



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

“ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS Y DE MICROSCOPIA ELECTRÓNICA PARA
CONOCER LA SEGURIDAD Y MODO DE ACCIÓN CONTRA *Fasciola hepatica*
DEL EXTRACTO DE *Artemisia ludoviciana* Nutt. spp mexicana”.

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ALONSO EZETA MIRANDA

TUTOR PRINCIPAL:
DR. FROYLÁN IBARRA VELARDE
FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:
DRA. YAZMÍN ALCALÁ CANTO
FMVZ-UNAM
DR. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO
FES IZTACALA-UNAM

CD. MX.

Febrero 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

Resumen	III
Abstract	IV
Listas de cuadros	V
Listas de figuras	VI
Abreviaturas y siglas usadas	VIII
Introducción	1
1.2 Morfología <i>Fasciola hepatica</i> .	1
1.3 Clasificación de <i>Fasciola hepatica</i> .	2
1.4 Importancia económica.	2
1.5 Ciclo biológico de <i>Fasciola hepatica</i> .	3
1.6 Patogenia y patogenicidad de <i>Fasciola hepatica</i> .	7
1.7 Diagnóstico.	8
1.8 Tratamiento, prevención y control.	8
1.9 Resistencia a fasciolicidas.	10
1.10 Medicina tradicional.	12
1.11 Toxicidad.	17
1.12 Microscopía electrónica de barrido.	18
1.13 Antecedentes.	18
Justificación	20
Hipótesis	21
Objetivos	22
4.1 General.	22
4.2 Particulares.	22
Material y métodos	23
5.1 Material vegetal.	23
5.2 Elaboración de extractos crudos.	23
5.3 Colecta e infección de caracoles <i>Lymnaea</i> spp.	23
5.4 Evaluación <i>in vitro</i> de los extractos crudos.	26
5.5 Eficacia fasciolicida.	27
5.6 Fraccionamiento del extracto con mayor eficacia fasciolicida.	27
5.7 Evaluación <i>in vitro</i> de las fracciones.	27
5.8 Purificación de la fracción con mayor eficacia fasciolicida.	28
5.9 Evaluación <i>in vitro</i> de fracciones purificadas.	28
5.10 Pruebas fitoquímicas de las fracciones con mayor eficacia.	28
5.11 Cromatografía líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography (HPLC) acoplado a espectrometría de masas liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).	28
5.12 Microscopía electrónica.	28
5.12 Prueba de toxicidad aguda.	29
5.13 Prueba de toxicidad sub-crónica (dosis repetidas).	30
5.14 Análisis de datos.	32
Resultados	33
Discusión	53
Conclusiones	58
Referencias	59
Artículo publicado (portada)	72

RESUMEN

El objetivo de este estudio, fue evaluar la eficacia fasciolicida de un extracto de acetato de etilo a partir de estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*) junto con sus respectivas fracciones y la identificación de la familia de metabolitos secundarios responsables del efecto. Las pruebas fueron realizadas en fasciolas desenquistadas de forma artificial. Los extractos fueron evaluados a concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L. En cada prueba se contó con un grupo control sin tratamiento y un grupo tratado con Triclabendazol. Las fasciolas fueron examinadas a las 24, 48 y 72 horas (h) postexposición. El extracto de acetato de etilo mostró una eficacia del 100% a las 48 horas postexposición ($P<0.05$). Se fraccionó este extracto por medio de una cromatografía de columna (CC) y las fracciones obtenidas (1-14) se evaluaron de la misma forma que el extracto original. Los resultados obtenidos muestran que la fracción “3” obtuvo el 100% de eficacia a las 48 h postexposición ($P<0.05$). Esta fracción se purificó a través de una CC obteniendo subfracciones (A-L). La fracción “J” mostró el 100% de eficacia a las 24 h postexposición ($P<0.05$). Estas fracciones fueron sometidas a pruebas fitoquímicas cualitativas, demostrando la presencia de lactonas sesquiterpénicas. También fueron analizadas a través de HPLC/MS/DAD demostrando la presencia de artemisinina como el compuesto principal. Además, se llevó a cabo una prueba de microscopía electrónica de barrido (MEB) en las fasciolas afectadas mostrando zonas dañadas sobre el tegumento. Al llevar a cabo pruebas de toxicidad aguda del extracto en ratones CD-1, se determinó que la DL_{50} es de 3750 mg/Kg de peso vivo (PV) y en la prueba de toxicidad sub-crónica o a dosis repetidas se demostró que no existe daño sobre los roedores.

Palabras clave: Artemisinina, estafiate, extracto, fascioliasis, microscopía, toxicidad.

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the fasciolicidal efficacy of extract and fractions of *Artemisia ludoviciana* and identify the active substance. Extract from *A. ludoviciana* ethyl acetate. To test the extracts, newly excysted flukes were artificially obtained. The extracts were tested at concentrations of 125, 250, 375 and 500 mg/L. In each test run, an untreated control group and control wells containing triclabendazole sulfoxide were also included. The flukes were examined at 24, 48 and 72 hours after treatment. Ethyl acetate extract showed 100% efficacy at 48 hours of exposure ($P<0.05$). Then, this extract was fractionated by column chromatography, and the obtained fractions were evaluated in vitro as previously mentioned. The results indicated that fraction 3 yielded 100% efficacy at 48 h ($P<0.05$). Subsequently, the purification of fraction 3 was performed. New fractions were obtained (A-L), with fraction J exhibiting 100% efficacy at 24 hours ($P<0.05$). These fractions were submitted to phytochemical analysis, demonstrated the presence of sesquiterpene lactones. Likewise, were analyzed by HPLC/MS/DAD, and the results showed that artemisinin was the main compound. In addition, flukes treated were examined by scanning electron microscopy showing damaged areas on the tegument. When carrying out acute toxicity tests of the extract in CD-1 mice, it was determined that the LD₅₀ is 3750 mg/Kg of live weight and in the sub-chronic toxicity test or repeated doses it was shown that there is no damage on rodents.

Keywords: Artemisinin, estafiate, extract, fasciolasis, microscopy, toxicity.

LISTA DE CUADROS

1. Reportes de resistencia antihelmíntica.
2. Metabolitos secundarios más comunes y sus efectos en animales.
3. Lista de nutrientes y vitaminas utilizados para la solución de trabajo en el cultivo *in situ* de alga.
4. Grupos de ratones hembra CD-1 para la prueba de toxicidad aguda.
5. Constantes fisiológicas normales en roedores de experimentación CD-1.
6. Grupos de ratones CD-1 para la prueba de toxicidad sub-crónica (dosis repetidas).
7. Rendimientos totales de la colecta, secado y elaboración de extracto de estafiate.
8. Limneidos colectados durante el estudio.
9. Porcentaje de eficacia fasciolicida *in vitro* del extracto crudo de estafiate (*Artemisia ludoviciana*).
10. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*).
11. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de las fracciones purificadas obtenidas a partir de la fracción “3” de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*), a las 24 horas post-exposición.
12. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de las fracciones purificadas obtenidas a partir de la fracción “3” de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*), a las 48 horas post-exposición.
13. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de las fracciones purificadas obtenidas a partir de la fracción “3” de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*), a las 72 horas post-exposición.
14. Pruebas fitoquímicas realizadas al extracto de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*) y sus respectivas fracciones.
15. Promedios de las ganancias de peso (gramos), por sexo de los diferentes grupos de la prueba de toxicidad sub-crónica.

