. N. Beech. 1998. **Selection at a P-glycoprotein gene in ivermectin-and moxidectin-selected strains of *Haemonchus contortus*.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 95 (2): 193-201.
- Bricarello, P. A., A. F. T. Amarante, R. A. Rocha, S. L. Cabral Filho, J. F. Huntley, J. G. M. Houdijk y S. M. Gennari. 2005. **Influence of dietary protein supply on resistance to experimental infections with *Haemonchus contortus* in Ile de France and Santa Ines lambs.** *Veterinary Parasitology* 134 (1): 99-109.
- Brown, M. D., D. P. Poppi y A. R. Sykes. 1991. **The effect of post-ruminal infusion of protein or energy on the pathophysiology of *Trichostrongylus colubriformis* infection and body composition in lambs.** *Crop and Pasture Science* 42 (2): 253-267.
- Burke, J. M., N. C. Whitley, D. A. Pollard, J. E. Miller, T. H. Terrill, K. E. Moulton, J. A. Mosjidise. 2011. **Dose titration of *Sericea lespedeza* leaf meal on *Haemonchus contortus* infection in lambs and kids.** *Veterinary Parasitology* 181 (2-4): 345-349.

- Caballero, A. A. J., A. F. J. Torres y S. R. Camara. 2009. **Importancia del parasitismo gastrointestinal en ovinos y situación actual de la resistencia antihelmíntica en México.** En: González GR, Berúmen AAC, comp. Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico. Tabasco, México: Universidad Autónoma Chapingo. Pp. 1-11.
- Caballero, A. J. A., R. C. Sarmiento, J. F. T. Acosta y C. S. Castro. 2011. **El control de los nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿ dónde estamos?.** *Bioagrociencias* 4 (2): 10-16.
- Caballero, A. J. A., R. C. Sarmiento, J. F. T. Acosta y C. S. Castro. 2011. **El control de los nematodos gastrointestinales en caprinos: ¿ dónde estamos?** *Bioagrociencias* 4 (2): 10-16.
- Cabeza, H. E. A., J. M. Zumalacárregui-Rodríguez, B. Fernández-Trabanco y J. Mateo-Oyagüe. 2006. **Propiedades de la cebolla y su uso para la elaboración de morcillas.** *ACTA/CL: revista de la Asociación de Científicos y Tecnólogos de Alimentos de Castilla y León* (25): 5-8. León, España.
- Cachat, E., G. F. J. Newlands, S. E. Ekoja, H. McAllister y W. D. Smith. 2010. **Attempts to immunize sheep against *Haemonchus contortus* using a cocktail of recombinant proteases derived from the protective antigen, Hgal-GP.** *Parasite Immunology* 32 (6): 414-419.
- Calzada, F., M. L. Yépez y C. A. Tapia. 2007. **Effect of Mexican medicinal plants used to treat trichomoniasis on *Trichomonas vaginalis* trophozoites.** *Journal of Ethnopharmacology* 113 (2): 248-251.
- Campos, A. K., J. V. Araújo, M. P. Guimarães y A. S. Dias. 2009. **Resistance of different fungal structures of *Duddingtonia flagrans* to the digestive process and predatory ability on larvae of *Haemonchus contortus* and *Strongyloides papillosus* in goat feces.** *Parasitology Research* 105 (4): 913-919.
- Campos, R., R. Herrera y R. Quiroz, R. 1992. **Diagnóstico *in vitro* de *Haemonchus contortus* resistente al albendazol, fenbendazol, oxfendazol y febantel en tres rebaños ovinos Tabasco o Pelibuey.** *Veterinaria México* 23 (1): 51-6.
- Cardona, C. F., O. B. Cisneros, Z. D. Alvarado-Cuevas, M. M. Cuevas y S. S. Rodríguez. 2008. **Expresión de Hsp70 en células MDCK inducida por compuestos de secreción del nematodo *T. spiralis*.** *Archivos de Medicina* 4 (1).
- Casillas, A. J. A., P. Mendoza de Gives, A. Ma. E. López y H. E. Liéban. 2008. **Evaluation of Multi-nutritional Bio-pellets containing *Duddingtonia flagrans* chlamydospore for the control of ovine haemonchosis.** *Annals of the New York Academy of Science* 1149: 161-163. E. U. A.
- Castells M. D. 2004. **Métodos integrados de control de parásitos gastrointestinales: manejo de pastoreo.** Seminario de actualización parásitos gastrointestinales en ovinos y bovinos. Tacuarembó, Uruguay. Pp. 2-5.
- Castillo, J. A. F., R. D. M. Medina, J. M. B. Villalobos y J. A. A. León. 2000. **ftyfón de resistencia en *Haemonchus contortus* al sulfóxido de albendazol inyectado mediante la prueba de campo de reducción de huevos en ganado ovino.** *Veterinaria. México* 31 (4): 309. México.
- Castro, H. J. A., W. M. González y M. Mezo. 2007. **Principales parasitosis en el ganado vacuno lechero: pautas racionales de control.** *Frisona española* 27 (162): 96-101.
- Chartier, C., E. Etter, H. Hoste, I. Pors, C. Koch y B. Dellac. 2000. **Efficacy of copper oxide needles for the control of nematode parasites in dairy goats.** *Veterinary Research Communications* 24 (6): 389-399.

- Coles, G. C., C. Bauer, F. H. M. Borgsteede, S. Geerts, T. R. Klei, M. A. Taylor y P. J. Waller. 1992. **World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (WAAVP) methods for the detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance.** *Veterinary Parasitology* 44 (1): 35-44.
- Coles, G. C., F. Jackson, W. E. Pomroy, R. K. Prichard, G. Von Samson-Himmelstjerna, A. Silvestre, A. y J. Vercruyssen. 2006. **The detection of anthelmintic resistance in nematodes of veterinary importance.** *Veterinary Parasitology* 136 (3): 167-185.
- Coop R. L. y I. Kyriazakis. 2001. **Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants.** *Trends in Parasitology* 17 (7): 325-330.
- Coop R. L. y I. Kyriazakis. 1999. **Nutrition–parasite interaction.** *Veterinary Parasitology* 84 (3): 187-204.
- Coop R. L. y P. H. Holmes. 1996. **Nutrition and parasite interaction. International.** *Journal for Parasitology* 26 (8): 951-962.
- Coop, R. L., A. R. Sykes y K. W. Angus. 1982. **The effect of three levels of intake of *Ostertagia circumcincta* larvae on growth rate, food intake and body composition of growing lambs.** *The Journal of Agricultural Science* 98 (02): 247-255.
- Cordero del Campillo, M., V. M. Rojo, F. A. Martínez, A. M. Sánchez, R. S. Hernández, L. C. Navarrete, B. P. Diez, R. H. Quiroz y V. M. Carvalho. 1999. **Parasitología veterinaria.** Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. Madrid, España. Pp. 26 – 400.
- Cortez-Gallardo, V., J. P. Macedo-Ceja, M. Hernández-Arroyo, G. Arteaga-Aureoles, D. Espinosa-Galván y J. F. Rodríguez-Landa. 2004. **Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas.** *Revista Biomédica* 15: 123-136. Xalapa, Veracruz, México.
- Corzo-Martínez, M., N. Corzo y M. Villamiel. 2007. **Biological properties of onions and garlic.** *Trends in Food Science & Technology* 18 (12): 609-625.
- Cox, G. N., D. Pratt, R. Hageman y R. J. Boisvenue. 1990. **Molecular cloning and primary sequence of a cysteine protease expressed by *Haemonchus contortus* adult worms.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 41 (1): 25-34.
- Cristel S. L. y V. H. Suárez. 2006. **Resistencia antihelmíntica: evaluación de la prueba de reducción del conteo de huevos.** *Revista Investigaciones Agropecuarias* 35 (3): 29-43.
- Cué-Bär, E. M., J. L. Villaseñor, L. Arredondo-Amezcuca, G. Cornejo-Tenorio y G. Ibarra-Manríquez. 2006. **La flora arbórea de Michoacán, México.** *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 78: 47-81. D. F. México.
- Cutullé, C., C. Eddi, J. Caracostantogolo, O. Z. R. Casta y J. Schapiro. 1999. **Métodos *in vitro* para el diagnóstico de resistencia antihelmíntica.** *Veterinaria Argentina* 16 (157): 514-521.
- da Silva, A. S., R. A. Zanette, M. A. Otto, C. D. M. Soares, S. H. Alves, S. G. Monteiro y J. M. Santurio. 2009. ***Duddingtonia flagrans*: Centrifugal flotation technique with magnesium sulphate for the quantification and qualification of chlamydispores in sheep faeces.** *Experimental Parasitology* 121 (2): 187-188.
- De Almeida, M. Â. O., M. M. S. Simas., M. B. Botura., T. D. S., de Bittencourt., A. Silva y M. J. M. Batatinha. 2004. **Evaluation *in vitro* of the alcoholic extract and juice of *Allium sativum* L. on gastrointestinal nematodes of goats.** *Ciência Veterinária Nos Trópicos* 7 (1): 36-43.