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.
2. Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*);
3. Eficacias globales de las fracciones purificadas, a partir de la fracción "3".
4. Cromatogramas del extracto de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*).
5. *Fasciola hepatica*, sin tratamiento:
 - a) *Fasciola hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento), plano dorsal.
 - b) *Fasciola hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento, plano ventral.
 - c) *Fasciola hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento), plano dorsal.
 - d) *Fasciola hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento, plano ventral.
 - e) *Fasciola hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento, ventosa oral (VO).
 - f) *Fasciola hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento, ventosa ventral (VV).
6. *Fasciola hepatica*, con tratamiento:
 - a) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 125 mg/L del extracto de estafiate (24 hrs postexposición).
 - b) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 125 mg/L del extracto de estafiate (24 hrs postexposición).
 - c) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 125 mg/L del extracto de estafiate (24 hrs postexposición).
 - d) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 125 mg/L del extracto de estafiate (24 hrs postexposición).
7. *Fasciola hepatica*, con tratamiento:
 - a) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 500 mg/L de extracto de estafiate (24 hrs postexposición).

- b) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 500 mg/L de extracto de estafiate (24 hrs postexposición).
 - c) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 500 mg/L de extracto de estafiate (24 hrs postexposición).
 - d) *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 500 mg/L de extracto de estafiate (24 hrs postexposición).
- 8. Porcentajes de mortalidad en ratones CD-1, de los diferentes grupos y por día de evaluación.
 - 9. DL₅₀ del extracto de estafiate a partir de acetato de etilo en ratones CD-1.
 - 10. Histopatología de riñón de la prueba de toxicidad aguda.
 - 11. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad aguda.
 - 12. Histopatología del timo de la prueba de toxicidad aguda.
 - 13. Histopatología del bazo de la prueba de toxicidad aguda.
 - 14. Promedios de las ganancias de peso (gramos), por sexo de los diferentes grupos de la prueba de toxicidad sub-crónica.

ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

- ADN: Ácido desoxirribonucleico.
- ADP: Adenosín difosfato.
- ASTM: American Society of Testing Materials.
- ATP: Adenosín trifosfato.
- cm: Centímetros.
- C: Grados centígrados.
- CC: Cromatografía en columna.
- CO₂: Dióxido de carbono.
- DIG: Difusión en gel.
- DL: Dosis letal.
- E: Espinas.
- ELISA: Enzyme Liked Immuno Sorbent Assay.
- FeCl₃: Cloruro férrico.
- g: Gramos.
- GDP: Ganancia de peso.
- H: Hembras.
- HD: Huésped definitivo.
- HI: Huésped intermediario.
- HPLC: High performance liquid chromatography.
- K: Potasio
- Kg: Kilogramos.
- kW: Kilowatt.
- L: Litros.
- LC-MS: Liquid chromatography-mass spectrometry.
- M: Machos.
- m: Metros.
- mA: Miliamperio.
- MEB: Microscopía electrónica de barrido.
- mg: Miligramos.
- ml: Mililitros.

- mm: Milímetros.
- MS: Materia seca.
- msnm: Metros sobre el nivel del mar.
- N: Norte.
- Na: Sodio.
- NH₃: Amoníaco.
- nm: Nanómetros.
- PO: Vía oral.
- PV: Peso vivo.
- SSF: Solución salina fisiológica.
- T: Tegumento.
- TCBZ: Triclabendazol.
- UV: Ultravioleta.
- V: Vesículas.
- VO: Ventosa oral.
- VV: Ventosa ventral.
- v/v: Porcentaje volumen-volumen.
- W: Oeste.

I. INTRODUCCIÓN

Una de las parasitosis más importantes a nivel mundial es la Fasciolosis, la cual es provocada por el trematodo *Fasciola hepatica*. Es una de las enfermedades hepáticas más importantes a nivel mundial, dentro del campo de la medicina veterinaria, ya que genera pérdidas económicas estimadas en millones de dólares (PAHO/WHO, 2003; FAO, 2003). Este parásito es de ciclo indirecto y se localiza en conductos biliares de rumiantes, suinos, équidos, conejos y ocasionalmente en el hombre, a lo largo del territorio mexicano se han encontrado prevalencias del 2 al 100% (Vera, 2011). Además, es una zoonosis importante en varios países del mundo como en Irán, Egipto, Cuba, Bolivia y Perú. Se estima que existen entre 2.4 y 17 millones de personas infectadas a nivel mundial, la vía de transmisión entre humanos se da principalmente por consumir plantas acuáticas con metacercarias adheridas o al beber agua contaminada (WHO, 2007).

Es una enfermedad que se ha extendido con el paso del tiempo debido al crecimiento de la industria ganadera a nivel mundial y factores climáticos que han permitido la adaptación y una mayor distribución geográfica del huésped intermediario (Dargie, 1987; Mas-Coma et al., 2005; Rojo et al., 2012).

1.2 Morfología de *Fasciola hepatica*.

F. hepatica es un trematodo hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado, de forma foliácea. Los adultos pueden llegar a medir de 18 a 50 mm de largo. El tegumento del parásito está cubierto de espinas dirigidas hacia atrás y al erosionar el epitelio del huésped definitivo confiere una buena alimentación por parte del parásito, además permiten mantener una adecuada posición adhiriéndose a los diferentes tejidos dentro del huésped definitivo. En su cara dorsal presenta dos ventosas, una oral y una ventral, las cuales son determinantes para la supervivencia del parásito, ya que brindan el soporte adecuado y permiten realizar los movimientos migratorios necesarios dentro de los conductos biliares. Sus órganos internos (digestivo y reproductor) son ramificados. Cuenta con dos testículos, los cuales ocupan la parte media corporal, tiene un solo ovario y útero. Los huevos pueden medir entre 130 y

150 micras de largo por 60 a 90 micras de ancho, presentan un opérculo polar, cuenta con una cáscara delgada y de tonos amarillos o dorados, conferidos por los pigmentos biliares (Fairweather et al., 1999; Vera, 2011).

1.3 Clasificación de *Fasciola hepatica* (Taylor et al., 2016)

Filo: Platyhelminthes.

Clase: Trematoda.

Subclase: Digenea.

Orden: Digenea.

Familia: Fasciolidae.

Género: *Fasciola*.

Especie: *F. hepatica*.