- de Gives, P. M., J. M. Behnke y K. G. Davies. 2003. **Extracellular enzyme production by nematophagous fungi in the presence and absence of nematodes.** *International Journal of Nematology* 13 (1): 27-36.
- de Montellano, C. M. O., J. J. Vargas-Magaña, A. J. Aguilar-Caballero, C. A. Sandoval-Castro, L. Cob-Galera, M. May-Martínez y J. F. J. Torres-Acosta. 2007. **Combining the effects of supplementary feeding and copper oxide needles for the control of gastrointestinal nematodes in browsing goats.** *Veterinary Parasitology* 146 (1): 66-76.
- Dent, J. A., M. M. Smith, D. K. Vassilatis y L. Avery. 2000. **The genetics of ivermectin resistance in *Caenorhabditis elegans*.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (6): 2674-2679.
- Dent, J. A., M. W. Davis y L. Avery. 1997. **Avr-15 encodes a chloride channel subunit that mediates inhibitory glutamatergic neurotransmission and ivermectin sensitivity in *Caenorhabditis elegans*.** *The EMBO Journal* 16 (19): 5867-5879.
- Dobson, R. J., L. Lejambre y J. H. Gill. 1996. **Management of anthelmintic resistance: inheritance of resistance and selection with persistent drugs.** *International Journal for Parasitology* 26 (8): 993-1000.
- Domínguez-Toraño, I. A., M. Cuquerella, M. Gómez-Muñoz, S. Méndez y J. F. Fernández-Pérez. 2000. **Vaccination of Manchego lambs against *Haemonchus contortus* with a somatic fraction (p26/23) of adult parasites.** *Parasite Immunology* 22 (3): 131-138.
- Dopchiz, M. C., A. E. Parma y A. Fiel. 2000. **Hypobiosis induction alters the protein profile of *Ostertagia ostertagi* (Nematoda: Trichostrongylidae).** *Folia Parasitologica* 47 (2): 135-140.
- Duncan, J. L., E. M. Abbott, J. H. Arundel, M. Eysker, T. R. Klei, R. C. Krecek... y J. O. D. Slocombe. 2002. World association for the advancement of veterinary parasitology (WAAVP): of guidelines for evaluating the efficacy of equine anthelmintics. *Veterinary Parasitology* 103 (1): 1-18.
- Emery L., y M. Wagland. 1991. **Vaccines against gastrointestinal nematode parasites of ruminants.** *Australian Parasitology Today* 7 (12): 347-349.
- Encalada, L., Ma. López, P. Mendoza, E. Liébano, V. Vázquez y G. Vera. 2008. **Primer informe en México sobre la presencia de resistencia a ivermectina en bovinos infectados naturalmente con nematodos gastrointestinales.** *Revista Veterinaria México* 39 (4): 423-428.
- Epe, C., C. Holst, R. Koopmann, T. Schnieder, M. Larsen y G. Von Samson-Himmelstjerna. 2009. **Experiences with *Duddingtonia flagrans* administration to parasitized small ruminants.** *Veterinary Parasitology* 159 (1): 86-90.
- Fadzirayi, C. T., B. Masamha y I. Mukutirwa. 2010. **Efficacy of *Allium sativum* (garlic) in controlling nematode parasites in sheep.** *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine* 8 (3).
- Fernandez, L. H., M. C. Z. Seno, A. F. T. Amarante, H. Souza y C. E. C. Belluzzo. 2004. **Efeito do pastejo rotacionado e alternado com bovinos adultos no controle da verminose em ovelhas.** *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 56 (6): 733-40.
- Fiel C. A., C. A. Saumell, L. A. Fusé, R. Seguí, E. Freije, P. E. Steffan y L. E. Iglesias. 2005. **Resistencia antihelmíntica en bovinos. Dos escenarios diferentes como resultado de (1.) El sistema de manejo y (2.) La excesiva frecuencia de tratamientos**

- antiparasitarios.** *Resistencia a los Antiparasitarios Internos en Argentina* 53-61. Argentina.
- Fiel, C. A., P. E. Steffan, H. Vercesi, R. R. Ambrústolo, P. Catania, A. P. Casaro... y C. A. Biondani. 1988. **Variación estacional del parasitismo interno de los bovinos en el sudeste de la provincia de Buenos Aires (Argentina) con especial referencia al fenómeno de “hipobiosis”.** *Revista de Medicina Veterinaria* 69 (1): 20-27.
- Fiel, C., O. Anziani, V. Suárez, R. Vázquez, C. Eddi, J. Romero y P. Steffan. 2001. **Resistencia antihelmíntica en bovinos: causas, diagnóstico y profilaxis.** *Veterinaria Argentina* 18 (171): 21-33.
- Figuroa J. A. C. y P. R. Acevedo. 2011. **Epidemiología y control de nematodos gastrointestinales en ovinos en clima templado.** En: Quiroz, H.R., Figuroa, J. A. C., Ibarra, Froylán, Velarde. y López, M. E. A. (Ed). EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES PARASITARIAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS. México, DF. Pp. 331 y 332.
- Figuroa, J. A. C., M. R. D. Méndez, V. J. M. Berruecos y L. J. A. Alvarez. 1999. **Eficacia del sulfóxido de albendazol y el levamisol contra una población de Haemonchus contortus en ganado ovino.** En: Memorias del XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología. Octubre 11-16, Guerrero, Acapulco, México. Pp. 131.
- Fleming, J. T., M. D. Squire, T. M. Barnes, C. Tornoe, K. Matsuda, J. Ahnn y J. A. Lewis. 1997. **Caenorhabditis elegans Levamisole Resistance Geneslev-1, unc-29, and unc-38 Encode Functional Nicotinic Acetylcholine Receptor Subunits.** *The Journal of Neuroscience* 17 (15): 5843-5857.
- Florencia G. M. 2011. **Estudio de proceso de deshidratación industrial de ajo con la finalidad de preservar alicina como principio activo.** Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza, Argentina. pp. 15, 17-19.
- Fonnegra G. R. y R. S. L. Jiménez. 2007. **Plantas medicinales aprobadas en Colombia.** (2 ed.) Ed. Universidad de Antioquia. Colombia. 31 p.
- Galzi, J. L., A. Devillers-Thiery, N. Hussy, S. Bertrand, J. P. Changeux y D. Bertrand. 1992. **Mutations in the channel domain of a neuronal nicotinic receptor convert ion selectivity from cationic to anionic.** *Nature* 359: 500-505.
- García, A., A. I. Haza, N. Arranz, E. Delgado, J. Rafter y P. Morales. 2008. **Organosulfur compounds alone or in combination with vitamin C protect against N-nitrosodibutylamine and N-nitrosopiperidine-induced oxidative DNA damage in HepG2 cells.** *Chemico-Biological Interactions* 173 (1): 9-18.
- García, C., A. Martínez, J. Ortega y F. Castro. 2010. **Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales.** *Revista Química Viva* 2: 86-96. Durango, México.
- García-Coiradas, L., F. Angulo-Cubillán, B. Valladares, E. Martínez, C. de la Fuente, J. M. Alunda y M. Cuquerella. 2010. **Immunization against lamb haemonchosis with a recombinant somatic antigen of Haemonchus contortus (rhcp26/23).** *Veterinary Medicine International.*
- García-García, J. C., C. Montero, M. Redondo, M. Vargas, M. Canales, O. Boue y J. de la Fuente. 2000. **Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, Boophilus microplus.** *Vaccine* 18 (21): 2275-2287.