1.4 Importancia económica.

La crianza de rumiantes domésticos es una industria importante dentro de la economía mundial, principalmente en el mercado cárnico, lácteo, peletero y de lana. Es por eso que la medicina preventiva para el control de parasitosis es fundamental para mantener una buena salud del ganado y evitar la disminución de parámetros productivos de interés (Bowman, 2011). Las pérdidas directas asociadas a la fasciolosis se deben a la disminución en los parámetros productivos como: ganancia de peso (que puede llegar hasta un 28% de pérdida en bovinos y hasta 350 gramos por semana en ovinos), la conversión alimenticia, producción láctea (bajando entre un 5 y 14% del total de kg de leche producidos por lactación), aumento de intervalos entre partos (aumentado hasta en 20 días entre cada uno de ellos) (Quiroz, 2003; Bowman, 2004). Las pérdidas indirectas se deben principalmente a los incrementos en los costos de alimentación, debido a los trastornos nutricionales causados por la enfermedad y una pérdida en las ganancias económicas por los decomisos a nivel de rastro de las canales infectadas (Vera, 2011).

Se estiman que aproximadamente 350 millones de bovinos y 250 millones de ovinos a nivel mundial se encuentran infectados por esta enfermedad, ocasionando

pérdidas económicas entre 3000 millones y 3.2 billones de dólares a nivel mundial (Fernández et al., 2015; Mehmood et al., 2017). En México, se estiman pérdidas anuales aproximadas de \$4,239,667 de dólares (Rodríguez-Vivas et al., 2017).

Con el paso de las décadas la fasciolosis se ha convertido en una zoonosis emergente, esta enfermedad tiene una presencia en 70 países y se calcula que aproximadamente existen hasta 17 millones de personas infectadas a nivel mundial, repercutiendo en gastos importantes en salud pública (CDC, 2019; Fairweather et al., 2020; WHO, 2017).

1.5 Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.

F. hepatica presenta un ciclo de tipo indirecto, lo cual implica la presencia de un huésped intermediario (HI) para completar sus fases larvarias y un huésped definitivo (HD) para alcanzar su madurez sexual y reproductiva (Fig. 1). Una vez que el parásito adulto está alojado en los conductos biliares del HD, sus huevos son expulsados a través de la bilis y finalmente arrojados al exterior junto con las heces. En el medio ambiente y con las condiciones adecuadas de temperatura y humedad (26°C y 80%, respectivamente), comienza el desarrollo larvario dentro de los huevos y después de 2 o 3 semanas eclosionan las primeras larvas para quedar libres en el agua. A partir de aquí comienzan el resto de las fases larvarias de este trematodo, la primera de ellas es el miracidio (presenta dos manchas oculares y cilios) y puede permanecer viable hasta 24 horas en el agua, hasta localizar al HI principalmente caracoles del género *Lymnaea* spp (*L. humilis*, *L. bulimoides* y *L. cubensis*). Una vez en contacto con los caracoles, entran en ellos a través del mucus gracias a sus receptores quimiotácticos, penetrando en ellos a través de la cavidad respiratoria o del tegumento de la piel (Stuart, 1999; Bowman, 2011; Vera, 2011).

Dentro del caracol, los miracidios migran y se alojan en la glándula digestiva, en dónde se desarrolla el esporocisto. Después de un lapso aproximado de 14 días, cada uno de ellos produce y libera de 5 a 8 redias, las cuales se alojan en el hepatopáncreas. A su vez cada redia produce redias hijas y finalmente estas dan

origen a la última fase larvaria que parasita al caracol, las cercarías. Estas abandonan al HI después de 4 o 6 semanas a través de la abertura tocológica y finalmente del aparato respiratorio. Las cercarias requieren de un medio acuático para sobrevivir, de no tener estas condiciones ambientales, son capaces de permanecer en el HI por periodos de tiempo prolongados hasta que se presente las lluvias o se eleve la temperatura ambiental (Stuart, 1999; Bowman, 2011; Vera, 2011).

Una vez en el agua, las cercarias pierden la cola propulsora que las caracteriza y son capaces de adherirse en las plantas acuáticas o en la superficie inferior de la película superficial del agua, aquí es donde se forma un quiste de doble pared para formar la fase infectante del parásito, la metacercaria, la cual necesita de 24 horas de maduración. Estas son ingeridas por el HD junto con la pastura o al momento de beber agua (Stuart, 1999; Bowman, 2011; Vera, 2011).

Dentro del HD se presenta el desenquistamiento de las metacercarias en dos fases. La primera de ellas es la activación, la cual se lleva a cabo en el rumen con una atmósfera de anhídrido carbónico concentrado y una temperatura de 39°C. La segunda fase es la de emergencia y esta se lleva a cabo en el duodeno, la bilis provoca la activación enzimática de la metacercaria provocando la apertura del quiste. Una vez que la fasciola joven esta libre, se alimenta de la mucosa intestinal, abriéndose paso hasta el peritoneo, esto ocurre 24 horas después de la ingestión de estas. Comienzan a migrar hacia el hígado y penetrar la serosa del mismo, 90 horas post-ingestión, a partir de este momento las fasciolas adquieren forma lanceolada y miden entre 1 y 2 mm (Stuart, 1999; Bowman, 2011; Vera, 2011).

Dentro del parénquima hepático se alimentan y crecen por alrededor de 6 semanas. Los parásitos adultos se alojan en los conductos biliares del HD para alcanzar su madurez sexual, 40 días después de haber sido ingeridas las metacercarias. Las fasciolas se auto fecundan a partir del día 55 post-infección. Los huevos pasan al

duodeno junto con la bilis y de ahí son evacuados en las heces (Stuart, 1999; Bowman, 2011; Vera, 2011).

Es importante recalcar que entre la 5ª y 6ª semana post-infección, comienza a existir un gran crecimiento de formas jóvenes del parásito, las cuales comienzan a generar una extensa hemorragia y fibrosis hepática secundaria. En ocasiones se pueden encontrar fasciolas inmaduras en órganos como los pulmones, páncreas, linfonodos e inclusive en el feto de animales gestantes. (Stuart, 1999).

La vía de ingestión en humanos se da principalmente por consumir plantas acuáticas y semi-acuáticas con metacercarias adheridas, al regar germinados o cultivos con agua contaminada, al beber de esta agua o lavar utensilios de cocina con esta agua (CDC, 2019; WHO, 2007).