- Gatongi, P. M., R. K. Prichard, S. Ranjan, J. M. Gathuma, W. K. Munyua, H. Cheruiyot y M. E. Scott. 1998. **Hypobiosis of *Haemonchus contortus* in natural infections of sheep and goats in a semi-arid area of Kenya.** *Veterinary Parasitology* 77 (1): 49-61.
- Gatsing, D., R. Aliyu, J. R. Kuate, I. H. Garba, K. H. Jaryum, N. Tedongmo... y G. I. Adoga. 2006. **Toxicological evaluation of the aqueous extract of *Allium sativum* bulbs on laboratory mice and rats.** *Cameroon Journal of Experimental Biology* 1 (1): 39-45.
- Geary, T. G., S. C. Nulff, M. A. Favreau, L. Tang, R. K. Prichard, N. T. Hatzenbuehler y R. D. Klein. 1992. **Three  $\beta$ -tubulin cDNAs from the parasitic nematode *Haemonchus contortus*.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 50 (2): 295-306.
- Gibbs H. C. 1986. **Hypobiosis in parasitic nematodes-An update.** *Advances in Parasitology* 25: 129-174.
- Gil A. H. 2010. **Tratado de nutrición.** (2 ed.) Ed. Medica Panamericana. Tomo II: Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Madrid, España. 143 p.
- Gill, H. S., G. D. Gray, D. L. Watson y A. J. Husband. 1993. **Isotype-specific antibody responses to *Haemonchus contortus* in genetically resistant sheep.** *Parasite Immunology* 15 (2): 61-67.
- Gill, J. H., J. M. Redwin, J. A. Van Wyk y E. Lacey. 1991. **Detection of resistance to ivermectin in *Haemonchus contortus*.** *International Journal for Parasitology* 21 (7): 771-776.
- Goldberg, V., G. Ciappesoni y I. Aguilar. 2012. **Genetic parameters for nematode resistance in periparturient ewes and post-weaning lambs in Uruguayan Merino sheep.** *Livestock Science* 147 (1): 181-187.
- Gómez G. M 2008. **Cinéticas de ácido pirúvico durante el proceso de secado constante y variable del ajo.** Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional, Oaxaca, México. pp. 9-13.
- González-Garduño, R., C. Córdova-Pérez, G. Torres-Hernández, P. Mendoza de Gives y J. Arece-García. 2011. **Prevalencia de parásitos gastrointestinales en ovinos sacrificados en un rastro de Tabasco, México.** *Veterinaria México* 42 (2): 125-135.
- Greathead H. 2003. **Plants and plant extracts for improving animal productivity.** *Proceedings of the Nutrition Society* 62 (2): 279-290.
- Griffiths, G., L. Trueman, T. Crowther, B. Thomas y B. Smith. 2002. **Onions—a global benefit to health.** *Phytotherapy Research* 16 (7): 603-615.
- Gurley, B. J., S. F. Gardner, M. A. Hubbard, D. K. Williams, W. B. Gentry, Y. Cui, y C. Y. Ang. 2005. **Clinical assessment of effects of botanical supplementation on cytochrome P450 phenotypes in the elderly.** *Drugs y Aging* 22 (6): 525-539.
- Guzmán, M., C. Fiel y P. Steffan. 2010. **La infección cruzada e *Haemonchus contortus* de ovinos a bovinos y el riesgo de transmisión de resistencia antihelmíntica. Una revisión.** *Veterinaria Argentina* 27 (272): 1-7.
- Habela, M., R. G. Sevilla, E. Corchero, J. M. Fruto y J. Peña. 2002. **Mundo Ganadero.** Extramadura, España. Pp 1-6.
- Haile, A., S. Tembely, D. O. Anindo, E. Mukasa-Mugerwa, J. E. O. Rege, A. Yami y R. L. Baker. 2002. **Effects of breed and dietary protein supplementation on the responses to gastrointestinal nematode infections in Ethiopian sheep.** *Small Ruminant Research* 44 (3): 247-261.
- Hansen, J. W., R. C. Krecek, J. A. Van Wyk y A. F. Vatta. 2001. **Sustainable Approaches for Managing Haemonchosis in Sheep and Goats: Final Report of FAO Technical Co-**

- operation Project in South Africa.** Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. p. 90 .
- Hedges L. J. y C. E. Lister. 2007. **The nutritional attributes of Allium species.** *Crop & Food Research Confidential report* 1814. Christchurch, New Zealand.
- Heike V. 2009. Malezas de México: Ficha-Asteraceae=Compositae. *Artemisia ludoviciana* Nutt. Hierba maestra. (fecha de acceso). <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisialudoviciana/fichas/ficha.htm> (Accesada en Septiembre de 2015).
- Hein, W. R. y G. B. L. Harrison. 2005. **Vaccines against veterinary helminths.** *Veterinary Parasitology* 132 (3): 217-222.
- Hennesy D. R. 1994. **The disposition of antiparasitic drugs in relation to the development of resistance by parasites of livestock.** *Acta Tropical* 56 (2): 125-141.
- Hernández, E. L., de Gives, P. M., Prats, V. M. V., Aguilar, X. M. y Arellano, M. E. L. 2006. **Resistencia antihelmíntica de nematodos gastroentéricos en ovinos a febendazol e ivermectina en la región noroeste del estado de Tlaxcala.** *Técnica Pecuaria México* 44 (1): 81-90.
- Herrera, L., L. A. Ríos y R. Z. Salas. 2013. **Frecuencia de la infección por nemátodos gastrointestinales en ovinos y caprinos de cinco municipios de Antioquia.** *Revista MVZ Córdoba* 18 (3): 3851-3860.
- Hoste, H., F. Huby y S. Mallet. 1997. **Strongyloses gastrointestinales des ruminants: conséquences physiopathologiques et mécanismes pathogéniques.** *Le Point Vétérinaire* 28: 53-59. Francia.
- Hoste, H., F. Jackson, S. Athanasiadou, S. Thamsborg y S. O. Hoskin. 2006. **The effects of tanninrich plants on parasitic nematodes in ruminants.** *Trends in Parasitology*. 22 (6): 253–261.
- Hoste, H., Y. Le Frileux y A. Pommaret. 2001. **Distribution and repeatability of faecal egg counts and blood parameters in dairy goats naturally infected with gastrointestinal nematodes.** *Research in Veterinary Science* 70 (1): 57-60.
- Hsu C. K. y N. D. Levine. 1977. **Degree-day concept in development of infective larvae of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* under constant and cyclic conditions.** *American journal of Veterinary Research* 38 (8): 1115-1119.
- Hunt, P. W., J. C. McEwan y J. E. Miller. 2008. **Future perspectives for the implementation of genetic markers for parasite resistance in sheep.** *Tropical Biomedicine* 25 (1): 18-33.
- Iason G. 2005. **The role of plant secondary metabolites in mammalian herbivory: ecological perspectives.** *Proceedings of the Nutrition Society* 64 (1): 123.
- Jackson, F., D. Bartley, Y. Bartley y F. Kenyon. 2009. **Worm control in sheep in the future.** *Small Ruminant Research* 86 (1): 40-45.
- Jacobs, H. J., C. Wiltshire, K. Ashman y E. N. T. Meeusen. 1999. **Vaccination against the gastrointestinal nematode, *Haemonchus contortus*, using a purified larval surface antigen.** *Vaccine* 17 (4): 362-368.
- Jagannathan, S., D. L. Laughton, C. L. Critten, T. M. Skinner, L. Horoszok y A. J. Wolstenholme. 1999. **Ligand-gated chloride channel subunits encoded by the *Haemonchus contortus* and *Ascaris suum* orthologues of the *Caenorhabditis elegans* gbr-2 (avr-14) gene.** *Molecular and biochemical parasitology* 103 (2): 129-140.

- Jakupovic, J., R. X. Tan, F. Bohlmann, P. E. Boldt y Z. J. Jia. 1991. **Sesquiterpene lactones from *Artemisia ludoviciana***. *Phytochemistry* 30 (5): 1573-1577.
- Jara P. V. A. 2004. **Efecto del parasitismo gastrointestinal sobre los niveles plasmáticos de moxidectina administrada por vía subcutánea en ovinos**. Tesis de licenciatura. Universidad de Concepción. Chillán, Chile. Pp.10-11.
- Jones, M. G., J. Hughes, A. Tregova, J. Milne, A. B. Tomsett y H. A. Collin. 2004. **Biosynthesis of the flavour precursors of onion and garlic**. *Journal of Experimental Botany* 55 (404): 1903-1918.
- Jorgan H. y P. Brain, P. 1994. **The epidemiology, diagnosis and control of helminthes parasites of ruminants**. *ILRAD* 150. Nairobi, Kenya.
- Kahn, L. P., M. R. Knox, S. W. Walkden-Brown y J. M. Lea. 2001. **Enhancing life-long resistance to nematode parasites: possibilities from nutritional supplementation of recently weaned sheep**. *Recent Advances in Animal Nutrition in Australia* 13: 87-95. Armidale, NSW.
- Kahna, L. P., M. R. Knoxb, G. D. Grayb, J. M. Leaa y W. S. W. Brown. 2003. **Enhancing immunity to nematode parasites in single-bearing Merino ewes through nutrition and genetic selection**. *Veterinary Parasitology* 112 (3): 211-225.
- Kalembe D y A. Kunicka. 2003. **Antibacterial and antifungal properties of essential oils**. *Current Medicinal Chemistry* 10 (10): 813-829.
- Kataria, N., A. K. Kataria y A. K. Gahlot. 2008. **Use of plasma gastrin and pepsinogen levels as diagnostic markers of abomasal dysfunction in Marwari sheep of arid tract**. *Slovenian Veterinary Research* 45 (4): 121-126.
- Kerboeuf, D., F. Guegnard y Y. Le Vern. 2002. **Analysis and partial reversal of multidrug resistance to anthelmintics due to P-glycoprotein in *Haemonchus contortus* eggs using *Lens culinaris* lectin**. *Parasitology Research* 88 (9): 816-821.
- Kerboeuf, D., W. Blackhall, R. Kaminsky y G. Von Samson-Himmelstjerna. 2003. **P-glycoprotein in helminths: function and perspectives for anthelmintic treatment and reversal of resistance**. *International Journal of Antimicrobial Agents* 22 (3): 332-346.
- Ketzis, J. K., J. Vercruyssen, B. E. Stromberg, M. Larsen, S. Athanasiadou y J. G. Houdijk. 2006. **Evaluation of efficacy expectations for novel and non-chemical helminth control strategies in ruminants**. *Veterinary Parasitology* 139 (4): 321-335.
- Klimpel, S., Abdel-Ghaffar, F., Al-Rasheid, K. A., Aksu, G., Fischer, K., Strassen, B. y Mehlhorn, H. 2011. **The effects of different plant extracts on nematodes**. *Parasitology Research*, 108(4):1047-1054.
- Knox D. P. 2010. **Parasite vaccines: Recent progress in, and problems associated with their development**. *The Open Infectious Diseases Journal* 4 (1): 63-73.
- Knox, D. P., D. L. Redmond y D. G. Jones. 1993. **Characterization of proteinases in extracts of adult *Haemonchus contortus*, the ovine abomasal nematode**. *Parasitology* 106 (04): 395-404.
- Knox, D. P., D. L. Redmond, G. F. Newlands, P. J. Skuce, D. Pettit y W. D. Smith. 2003. **The nature and prospects for gut membrane proteins as vaccine candidates for *Haemonchus contortus* and other ruminant trichostrongyloids**. *International Journal for Parasitology* 33 (11): 1129-1137.
- Knox, D. P., S. K. Smith y W. D. Smith. 1999. **Immunization with an affinity purified protein extract from the adult parasite protects lambs against infection with *Haemonchus contortus***. *Parasite Immunology* 21 (4): 201-210.

- Krest I. y M. Keusgen. 1999. **Quality of herbal remedies from *Allium sativum*: differences between alliinase from garlic powder and fresh garlic.** *Planta Medica* 65 (2): 139-143.
- Kuettner, E. B., R. Hilgenfeld y M. S. Weiss. 2002. **Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic.** *Archives of Biochemistry and Biophysics* 402 (2): 192-200.
- Kumar R. A. J. y C. L. Yadav. 1994. **Prevalence of fenbendazole resistance in ovine nematodes in North West India.** *Tropical Animal Health and Production* 26(4): 230-234.
- Kwa, M. S. G., F. N. J. Kooyman, J. H. Boersema y M. H. Roos. 1993. **Effect of selection for benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* on  $\beta$ -tubulin isotype 1 and isotype 2 genes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 191 (2): 413-419.
- Kwa, M. S., J. G. Veenstra y M. H. Roos. 1994. **Benzimidazole resistance in *Haemonchus contortus* is correlated with a conserved mutation at amino acid 200 in  $\beta$ -tubulin isotype 1.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 63 (2): 299-303.
- Lacey E. y R. K. Prichard. 1986. **Interactions of benzimidazoles (BZ) with tubulin from BZ-sensitive and BZ-resistant isolates of *Haemonchus contortus*.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 19 (2): 171-181.
- Langrová, I., K. Makovcová, J. Vadlejch, I. Jankovská, M. Petrtýl, J. Fechtner... y M. Borkovcová. 2008. **Arrested development of sheep strongyles: onset and resumption under field conditions of Central Europe.** *Parasitology Research* 103 (2): 387-392.
- Lanzotti V. 2006. **The analysis of onion and garlic.** *Journal of Chromatography* 11 (12): 3-22.
- Lawson L. D. 1993. **Bioactive organosulfur compounds of garlic and garlic products: role in reducing blood lipids.** En: ACS symposium series. USA.
- Lawson L. D. 1998. **Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds.** En: L. D. Lawson-R. Bauer (Eds.) *Phytomedicines of Europe- Chemistry and Biological Activity*. pp. 176-209.
- Lawson L. D. y C. D. Gardner. 2005. **Composition, stability, and bioavailability of garlic products used in a clinical trial.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (16): 6254-6261
- Lawson L. D. y Z. J. Wang. 2005. **Allicin and allicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: use in measuring allicin bioavailability.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (6): 1974-1983.
- Le Jambre, L. F., I. J. Lenane y A. J. Wardrop. 1999. **A hybridisation technique to identify anthelmintic resistance genes in *Haemonchus*.** *International Journal for Parasitology* 29 (12): 1979-1985.
- Leathwick D. M. y B. C. Hosking. 2009. **Managing anthelmintic resistance: modelling strategic use of a new anthelmintic class to slow the development of resistance to existing classes.** *New Zealand Veterinary Journal* 57 (4): 203-207.
- Lee D. L. (Ed) 2002. **The Biology of Nematodes.** CRC Press. Boca Raton, Florida U.S.A. Pp. 1-60.
- LeJambre, L. F., R. G. Windon y W. D. Smith. 2008. **Vaccination against *Haemonchus contortus*: performance of native parasite gut membrane glycoproteins in Merino lambs grazing contaminated pasture.** *Veterinary Parasitology* 153 (3): 302-312.