Figura 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*; 1: Los huevos son arrojados en las heces; 2: Se forma el embrión cuando los huevos tienen contacto con el agua; 3: El miracidio es liberado del huevo; 4: Los miracidios penetran al huésped intermediario (*Lymnaea* spp); 5: Los miracidios se transforman en esporocistos; 6: El esporocisto da origen a la redia; 7: La redia da origen a las cercarias, las cuales abandonan al caracol; 8: La cercaria pierde la cola y da lugar a la metacercaria, esta última se enquista en la superficie del agua o la vegetación acuática; 9: La metacercaria es ingerida por el huésped definitivo, la cual migra hacia el duodeno, para finalmente alcanzar los conductos biliares. Los parásitos adultos se autofecundan y los huevos pasan al duodeno a través de la bilis y finalmente arrojados con las heces, para cerrar el ciclo; 10: En el caso de la infección a humanos, la metacercaria es ingerida junto con el consumo de plantas acuáticas y/o el uso de agua contaminada para actividades de cocina. *Adaptado de: Centers for Disease Control and Prevention (CDC) <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>. Imágenes 1 a 9: Depto. Quimioterapia Experimental Parasitología FMVZ-UNAM; imágenes 10: www.pixabay.com.

1.6 Patogenia y patogenicidad de *Fasciola hepatica*.

Se pueden ver afectadas diferentes especies de mamíferos como los humanos, équidos, suinos, felinos, canideos, bovinos, caprinos y ovinos, siendo estos últimos los más susceptibles a la infección. La patogenia de la enfermedad depende de la cantidad de metacercarias viables ingeridas y las lesiones más importantes se presentan durante la migración hepática del parásito (Bowman, 2011; Vera, 2011).

La enfermedad puede presentarse de forma aguda casi de manera exclusiva en los ovinos, provocada por una infestación masiva de parásitos, produciendo la muerte súbita del HD. Los parásitos producen un traumatismo severo por acción mecánica e irritativa de las espinas del tegumento y subsecuentemente una respuesta inflamatoria en el hígado. Los hepatocitos son destruidos por acción de productos metabólicos tóxicos de las Fasciolas y algunos ovinos albergan esporas de *Clostridium novyi* en el hígado y puede desencadenarse una hepatitis necrótica infecciosa secundaria (Quiroz, 2003; Bowman, 2011; Vera, 2011).

La forma crónica de la enfermedad es la de mayor importancia clínica y el daño es variable en el HD, los bovinos son los más afectados en esta fase. Esta etapa se presenta cuando son ingeridas dosis moderadas y constantes de metacercarias viables, provocando un efecto acumulativo con el paso de los años. Se genera un síndrome de mala digestión en el HD debido a la obstrucción del conducto colédoco alterando el flujo normal de bilis y por ende los alimentos no pueden digerirse en su totalidad, lo que provoca una pérdida gradual de la condición corporal y debilidad progresiva. Además, se produce anemia por la acción hematófaga del parásito, diarrea, hipoproteinemia con la aparición de edemas subcutáneos, principalmente en el espacio submandibular y en el abdomen, ascitis y una calcificación de los conductos biliares (Quiroz, 2003; Bowman, 2011; Vera, 2011).

Los parásitos adultos producen diversas lesiones que van desde hemorragias, necrosis isquémica y coagulativa hasta engrosamiento de los conductos biliares, colangitis hiperplásica y fibrosis hepática. En ciertos casos, existen fasciolas

erráticas que llegan a otros órganos como pulmón, bazo, útero y músculos entre otros, después de ingresar a venas hepáticas y llegar por circulación pulmonar. En estos casos el organismo las encapsula y mueren, convirtiéndose en un hallazgo a la necropsia (Soulsby, 1987; Stuart, 1999; Quiroz, 2003; Bowman, 2011; Vera, 2011).

1.7 Diagnóstico.

El diagnóstico de la enfermedad se realiza a través de la historia clínica, la observación de los signos clínicos en animales afectados tales como diarrea, edema submandibular, anorexia, pérdida de peso y anemia, las lesiones a la necropsia y en algunos casos abortos (Bowman, 2011; Vera, 2011). En el laboratorio se utiliza principalmente la técnica de sedimentación por su eficiencia y bajo costo, ya que a través de la presencia de huevos se muestra la infección activa de parásitos maduros (Quiroz, 2003). Las técnicas inmunológicas como la inmunofluorescencia, fijación de complemento, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o difusión en gel (DIG) han sido utilizados como método diagnóstico, sin embargo, estas pruebas no diferencian entre una infección activa y una infección anterior debido a la persistencia de anticuerpos en contra de *F. hepatica*, por ende, los falsos positivos pueden presentarse de manera común (Almazán et al., 2001; Piedrafita, 2010).

Los estudios epidemiológicos sobre fasciolosis en las zonas afectadas son de suma importancia para el diagnóstico integral de la enfermedad, ubicando la presencia de los HI en épocas lluviosas. En conjunto, se puede obtener un registro adecuado sobre el carácter enzoótico de la enfermedad (Vera, 2011).

1.8 Tratamiento, prevención y control.

A través de los años, el principal tratamiento de la fasciolosis han sido los quimioterapéuticos. Existen 5 grupos principales (Torgerson y Claxton, 1999; Vera, 2005; Olachea, 2011):

1. Benzimidazoles:

- a) Carbamatos: El Albendazol produce deficiencia de energía en el parásito y subsecuentemente la muerte y el Mebendazol inhibe el paso de glucosa al parásito.
- b) Halogenados: El Triclabendazol (TCBZ) bloquea el paso de glucosa.
- c) Probenzimidazoles: La Netobimina es un fármaco que sufre dos transformaciones dentro del organismo del HD, una de ellas genera la formación de albendazol en el hígado y da el efecto fasciolicida.

2. Fenoles halogenados: El Bitionol altera el equilibrio digestivo e interfiere en la embriogénesis, el Hexaclorofenol se metaboliza y elimina por la bilis del HD, llegando directamente a los parásitos adultos, el Niclofolán es un desacoplante de la fosforilación oxidativa mitocondrial del parásito y el Nitroxinil inhibe la contracción muscular del mismo.

3. Fenoxialcanos: La Dianfenetidina actúa sobre el tegumento del parásito haciéndolo susceptible a sistemas enzimáticos.

4. Salicinidas: La Rafoxanida inhibe la formación de ATP y ADP del parásito e interfiere en su fosforilación oxidativa mitocondrial y el Closantel bloquea las rutas metabólicas del parásito, daña la cutícula y produce atrofia reproductiva.

5. Sulfonamidas: El Clorsulón inhibe el metabolismo energético de las fasciolas.

Con el paso del tiempo algunos de ellos han sido discontinuados y de todos estos grupos el más utilizado a nivel mundial ha sido los benzimidazoles, siendo el Triclabendazol el de mayor eficacia clínica, ya que a diferencia de sus competidores actúa contra todas las fases del parásito (Torgerson y Claxton, 1999; Vera, 2005; Olaechea, 2011).

Es importante recalcar que para llevar a cabo un adecuado control de *F. hepatica*, se deben de considerar tres puntos importantes (Vera, 2011):

- I. Eliminar a los parásitos adultos de todos los HD infectados en los hatos o explotaciones.
- II. Debe de existir un buen control y reducción de los HI para interrumpir las fases larvarias del parásito y disminuir la fase infectante del mismo.
- III. Una adecuada rotación de pastoreo y un correcto drenado de terrenos inundados para restar al parásito condiciones ambientales óptimas para su desarrollo.