- Liebano H. E. 2004. **Diagnostico y control de los nematodos gastrointestinales de los rumiantes en México.** Centro Nacional de Investigación disciplinaria en Parasitología Veterinaria Libro Técnico N1. Octubre Pp. 25-67.
- Liéban H. E. 2011. **Ecología de las larvas de nematodos gastrointestinales de bovinos, ovinos y caprinos.** En: Romero, H. Q., Castillo, J. A. F., Velarde, F. I. y Arellano, M. E. L. (Ed.) Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. México, D.F. Pp 259-262.
- Lifschitz, A., G. Virkel, M. Lloberas, L. Alvarez, C. Entrocasso, M. Ballent y L. Maté. 2011. **Estrategias farmacológicas contra la resistencia a drogas antihelmínticas en ovinos: Modulación *in vivo* de la glicoproteína-P en el huésped y en los parásitos resistentes.** *Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria* 65: 448-458.
- Lkhagvatseren, S., Z. Batsukh y G. Battsetseg. 2010. **Use of indigenous plant species as treatments for helminthes in farm animals.** *Improving Livestock Production Using Indigenous Resources and Conserving the Environment* 65. Ulaanbaatar, Mongolia.
- Louvandini, H., C. F. M. Veloso, G. R. Paludo, A. Dell'Porto, S. M. Gennari y C. M. McManus. 2006. **Influence of protein supplementation on the resistance and resilience on young hair sheep naturally infected with gastrointestinal nematodes during rainy and dry seasons.** *Veterinary Parasitology* 137 (1): 103-111.
- Lubega, G. W., R. D. Klein, T. G. Geary y R. K. Prichard. 1994. ***Haemonchus contortus*: the role of two  $\beta$ -tubulin gene subfamilies in the resistance to benzimidazole anthelmintics.** *Biochemical Pharmacology* 47 (9): 1705-1715.
- Maingi, N., P. W. N. Kanyari y W. K. Munyua. 2004. **Development, survival and availability of gastrointestinal nematodes of sheep and pastures in a semi-arid area of Kajiado District of Kenya.** *Veterinary Research Communications* 28 (6): 491-501.
- Malagon, F., J. Vazquez., G. Delgado y A. Ruiz. 1997. **Antimalaric effect of an alcoholic extract of *Artemisia ludoviciana mexicana* in a rodent malaria model.** *Parassitologia* 39 (1): 3-7.
- Malan F. S. y J. A. Van Wyk. 1992. **The packed cell volume and colour of the conjunctivae as aids for monitoring *Haemonchus contortus* infestations in sheep.** In: Biennial national veterinary congress. Grahamstown: South African Veterinary Association. (1): 139.
- Mamani E y S. L. Mercado. 2014. **Efecto *in vitro* del ajo (*Allium sativum* L.) liofilizado, sobre la *Candida albicans* sp., juliaca 2009.** *Revista Estomatológica del Altiplano* 1 (1): 44-47.
- Márquez L. D. 2003. **Resistencia a los antihelmínticos: origen, desarrollo y control.** *Revista Corpoica Ceisa* 4 (1).
- Márquez L. D. 2007. **Resistencia a los antihelmínticos en nematodos de rumiantes y estrategias para su control.** Corpoica, Colombia. Pp 31 y 32.
- Martin P. J. y L. F. Le Jambre. 1979. **Larval paralysis as an *in vitro* assay of levamisole and morantel tartrate resistance in *Ostertagia*.** *Veterinary Science Communications* 3 (1): 159-164.
- Martin R. J. 1997. **Modes of action of anthelmintic drugs.** *The Veterinary Journal* 154 (1): 11-34.
- Martin, P. J., N. Anderson y R. G. Jarrett. 1985. **Resistance to benzimidazole anthelmintics in field strains of *Ostertagia* and *Nematodirus* in sheep.** *Australian Veterinary Journal* 62 (2): 38-43.

- Martínez-Ortiz de Montellano C. 2010. **Mecanismos de acción de las plantas ricas en taninos sobre la población adulta de nematodos gastrointestinales de los pequeños rumiantes.** Tesis de doctorado. Universidad de Toulouse. Mérida, Yucatán. México. Pp 1-3.
- Mehlhorn, H., S. Al-Quraishy., K. A. Al-Rasheid., A. Jatzlau y F. Abdel-Ghaffar. 2011. **Addition of a combination of onion (*Allium cepa*) and coconut (*Cocos nucifera*) to food of sheep stops gastrointestinal helminthic infections.** *Parasitology Research*, 108 (4): 1041-1046.
- Mendoza de Gives P. 2011. **Hongos que capturan, matan y se alimentan de nematodos parásitos del ganado.** En: EPIDEMIOLOGÍA DE ENFERMEDADES PARASITARIAS EN ANIMALES DOMÉSTICOS. Quiroz, R. H., Figueroa, C. J. A., Ibarra, V. F. y López, A. M. E. (Ed). D. F. México. Pp. 345-351.
- Mendoza G. P. 2000. **El uso de hongos nematófagos en programas de control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes.** En: 1er curso internacional nuevas perspectivas de diagnóstico y control de nematodos gastrointestinales en pequeños rumiantes. Universidad Autónoma del estado de Yucatán, F. M. V. Z. Yucatán, México. 130 pp.
- Mendoza-de Gives, P., C. Zapata-Nieto., E. Liebano-Hernandez., M. E. López-Arellano., D. H. Rodríguez y R. G. Garduño 2006. **Biological control of gastrointestinal parasitic nematodes using *Duddingtonia flagrans* in sheep under natural conditions in Mexico.** *Annals of the New York Academy of Sciences* 1081 (1):355-359.
- Meyvis, Y., P. Geldhof, K. Gevaert, E. Timmerman, J. Vercruysse y E. Claerebout. 2007. **Vaccination against *Ostertagia ostertagi* with subfractions of the protective ES-thiol fraction.** *Veterinary Parasitology* 149 (3): 239-245.
- Miller J. E. y D. W. Horohov. 2006. **Immunological aspects of nematode parasite control in sheep.** *Journal of Animal Science* 84 (13): 124-132.
- Miron, T., I. Shin, G. Feigenblat, L. Weiner, D. Mirelman, M. Wilchek y A. Rabinkov. 2002. **A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfonates.** *Analytical Biochemistry* 307 (1): 76-83.
- Monroy O. C. y E. P. Castillo. 2007. **Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos.** Centro de investigaciones biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México. Pp. 58-62.
- Morales, G., A. Guillén, A. Pinho, L. Pino y F. Barrios. 2010. **Clasificación por el método Famacha y su relación con el valor de hematocrito y recuento de hpg de ovinos criados en condiciones de pastoreo.** *Zootecnia Tropical* 28 (4): 545-555.
- Morales, G., E. Sandoval, L. A. Pino y D. Jiménez. 2005. **Utilización de rumiantes domésticos genéticamente resistentes a la infección por estróngilos digestivos en estrategias de control.** *Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela* 8. Maracay, Aragua, Venezuela.
- Morales, G., L. A. Pino, E. Sandoval, J. Florio y D. Jiménez. 2006. **Niveles de infestación parasitaria, condición corporal y valores de hematocrito en bovinos resistentes, resilientes y acumuladores de parásitos en un rebaño criollo Río Limón.** *Zootecnia Tropical* 24 (3): 333-346.
- Morales, G., P. L. Arelis, E. Sandoval, L. De Moreno, L. Jiménez y C. Balestrini. 2001. **Dinámica de los niveles de infección por estróngilos digestivos en bovinos a pastoreo.** *Parasitología al Día* 25(3-4): 115-120.
- Moreno, F. C., I. J. Gordon, A. D. Wright, M. A. Benvenuti y C. A. Saumell. 2010. **Efecto antihelmíntico *in vitro* de extractos de plantas sobre larvas infectantes de**