Por lo tanto, es de suma importancia tener un diagnóstico certero y oportuno sobre la presencia del parásito en un tiempo dado y mantener una profilaxis integral permanente en zonas enzoóticas a fasciolosis (Vera, 2011).

1.9 Resistencia a fasciolicidas.

Por desgracia, debido al uso indiscriminado de estos medicamentos junto con la mala prevención y diagnóstico ha permitido la generación y aumento de resistencia antihelmíntica a estos fármacos en diferentes partes del mundo como Estados Unidos, Australia, Brasil (Kaplan et al., 2012; Kelley et al., 2020), Argentina, Uruguay (Ceballos et al., 2019; Olaechea et al., 2011), Perú (Ortiz et al., 2013), Chile (Romero et al., 2019) y en diversos países de Europa (Hanna et al., 2015; Kamaludeen et al., 2019; Moll et al., 2000; Novobilsky et al., 2016; Rojo et al., 2012) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Reportes de resistencia antihelmíntica.

AÑO	PAÍS O REGIÓN	HUÉSPED			REFERENCIA
		Ovinos	Bovinos	Humanos	
1995	Australia	+			Overend y Bowen, 1995.
1998	Escocia	+			Mitchell et al., 1998.
2000	Holanda	+	+		Moll et al., 2000; Gaasenbeek et al., 2001.
2000	Gales	+			Thomas et al., 2000.
2006	España	+			Álvarez-Sanchez et al., 2006.
2009	Irlanda	+			Mooney et al., 2009.
2011	Escocia	+			Sargison y Scott, 2011.
2011	Argentina		+		Olaechea et al., 2011.
2012	Gales y Escocia	+			Daniel et al., 2012.
2012	Escocia	+			Gordon et al., 2012.
2012	Holanda			+	Winkelhagen et al., 2012.
2012	Nueva Zelanda	+			Hassell y Chapman, 2012.
2013	Perú		+		Ortiz et al., 2013.
2014	Chile			+	Gil et al., 2014.
2014	Australia		+		Brockwell et al., 2014.
2015	Australia		+		Elliot et al., 2015.
2015	Irlanda (Norte)	+			Hanna et al., 2015.
2015	Turquía			+	Gülhan et al., 2015.
2016	Suecia	+			Novobilsky et al., 2016.
2019	Gales, Inglaterra	+			Kamaludeen et al., 2019.
2019	Argentina	+			Ceballos et al., 2019.
2019	Chile		+		Ceballos et al., 2019.
2019	Uruguay	+			Romero et al., 2019.
2020	Australia		+		Kelley et al., 2020.

Aunque aún no se sabe a ciencia cierta los mecanismos de resistencia a los fármacos por parte del parásito, se han postulado tres teorías (Fairweather et al., 2020):

- I. El TCBZ actúa interrumpiendo el ensamblaje de micro-túbulos, interactuando específicamente con la subunidad proteica β -tubulina, ocasionando una disrupción del citoesqueleto. Se presume que existen mutaciones dentro de esta subunidad que impiden la unión del fármaco y generan la resistencia por parte del parásito.
- II. Se ha propuesto que existe una disminución en la absorción intracelular del fármaco debido a un incremento de la glicoproteína-P, la cual actúa como transportador de membrana disminuyendo la concentración del mismo.
- III. Finalmente, se menciona la existencia de un sistema enzimático que disminuye la acción del fármaco, alterando el metabolismo del mismo y transformándolo en metabolitos inertes.

En la actualidad, aún se siguen realizando estudios necesarios para corroborar o indagar la causa exacta de la resistencia antihelmíntica por parte de los trematodos.

1.10 Medicina tradicional.

Una alternativa a esta problemática es la medicina herbal o el uso de extractos de plantas con efecto parasitocida. Desde hace siglos la humanidad ha tenido el conocimiento sobre el uso de diversas plantas medicinales y de acuerdo con cada región geográfica varía su presencia y sus usos debido a la influencia de factores culturales e históricos. La medicina tradicional se define como la suma total de conocimientos, técnicas y procedimientos basados en las teorías, creencias y experiencias indígenas de diferentes culturas, sean explicables o no, utilizados para el mantenimiento de la salud, así como la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades físicas y mentales (OMS, 2002).

Esta gran diversidad ha generado un vasto acervo de información sobre el uso de plantas como tratamientos a diversas afecciones. En muchos de estos casos ha sido gracias a la observación sobre los animales, ya que es sabido que algunos de ellos ingieren ciertas plantas en vida silvestre cuando se sienten afectados por alguna patología (Evans, 2012).

El uso terapéutico de las plantas ha experimentado grandes variaciones a lo largo de la historia, pero su utilidad medicinal está demostrada. Se pueden encontrar registros en la medicina ayurvédica hindú y en la china, junto con la acupuntura y otras técnicas; también desempeñan un papel muy importante en la terapia ecológica espiritual de los indios norteamericanos y sus constituyentes son la base para la fabricación de medicamentos utilizados en medicina “ortodoxa”. Hasta hace un poco más de medio siglo, la mayoría de los medicamentos que figuraban en las farmacopeas se fabricaban a partir de plantas. Desde el momento en que empezaron a desarrollarse y perfeccionar las técnicas de síntesis química, se inició un descenso aparente en el uso de plantas medicinales. Hoy en día la popularidad de las plantas medicinales va en aumento y sus múltiples efectos están siendo avalados por estudios científicos (Evans y Hoffman, 2012).

Todos los efectos que proporcionan las plantas son ocasionados por metabolitos o moléculas sintetizadas como intermediarios o como productos de procesos metabólicos esenciales para su reproducción y defensa de las diferentes especies. Los metabolitos primarios son aquellos que se sintetizan a partir de reacciones que se inician con el CO₂ y la fotosíntesis, obteniendo principalmente aminoácidos, azúcares, proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, los cuales ayudan a la fisiología de la planta. Los metabolitos secundarios son los que se derivan de las rutas primarias y básicamente son utilizados para las interacciones bióticas, defensa y preservación de las plantas, tales como los alcaloides, glicósidos, saponinas, taninos, etc. (Wink, 1988; Bhalla et al., 2005).

Estos metabolitos secundarios presentan una alta actividad biológica debido a las funciones defensivas en contra de bacterias, hongos, parásitos, depredadores, etc. Además, estos compuestos también tienen la capacidad de limitar los beneficios nutricionales disponibles en las plantas al momento de ser consumida por un herbívoro y es por eso que son parte de los llamados factores anti-nutricionales de las plantas. Los efectos de estos varían de acuerdo con la familia de metabolitos

presentes y sus respectivas interacciones, algunos de estos pueden proporcionar un efecto benéfico para problemas de salud en función de ingerir concentraciones bajas y otros pueden ser tóxicos para diferentes especies (Huffman, 2003; Gemedé *et al.*, 2014).

A continuación, se muestra un cuadro con las familias de metabolitos secundarios más comunes y su efecto directo en animales:

Cuadro 2. Metabolitos secundarios más comunes y sus efectos en animales.

Familias de metabolitos secundarios	Efectos
Alcaloides	Altera la modulación de canales iónicos, pueden ser altamente tóxicos.
Alcaloides isoquinolínicos	Intercalación de ADN, interacción con receptores, produce espasmos musculares, son tóxicos y confieren sabor amargo.
Alcaloides quinolizidínicos	Unión a receptores de acetilcolina, son tóxicos y confieren sabor amargo.
Alcaloides tropánicos	Inhibición de receptores de acetilcolina, pueden ser altamente tóxicos.
Alcaloides pirrolizidínicos	Efecto mutagénico y carcinogénico, son hepatotóxicos.
Glicósidos cianogénicos	Inhibe el proceso respiratorio.
Glicósidos cardiogénicos	Inhibición de $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPasa}$, son altamente tóxicos.
Terpenos	Diuréticos y confieren un sabor amargo.
Terpenos volátiles	Efecto antibiótico e irritante al contacto.
Monoterpenos volátiles	Efecto antibiótico y confieren olores aromáticos.
Saponinas	Compuestos detergentes para biomembranas, confieren un sabor amargo.
Saponinas triterpenoides	Compuestos detergentes para biomembranas, pueden ser tóxicos y eméticos.
Sesquiterpenos, pirrolizidenos	Efectos mutagénicos y carcinogénicos, son irritantes al contacto, son citotóxicos y hepatotóxicos.
Convalatoxina	Inhibición de $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPasa}$, son altamente tóxicos y confieren un sabor amargo.
Antraquinonas	Efecto purgante y pueden ser tóxicos.
Fenoles	Astringentes y reducen la digestibilidad de las plantas.
Celulosa Hemicelulosa Ligninas	Polímeros que forman parte estructural de las plantas y son indigestibles.

*Adaptado de Huffman, 2003.

Estas biomoléculas activas extraídas de las plantas presentan eficacia terapéutica muy similar a los fármacos sintéticos, por lo cual son usados en diversas ramas de la medicina ya sea como antibacteriales, antimicóticos, inmunoestimulantes, antiparasitarios, etc. (Rai et al., 2012).

Una de las plantas que ha mostrado un buen potencial medicinal en diferentes ámbitos es el estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*) (Fig. 2), pertenece a la familia Asteraceae, crece erguida y puede alcanzar alturas de 1 a 1.5 m, sus hojas se dividen en tres y pueden llegar a medir 15 cm de largo, cuando son jóvenes las hojas son de un color blanquecino-grisáceo y verde oscuro al madurar, la época de floración se presenta entre septiembre y noviembre, las flores son de un tono amarillento y al momento de triturarse despiden un aroma característico. Está adaptada para climas cálidos, semisecos y templados, se localiza desde Canadá hasta Guatemala, tiene una distribución altitudinal de hasta 3900 msnm. En México es común encontrarla en diferentes estados del norte y el centro, principalmente en las zonas del altiplano, tiene un ciclo de vida continuo y es capaz de adaptarse a una gran variedad de terrenos, ya sean bosques tropicales o terrenos de cultivos abandonados con la maleza o la “mala hierba”, por lo cual es catalogada como ruderal debido a su crecimiento en zonas alteradas por los seres humanos (CONABIO; BDMTM/UNAM, 2009).

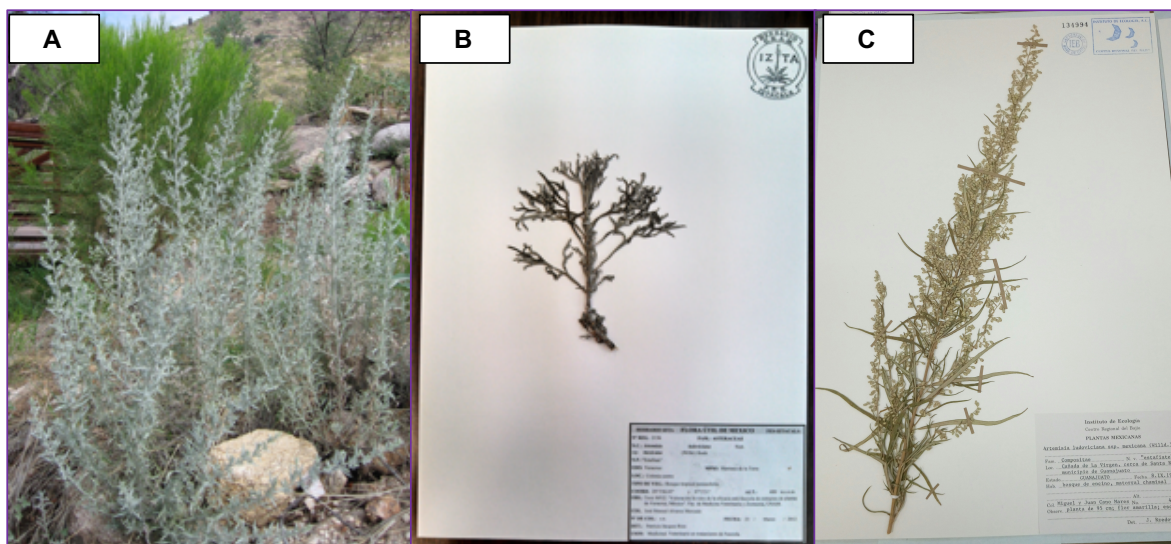


Figura 2. Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp. *mexicana*); A) Crecimiento en campo. B) Ejemplar de herbario FES-Iztacala UNAM. C) Ejemplar de herbario Instituto Nacional de Ecología (INECOL), Centro Regional del Bajío.

Su uso medicinal es amplio y se utiliza para aliviar afecciones respiratorias, como emenagogo y principalmente para tratar problemas gastrointestinales como la diarrea, cólicos, dispepsia, gastritis, estreñimiento, falta de apetito, etc. Uno de los usos más reconocidos es como vermífugo en humanos, aconsejándose tomar un té de esta planta sola o en compañía de otras como la hierbabuena o el epazote (Aguilar et al., 1994; BDMTM/UNAM, 2009; Cano, 1997; Rzedowsky et al., 2013).

1.11 Toxicidad.

Sin embargo, antes de utilizar o hacer uso de cualquier planta como una opción viable de algún tratamiento, es necesario conocer el grado de toxicidad de estas. Por lo que es fundamental realizar pruebas de toxicidad *in vitro* e *in vivo*. Es importante de recalcar que ambos son complementarios y se realizan de manera secuencial (Cameán y Repetto, 2006). Una de las más útiles son los ensayos de toxicidad aguda, ya que a través de estas se puede saber el grado de inocuidad de la sustancia bajo estudio (Córdoba, 2006). Una de las especies animales utilizadas para estas técnicas son los ratones, debido a su facilidad de manejo y costos de mantenimiento (Shayne, 2007).