- nematodos gastrointestinales de rumiantes.** *Archivos de Medicina Veterinaria* 42 (3): 155-163.
- Morrondo P. M. P. 2008. **Desarrollo de resistencias a los antihelmínticos en nematodos gastrointestinales de rumiantes y su situación en Galicia.** *Anales de la Academia de Ciencias Veterinarias de Galicia* (1): 7-49.
- Mottier, L. y Lanusse, C. 2001. **Bases moleculares de la resistencia a fármacos antihelmínticos.** *Revista de Medicina Veterinaria-Buenos Aires* 82 (2): 74-85.
- Munn, E. A., T. S. Smith, H. Smith, F. M. James, F. C. Smith y S. J. Andrews. 1997. **Vaccination against *Haemonchus contortus* with denatured forms of the protective antigen H11.** *Parasite Immunology* 19 (6): 243-248.
- Nari A. 2001. **Diagnóstico y control de resistencia antihelmíntica en pequeños rumiantes.** En: Mem. II Congreso Latinoamericano de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. Mérida, Yucatán, México.
- Nari A. 2003. **Resistencia a los antiparasitarios.** Estado actual con énfasis en América Latina. 157: 1-51. Roma, Italia.
- Nayebzadeh, H., M. R. Seyfiabad-Shapouri, N. Hoghooghi-Rad y B. Masouri. 2008. **Immunization of Arabian sheep with whole gut homogenate of *Haemonchus contortus*.** *Iranian Journal of Veterinary Research* 9 (4): 360-364.
- Negrete, T. P., M. D. Méndez, C. J. A. Figueroa, R. H. Quiroz y N. E. Dávalos. 1998. **Efecto extensión e intensidad de moxidectina, ivermectina y fenbendazol contra nematodos gastrointestinales en ganado ovino en pastoreo en bosque.** En: Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología, Octubre 8-10, Zacatecas, México, D.F. Sociedad Mexicana de Parasitología, A.C. Pp. 60.
- Newlands, G. F. J., P. J. Skuce, D. P. Knox, S. K. Smith y W. D. Smith. 1999. **Cloning and characterization of a  $\beta$ -galactoside-binding protein (galectin) from the gut of the gastrointestinal nematode parasite *Haemonchus contortus*.** *Parasitology* 119 (05): 483-490.
- Newton S. A. y E. A. Munn. 1999. **The development of vaccines against gastrointestinal nematode parasites, particularly *Haemonchus contortus*.** *Parasitology Today* 15 (3): 116-122.
- Newton S. E. y E. N. T. Meeusen. 2003. **Progress and new technologies for developing vaccines against gastrointestinal nematode parasites of sheep.** *Parasite Immunology* 25 (5): 283-296.
- Olivares J., I. Gutiérrez y T. Valencia. 2006. **Prevalencia de nemátodos gastroentéricos en terneros predestete del trópico de Guerrero, México, Durante la época lluviosa.** *Revista Electrónica Veterinaria* 8:1-5. México.
- Panero J. L. y V. A. Funk. 2002. **Toward a phylogenetic subfamilial classification for the Compositae (Asteraceae).** *Proceedings of the Biological society of Washington* 115 (4): 909-922.
- Paraud, C., I. Pors, C. Chicard y C. Chartier. 2006. **Comparative efficacy of the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* against *Haemonchus contortus*, *Teladorsagia circumcincta* and *Trichostrongylus colubriformis* in goat faeces: influence of the duration and of the temperature of coproculture.** *Parasitology Research* 98 (3): 207-213.
- Parkins J. J. y P. H. Holmes. 1989. **Effects of gastrointestinal helminth parasites on ruminant nutrition.** *Nutrition Research Reviews* 2 (01): 227-246.

- Pérez, P. C., V. M. M. Hernández, B. P. de la Cruz, L. G. I. Bolio y B. G. I. Hernández. 2014. **Efecto antihelmíntico in vitro del extracto metanólico de hojas de *Gliricidia sepium* contra nematodos gastrointestinales de ovinos.** *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 17 (1): 105-111.
- Pino L. A. y G. Morales. 2002. **Distribución y abundancia de los huevos de estróngilos digestivos y de los ooquistes de *Eimeria* spp. en las heces de ovinos estabulados.** *Veterinaria Tropical* 27 (1): 5-15.
- Poppi, D. P., J. C. MacRae, A. Brewer y R. L. Coop. 1986. **Nitrogen transactions in the digestive tract of lambs exposed to the intestinal parasite, *Trichostrongylus colubriformis*.** *British Journal of Nutrition* 55 (03): 593-602.
- Pouliquen H. y A. Douart. 1998. **Intoxication des ruminants par le cuivre.** *Point vétérinaire* (29): 1239-1245. Maisons-Alfort, France.
- Prichard R. 2001. **Genetic variability following selection of *Haemonchus contortus* with anthelmintics.** *Trends in Parasitology* 17 (9): 445-453.
- Prichard, R. K., C. A. Hall, J. D. Kelly, I. C. A. Martin y A. D. Donald. 1980. **The problem of anthelmintic resistance in nematodes.** *Australian Veterinary Journal* 56 (5): 239-250.
- Prichard, R., M. Oxberry, Y. Bounhas, S. Sharma, G. Lubega y T. Geary. 2000. **Polymerisation and benzimidazole binding assays with recombinant  $\alpha$ - and  $\beta$ -tubulins from *Haemonchus contortus*.** In *American Association of Veterinary Parasitologists 45 Annual Meeting. Abstract* 108.
- Radostits, O. M., D. C. Blood, C. Gay y K. Hinchcliff. 2002. **Tratado de las enfermedades del ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.** 9a. ed. Mc Graw-Hill/ Interamericana de España. Madrid, España.
- Raleigh, J. M., M. R. Brandon y E. L. S. Meeusen. 1996. **Stage-specific expression of surface molecules by the larval stages of *Haemonchus contortus*.** *Parasite Immunology* 18 (3): 125-132.
- Redmond D. L. y D. P. Knox. 2004. **Protection studies in sheep using affinity-purified and recombinant cysteine proteinases of adult *Haemonchus contortus*.** *Vaccine* 22 (31): 4252-4261.
- Rocha, R. A., K. D. S. Bresciani, T. F. M. Barros, L. H. Fernandes, M. B. Silva y A. F. T. Amarante. 2008. **Sheep and cattle grazing alternately: Nematode parasitism and pasture decontamination.** *Small Ruminant Research* 75 (2): 135-143.
- Rodríguez-Vivas, R., L. A. Cob-Galera y J. L. Domínguez-Alpizar. 2001. **Frecuencia de parásitos gastrointestinales en animales domésticos diagnosticados en Yucatán, México.** *Revista Biomedica* 12: 19-25. México.
- Rojas Hernández, S., I. Gutiérrez Segura, J. Olivares Pérez y M. T. Valencia Almazán. 2007. **Prevalencia de nemátodos gastrointestinales en ovinos en pastoreo en la parte alta del MPIO. De Cuetzala del Progreso, Guerrero-México.** *Revista Veterinaria Electrónica* 8 (9):1-7.
- Romero J. R. 2005. **Alternativas al control químico de los parásitos en lanares. Resistencia a los antiparasitarios internos en Argentina.** FAO: producción y sanidad animal. Roma. Pp. 66-73.
- Romero J. R. y C. A. Boero. 2001. **Epidemiología de la gastroenteritis verminosa de los ovinos en las regiones templadas y cálidas de la Argentina.** *Analecta Veterinaria* 21 (1): 21-37.

- Roos, M. H., M. S. G. Kwa y W. N. Grant. 1995. **New genetic and practical implications of selection for anthelmintic resistance in parasitic nematodes.** *Parasitology Today* 11 (4): 148-150.
- Rúelas, R. C., D. H. Rodríguez, H. Q. Romero y S. Olazarán. 1990. **Resistencia de *Haemonchus contortus* a bencimidazoles en ovinos de México.** *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias* 28 (1): 30-34.
- Said, F. S., G. M. C. Ramos, C. B. D. Mata, V. J. Vargas y T. L. Villareal. 2005. **In vitro antiprotozoal activity of the leaves of *Artemisia ludoviciana*.** *Fitoterapia* 76 (5): 466-468.
- Sajid M. y J. H. McKerrow. 2002. **Cysteine proteases of parasitic organisms.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 12 (1):1-21.
- Salami, H. A., A. I. John y A. U. Ekanem. 2013. **The effect of aqueous preparation of *Allium cepa* (onion) and *Allium sativa* (garlic) on erythrocyte osmotic fragility in wistar rats: in vivo and in vitro studies.** *Nigeria Journal Physiological Society* 27: 029-034. Nigeria.
- Salas, G. B., M. D. Méndez, M. D., C. J. A. Figueroa y R. H. Quiroz. 1998. **Eficacia de antihelmínticos en ovinos de la raza Tabasco en trópico húmedo.** En: Memorias del XIII Congreso Nacional de Parasitología, Octubre 8-10, Zacatecas, México, D.F. Sociedad Mexicana de Parasitología, A.C. Pp. 60.
- Sangster N. C. 1999. **Pharmacology of anthelmintic resistance in cyathostomes: will it occur with the avermectin/milbemycins?** *Veterinary Parasitology* 85 (2): 189-204.
- Sangster N. C. y J. Gill. 1999. **Pharmacology of anthelmintic resistance.** *Parasitology Today* 15(4): 141-146.
- Sangster, N. C., F. L. Riley y L. J. Wiley. 1998. **Binding of [3 H] m-aminolevamisole to receptors in levamisole-susceptible and-resistant *Haemonchus contortus*.** *International Journal for Parasitology* 28 (5): 707-717.
- Sangster, N. C., H. V. Whitlock, I. G. Russ, M. Gunawan, D. L. Griffin y J. D. Kelly. 1979. ***Trichostrongylus colubriformis* and *Ostertagia circumcincta* resistant to levamisole, morantel tartrate and thiabendazole: occurrence of field strains.** *Research in Veterinary Science* 27 (1): 106-110.
- Sangster, N. C., S. C. Bannan, A. S. Weiss, S. C. Nulf, R. D. Klein y T. G. Geary. 1999. ***Haemonchus contortus*: Sequence Heterogeneity of Internucleotide Binding Domains from P-Glycoproteins and an Association with Avermectin/Milbemycin Resistance.** *Experimental Parasitology* 91 (3): 250-257.
- Santos F. C. C. y N. U. M. Carvalho. 2014. **Alcoholic tincture of garlic (*Allium sativum*) on gastrointestinal endoparasites of sheep-short communication.** *Ciência Animal Brasileira* 15 (1): 115-118.
- Sarmiento, L., M. Tantaléan y A. Huiza. 1999. **Nematodos parásitos del hombre y de los animales en el Perú.** *Revista Perú Parasitología* 14: 9-65. Perú.
- Satou, T., M. Koga, K. Koike, I. Tada y T. Nikaido. 2001. **Nematocidal activities of thiabendazole and ivermectin against the larvae of *Strongyloides ratti* and *S. venezuelensis*.** *Veterinary Parasitology* 99 (4): 311-322.
- Schallig, H. D. F. H., M. A. W. Van Leeuwen y W. M. L. Hendrikx. 1994. **Immune responses of Texel sheep to excretory/secretory products of adult *Haemonchus contortus*.** *Parasitology* 108 (03): 351-357.
- Schmidt T. J. 2006. **Structure-activity relationships of sesquiterpene lactones.** *Studies in Natural Products Chemistry Part M* (33): 309-392.

- Shalaby H. A. y T. K. Farag. 2014. **Body Surface Changes in Gastrointestinal Helminthes Following in vitro Treatment with *Allium sativum* Oil.** *Journal of Veterinary Science and Technology* 5 (1).
- Shenoy, C., M. B. Patil, R. Kumar y S. Patil. 2009. **Preliminary phytochemical investigation and wound healing activity of *Allium cepa* Linn (Liliaceae).** *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 2 (2): 167-175.
- Sievers, G., M. Jara, C. Cárdenas y J. Núñez. 2002. **Estudio anual de la eliminación de huevos y oocistos de parásitos gastrointestinales y larvas de nemátodos pulmonares en ovinos de una estancia en Magallanes, Chile.** *Archivo Médico Veterinario* 34 (1): 37-47.
- Silvestre A. y J. Cabaret. 2002. **Mutation in position 167 of isotype 1  $\beta$ -tubulin gene of *Trichostrongylid* nematodes: role in benzimidazole resistance?** *Molecular and Biochemical Parasitology* 120 (2): 297-300.
- Singh K. y S. Nagaich. 2000. **Studies on the anthelmintic activity of *Allium sativum* (Garlic) oil on common poultry worms *Ascaridia galli* and *Heterakis gallinae*.** *Journal of Parasitology and Applied Animal Biology* 9 (1): 47-52.
- Small A. J. y G. C. Coles. 1993. **Detection of anthelmintic resistance by culture in vitro of parasitic stages of ovine nematodes.** *Veterinary Parasitology* 51 (1): 163-166.
- Smith W. D. 1993. **Protection in lambs immunised with *Haemonchus contortus* gut membrane proteins.** *Research in Veterinary Science* 54 (1): 94-101.
- Smith W. D. 2008. **Recent vaccine related studies with economically important gastrointestinal nematode parasites of ruminants.** *Tropical Biomedicine* 25 (1): 50-55.
- Smith W. D. y S. K. Smith. 1993. **Evaluation of aspects of the protection afforded to sheep immunised with a gut membrane protein of *Haemonchus contortus*.** *Research in Veterinary Science* 55 (1): 1-9.
- Smith, S. K., D. Pettit, G. F. J. Newlands, D. L. Redmond, P. J. Skuce, D. P. Knox y W. D. Smith. 1999. **Further immunization and biochemical studies with a protective antigen complex from the microvillar membrane of the intestine of *Haemonchus contortus*.** *Parasite Immunology* 21 (4): 187-199.
- Smith, T. S., M. Graham, E. A. Munn, S. E. Newton, D. P. Knox, W. J. Coadwell y J. J. Oliver. 1997. **Cloning and characterization of a microsomal aminopeptidase from the intestine of the nematode *Haemonchus contortus*.** *Biochimica et Biophysica Acta-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1338 (2): 295-306.
- Smith, W. D., J. A. Van Wyk y M. F. Van Strijp. 2001. **Preliminary observations on the potential of gut membrane proteins of *Haemonchus contortus* as candidate vaccine antigens in sheep on naturally infected pasture.** *Veterinary Parasitology* 98 (4): 285-297.
- Smith, W. D., S. K. Smith y J. M. Murray. 1994. **Protection studies with integral membrane fractions of *Haemonchus contortus*.** *Parasite Immunology* 16 (5): 231-241.
- Soca, M., E. Roque y M. Soca. 2005. **Epizootiología de los nemátodos gastrointestinales de los bovinos jóvenes.** *Pastos y Forrajes* 28 (3): 175-185.
- Sommerville R. I. y K. G. Davey. 2002. **Diapause in parasitic nematodes: a review.** *Canadian Journal of Zoology* 80 (11): 1817-1840.
- Sonstegard, T. S. y L. C. Gasbarre. 2001. **Genomic tools to improve parasite resistance.** *Veterinary Parasitology* 101 (3): 387-403.