1.12 Microscopía electrónica de barrido.

Los estudios de microscopía electrónica son de suma importancia para determinar los efectos de los compuestos sintéticos, semisintéticos y naturales sobre los parásitos. La mayoría de los fasciolicidas comerciales actúan directamente sobre el tegumento de *F. hepatica* alterando sus funciones principales de protección y osmorregulación (Rivera et al., 2004; Walker et al., 2004; Shalaby et al., 2009).

1.13 Antecedentes.

Se han llevado a cabo diversos estudios con respecto a la eficacia de diferentes extractos de plantas contra distintas especies de parásitos, en donde se ha demostrado eficacia parasitocida *in vitro*, por ejemplo, se han logrado inhibiciones de hasta un 91.2% de larvas L3 de *Haemonchus contortus*, utilizando extractos de Huizache (*Acacia pennatula*), Leucaena (*Leucaena leucocephala*) y Tzalam (*Lysiloma latisiliquum*) (Alonso et al., 2008a); reducciones del conteo de huevos en heces de hasta un 40.2% de *Haemonchus* spp y *Trichostrongylus colubriformis*, utilizando aceite esencial de Orégano (*Lippia sidoides*) (Alonso et al., 2008b); se ha demostrado un efecto antihelmíntico *in vitro* con parásitos adultos de *Paramphistomum explanatum*, con un extracto metanólico de Machiguá (*Dregea volubilis*) a diferentes concentraciones, provocando la parálisis del parásito hasta en 8.83 minutos y la muerte del mismo hasta en 10.67 minutos (Hossain et al., 2011); se han logrado mortalidades *in vitro* de hasta el 100% de parásitos adultos de *Paramphistomum cervi*, de diferentes extractos obtenidos a partir de las hojas de *Euphorbia hirta*, Guayaba (*Psidium guajava*), Ricino (*Ricinus communis*), Tamiel (*Solanum trilobatum*) y Cadillo (*Tridax procumbens*) (Zahir et al., 2012), entre otros estudios.

Por otro lado, estudios *in vitro* recientes han demostrado un efecto fasciolicida de extractos crudos de distintas plantas como Tila (*Tilia mexicana*), Café (*Coffea arabica*), Tila roja (*Ternstroemia pringlei*), Níspero japonés (*Eriobotrya japonica*), entre otras, mostraron eficacias entre 95 y 100% en concentraciones de 50 a 500

mg/L (Vera et al., 2008). En otros estudios, extractos de Guayaba (*Psidium guajava*), Zapote blanco (*Casimira edulis*) y *Vernonanthura patens*, alcanzaron eficacias del 100%, en concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L, siendo *V. patens* la más efectiva de las tres plantas (Francisco, 2015).

Con respecto a los trabajos relacionados con extractos crudos con diferentes solventes, se tiene al Ajenjo dulce (*Artemisia annua*) y al Ajenjo (*Artemisia absinthium*) quienes presentaron 100% de actividad fasciolicida en formas adultas del parásito a las 23 y 70 horas post-exposición respectivamente, a una concentración de 2 mg/mL (Ferreira et al., 2011). En otro trabajo extractos realizados con hexano a partir de hojas y flores de Milenrama (*Achillea millefolium*), Menta (*Mentha piperita*), Orégano (*Lippia graveolens*), Epazote de zorrillo (*Chenopodium graveolens*), Muicle (*Justicia spicigera*), Álamo blanco (*Populus alba*), Estafiate (*Artemisia mexicana*), entre otras, demostraron tener 100% de eficacia fasciolicida desde las primeras 24 post-exposición a una concentración de 500 mg/L (Ibarra et al., 2012a). En otra investigación, en fasciolas jóvenes recién desenquistadas, con extractos obtenidos a partir de solventes de distinta polaridad de Estafiate (*Artemisia mexicana*), Gordolobo (*Bocconia frutescens*), Gandul (*Cajanus cajan*), Lantana (*Lantana camara*), y Hierba santa (*Piper auritum*) mostraron efecto antihelmíntico en concentraciones de 125 mg/L hasta 500 mg/L (Álvarez et al., 2015), siendo el estafiate una de las que alcanza eficacias superiores al 90% en sus diferentes concentraciones de evaluación, mostrando así resultados prometedores.

II. JUSTIFICACIÓN

La problemática surgida por la resistencia antihelmíntica y contaminación ambiental a nivel mundial ha motivado el desarrollo de nuevas estrategias y alternativas para el control de la fasciolosis. Una de estas ha sido el uso de diversas especies de plantas, de las cuales se puedan obtener efectos fasciolicidas derivados de sus metabolitos secundarios.

El estafiate (*A. ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*) ha mostrado una alta eficacia fasciolicida, bajo condiciones *in vitro*. Sin embargo, es necesario determinar su verdadera eficacia fasciolicida *in vivo*, el daño que se produce en el parásito postexposición y la inocuidad de este en organismos vivos. Por esta razón es importante identificar el compuesto involucrado en el efecto para determinar su posible aplicación futura como una alternativa de tratamiento en contra de esta parasitosis.

III. HIPÓTESIS

Los extractos de estafiate han mostrado eficacias fasciolicidas *in vitro* superiores al 90%, razón por la cual podría considerarse como una opción para el tratamiento integral de la fasciolosis. Sin embargo, antes de proponerlo como una alternativa, es necesario que sea inocuo e inofensivo, por lo tanto, se espera que al administrarlo en condiciones *in vivo* a ratones CD-1, no genere efectos dañinos sobre el organismo de los roedores.

La mayoría de los fasciolicidas producen cambios ultraestructurales a nivel del tegumento del parásito, por lo que se espera que el mecanismo de acción del extracto de estafiate (*A. ludoviciana*), genere un daño similar.

IV. OBJETIVOS

4.1 General.

Realizar estudios toxicológicos y de microscopía electrónica para conocer la seguridad en forma parcial y modo de acción del extracto de Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*), contra *Fasciola hepatica*.

4.2 Particulares.

- a) Colectar e identificar material vegetal de Estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*), de región tropical cálida.
- b) Elaborar extracto crudo de acetato de etilo a partir del material vegetal seco.
- c) Colectar, identificar, cultivar e infectar a caracoles del género *Lymnaea* spp como huésped intermediario (HI) de *Fasciola hepatica*, para la obtención de fases infectantes o metacercarias en condiciones *in vitro*.
- d) Realizar bioensayos *in vitro* para determinar la eficacia fasciolicida del extracto de estafiate, realizado a partir de acetato de etilo.
- e) Llevar a cabo la separación del extracto crudo, para obtener fracciones y corroborar e identificar los metabolitos con el probable efecto fasciolicida.
- f) Determinar las familias de metabolitos secundarios y/o el compuesto dentro del extracto y fracciones, a través de pruebas fitoquímicas cualitativas y cuantitativas.
- g) Corroborar el daño al parásito, por parte del extracto crudo, con ayuda de pruebas de microscopía electrónica de barrido (MEB).
- h) Determinar la toxicidad del extracto crudo en roedores.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Material vegetal.