- Soulsby E. 1987. **Helminths**. En: Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7a. ed. Interamericana. México, D.F. Pp. 212-238.
- Stoll A. y E. Seebeck. 2006. **Chemical investigations on alliin, the specific principle of garlic**. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, (11): 377-400. Based, Switzerland.
- Strain, S. A. J. y Stear, M. J. 2001. **The influence of protein supplementation on the immune response to *Haemonchus contortus***. *Parasite Immunology* 23 (10): 527-531.
- Strickland, V. J., J. S. Fisher., W. T. Potts y G. W. Hepworth. 2009a. **Lack of response to garlic fed at different dose rates for the control of *Haemonchus contortus* in Merino wether lambs**. *Animal Production Science* 49 (12): 1093-1099.
- Stringfellow F. 1984. **Effects of bovine heme on development of *Haemonchus contortus* in vitro**. *The Journal of Parasitology* 70 (6): 989-990.
- Stringfellow F. 1986. **Cultivation of *Haemonchus contortus* (Nematoda: Trichostrongylidae) from infective larvae to the adult male and the egg-laying female**. *The Journal of Parasitology* 72 (2):339-345.
- Sutherland I. y I. Scott. 2009. **Gastrointestinal nematodes of sheep and cattle: biology and control**. John Wiley & Sons. United Kingdom. 179 pp.
- Sykes, A., R. y R. L. Coop. 1982. **Efectos del parasitismo sobre el metabolismo del huésped**. En: Manejo y enfermedades de las ovejas (Ed.) Acribia. Zaragoza, España. Pp. 339-350.
- Takahashi M. y T. Shibamoto. 2008. **Chemical compositions and antioxidant/anti-inflammatory activities of steam distillate from freeze-dried onion (*Allium cepa* L.) sprout**. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (22): 10462-10467
- Taylor M. A. y K. R. Hunt. 1989. **Anthelmintic drug resistance in the UK**. *The Veterinary Record* 125 (7): 143-147.
- Taylor, M. A., K. R. Hunt y K. L. Goodyear. 200. **Anthelmintic resistance detection methods**. *Veterinary Parasitology* 103 (3): 183-194.
- Thuille, N., M. Fille y M. Nagl. 2003. **Bactericidal activity of herbal extracts**. *International journal of hygiene and environmental health* 206 (3): 217-221.
- Torres-Acosta J. F. J., R. Cámara-Sarmiento, M. Pérez-Cruz, N. Soto-Barrientos, J. I. Chan-Pérez y A. J. Aguilar-Caballero. 2011. **Parásitos resistentes a los desparasitantes en los rebaños ovinos: ¿Cómo podemos controlarlos ahora?** En: R. G. Garduño, A. A. C. Berúmen A. A. C, R. Montes de Oca (Eds.) Tópicos selectos en producción ovina. Universidad Autónoma Chapingo. Tabasco, México. pp. 131-141.
- Torres-Acosta, J. F. J., B. Roberts, J. Canto-Dorantes, C. Martínez-Ortiz, J. Rodríguez, L. Canul-Ku y A. Aguilar-Caballero. 2003a. **Prevalence of sheep herds with gastrointestinal nematodes resistant to benzimidazoles, imidazothiazoles and macrocyclic lactones in Yucatán**. En: V International Seminar in Animal Parasitology. Mérida, Yucatán, México. Pp. 48-52.
- Torres-Acosta, J. F. J., R. Cámara-Sarmiento, A. J. Aguilar-Caballero, H. L. Canul-Ku y M. Pérez-Cruz. 2009. **Estrategias de desparasitación selectiva dirigida. Avances en el control de la parasitosis gastrointestinal de ovinos en el trópico**. Compilado por: Gonzalez Garduño R. y Berumen Alaforte A.C. Universidad Autónoma de Chapingo, CRUSE Tabasco, México. Pp. 50-62.
- Torres-Acosta, J. F. J., U. Dzul-Canche, A. J. Aguilar-Caballero y R. I. Rodríguez-Vivas. 2003b. **Prevalence of benzimidazole resistant nematodes in sheep flocks in Yucatan, Mexico**. *Veterinary Parasitology* 114 (1): 33-42.

- Valero R. 2006. **Actividad nematicida in vitro de filtrados de hongos nematófagos contra larvas infectantes de *Haemonchus contortus***. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Morelos, México. 114 pp.
- Vallejo C. F. A. y S. E. I. Estrada. 2004. **Producción de hortalizas de clima cálido**. Colombia. pp. 143, 145-148.
- Van Wyk J. A. y G. F. Bath. 2002. **The FAMACHA system for managing haemonchosis in sheep and goats by clinically identifying individual animals for treatment**. *Veterinary Research* 33 (5): 509-529.
- Van Wyk, J. A., H. Hoste, R. M. Kaplan y R. B. Besier. 2006. **Targeted selective treatment for worm management—how do we sell rational programs to farmers?**. *Veterinary Parasitology* 139 (4): 336-346.
- Varón L. E. S. 2015. **Fitometabolitos secundarios que inciden en el valor nutricional de *Lotus corniculatus* como forraje para rumiantes**. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* 5 (1): 131-146.
- Vásquez, H. M., G. R. González, H. G. Torres, G. D. Mendoza y R. J. M. Ruiz. 2006. **Comparación de dos sistemas de pastoreo en la infestación con nemátodos gastrointestinales en ovinos de pelo**. *Veterinaria México* 37 (1): 15-27.
- Vázquez P. V. M. 2000. **Agentes etiológicos y ciclos de vida de los nematodos gastrointestinales: 1er Curso Internacional “Nuevas Perspectivas en el Diagnóstico y Control de Nematodos Gastrointestinales en Pequeños Rumiantes”**. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Yucatán, México. Pp. 1-5.
- Vercruyse, J., T. P. Schetters, D. P. Knox, P. Willadsen y E. Claerebout. 2007. **Control of parasitic disease using vaccines: an answer to drug resistance?** *Revue Scientifique et Technique* (International Office of Epizootics) 26 (1): 105-115.
- Vervelde, L., M. A. W. Van Leeuwen, M. Kruidenier, F. N. J. Kooyman, J. F. Huntley, I. Van Die y A. W. C. A. Cornelissen. 2002. **Protection studies with recombinant excretory/secretory proteins of *Haemonchus contortus***. *Parasite Immunology* 24 (4): 189-201.
- Villaseñor Ríos, J. L y F. J. Espinosa García. 1998. **Catálogo de malezas de México**. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Von Witzendorff, C., I. Quintana, G. Sievers, T. Schnieder, y G. Von Samson-Himmelstjerna. 2003. **Estudio sobre resistencia frente a los bencimidazoles de pequeños estróngilos (*Cyathostominae*) del equino en el sur de Chile**. *Archivos de Medicina Veterinaria* 35 (2): 187-194.
- Waller P. J. 2006. **From discovery to development: current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock**. *Veterinary Parasitology* 139 (1): 1-14.
- Williams C. A. y E. D. Lamprecht. 2008. **Some commonly fed herbs and other functional foods in equine nutrition: A review**. *The Veterinary Journal* 178 (1): 21-31.
- Williamson S. M. y A. J. Wolstenholme. 2012. **P-glycoproteins of *Haemonchus contortus*: development of real-time PCR assays for gene expression studies**. *Journal of Helminthology* 86 (02): 202-208.
- Williamson, A. L., P. J. Brindley, D. P. Knox, P. J. Hotez y A. Loukas. 2003. **Digestive proteases of blood-feeding nematodes**. *Trends in Parasitology* 19 (9): 417-423.

- Williamson, V. M., M. Long y G. Theodoris. 1991. **Isolation of *Caenorhabditis elegans* mutants lacking alcohol dehydrogenase activity.** *Biochemical Genetics* 29 (7-8): 313-323.
- Wolstenholme, A. J., I. Fairweather, R. Prichard, G. Von Samson-Himmelstjerna y N. C. Sangster. 2004. **Drug resistance in veterinary helminths.** *Trends in Parasitology* 20 (10): 469-476.
- Xu, M., M. Molento, W. Blackhall, P. Ribeiro, R. Beech y R. Prichard. 1998. **Ivermectin resistance in nematodes may be caused by alteration of P-glycoprotein homolog.** *Molecular and Biochemical Parasitology* 91 (2): 327-335.
- Yates, D. M., V. Portillo y A. J. Wolstenholme. 2003. **The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*.** *International Journal for Parasitology* 33 (11): 1183-1193.
- Ye, C. L., D. H. Dai y W. L. Hu. 2013. **Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.).** *Food control* 30 (1): 48-53.
- Zárate J. 2008. Nutrición y salud: **Elementos claves en la productividad del ganado en corral.** En memorias: XIII seminario Internacional de Actualización de Engorda de Bovinos en Corral. Noviembre 6-7, León, Guanajuato.
- Zhang, S., Y. K. Won, C. N. Ong y H. M. Shen. 2005. **Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms.** *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents* 5(3): 239-249.
- Zhu, L., J. L. Dai, L. Yang y J. Qiu. 2013. ***In vitro* ovicidal and larvicidal activity of the essential oil of *Artemisia lancea* against *Haemonchus contortus* (Strongylida).** *Veterinary Parasitology* 195 (1): 112-117.