Se recolectaron en febrero del 2017 sólo hojas sanas de Estafiate (*A. ludoviciana*), de acuerdo a la metodología descrita por Monroy et al. (2007) y Rodríguez et al. (2009) en las inmediaciones del Centro de Enseñanza, Investigación y Extensión en Ganadería Tropical (CEIEGT), de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ), de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), ubicado en Martínez de la Torre – Tlapacoyan, municipio de Tlapacoyan (20° 03' N; 93° 03' W; 151 msnm), Veracruz, México. Además, se colectó un ejemplar completo de la planta para su identificación taxonómica en el herbario de la Facultad de Estudios Superiores (FES)-Iztacala, la cual quedó registrada con la clave 2156 IZTA. El criterio de selección se basó en reportes previos (Álvarez et al., 2015; Ibarra et al., 2012).

5.2 Elaboración de extractos crudos.

Las hojas fueron secadas a una temperatura constante de 60°C durante tres días y después fueron molidas y extraídas por maceración en frío con acetato de etilo como solvente orgánico en una proporción 1:5 (MS:solvente), a partir de ahí el extracto se concentró a sequedad mediante destilación a presión reducida en un rota-evaporador Heidolph® Mod. Laborota 4000 a baja presión (Harnborne, 1970). Los extractos obtenidos se almacenaron en envases de vidrio a una temperatura de 4°C, hasta la evaluación *in vitro*. Todo esto se llevo a cabo en las instalaciones del laboratorio de Fitoquímica de la Unidad Biológica de Prototipos (UBIPRO) de la FES-Iztacala UNAM.

5.3 Colecta e infección de caracoles *Lymnaea* spp.

Para llevar a cabo los bioensayos de eficacia fasciolicida, eran necesarias las fases infectantes de *F. hepatica*, por esta razón se llevaron a cabo cultivos e infección en laboratorio de huéspedes intermediarios para la obtención de metacercarias.

Se colectaron caracoles *Lymnaea cubensis* y *L. bulimoides* en diferentes puntos del municipio de Jilotepec y Chapa de Mota, ambos del Estado de México, estos fueron identificados con ayuda de claves taxonómicas en el laboratorio de Moluscos del Instituto de Biología de UNAM. En conjunto se colectó tierra nativa y alga de la zona para suministrar alimento, una parte de esa alga se separó para realizar una identificación taxonómica (Alcibar et al., 1985).

Posteriormente fueron transportados al laboratorio de Malacología del Depto. Parasitología de la FMVZ-UNAM. Una vez en el laboratorio, fueron colocados en macetones de barro para mantener una temperatura y humedad controladas. Cada tercer día se llevó a cabo la colecta de masas ovígeras, para obtener a partir de estas las generaciones de caracoles necesarios para la infección *in vitro*.

Los caracoles recién eclosionados se colocaron en cajas de Petri con tierra previamente esterilizada y alga sembrada para controlar su crecimiento. Cada tercer día se monitorearon hasta cumplir tres o cuatro semanas de vida para llevar a cabo la infección.

Para llevar a cabo la infección *in vitro* de los caracoles, se colectaron huevos de *F. hepatica* de vesículas biliares de bovinos infectados en el rastro municipal de Toluca, Estado de México. Una vez recuperados los huevos, se mantuvieron en incubación a una temperatura constante de 26°C durante 15 días, para favorecer la formación del miracidio. Al pasar este tiempo, los huevos fueron expuestos a luz artificial para permitir la liberación de estos (Alcibar et al., 1985; Flores, 2017; Olazabal et al., 1999).

Los caracoles fueron separados de forma individual y expuestos a 3 o 5 miracidios cada uno, durante 2 a 4 horas para permitir la infección. Una vez pasado este lapso, los caracoles se regresaron a sus respectivas cajas de Petri y se monitorearon por 42-45 días (Alcibar et al., 1985; Flores, 2017). Al término de este tiempo, los caracoles infectados fueron sometidos a estrés térmico con ayuda de una bombilla

eléctrica, por aproximadamente 6 a 24 horas para facilitar la liberación de metacercarias (Flores, 2017). Una vez liberadas, se dejaron madurar durante 24 horas en el medio acuoso y finalmente se conservaron a una temperatura de 4°C hasta la evaluación *in vitro*.

A la par, se realizó la identificación, aislamiento y cultivo del alga colectada en campo para mantener una fuente constante de alimento para los caracoles (Vera, 1985). Esto se llevó a cabo en las instalaciones del laboratorio de Ficología del IB de la UNAM. El alga colectada fue separada con ayuda de un cernidor de la tierra y materia orgánica presente, se colocaba en agua limpia durante 24 horas y al pasar ese tiempo era sembrada en tierra, previamente colocada en unos macetones de barro. Para favorecer el crecimiento del alga *in situ*, se llevó a cabo la preparación de una solución de trabajo con macronutrientes y micronutrientes, de acuerdo con la formulación descrita por Guillard y Ryther (1973) (cuadro 3) para medio de cultivo f/2 y cada semana se agregaba una cantidad constante de la solución.

Cuadro 3. Lista de nutrientes y vitaminas utilizados para el medio de cultivo f/2 de trabajo en la adaptación *in situ* de alga.

ELEMENTO	CANTIDAD*	
Nitrato de sodio	75 mg	Macronutrientes
Fosfato de sodio	5 mg	
Cloruro férrico	3.150 mg	Micronutrientes
Sulfato de zinc	0.022 mg	
Cloruro de cobalto	0.010 mg	
Cloruro de manganeso	0.180 mg	
Molibdato de sodio	0.006 mg	
Sulfato cúprico	0.010 mg	Vitaminas
Biotina (B6)	1 µg	
Cianocobalamina (B12)	2 µg	
Tiamina (B1)	1 µg	

*Cantidad final por litro de agua bidestilada.

Una vez que el alga se adaptó al crecimiento en otro microambiente, se colectó una cantidad para realizar el aislamiento *in vitro*. Para llevar a cabo la producción del alga, se utilizó una solución estéril de medio BG 11 Cianobacterias (solución de agua dulce) 50x de SIGMA-ALDRICH®, lote # RNBH3657 al 4% con un sistema de aireación constante y periodos de luz sintética/obscuridad por intervalos de 12 horas para favorecer su crecimiento (Romo, 2002; Fuenmayor et al., 2009).

5.4 Evaluación *in vitro* de los extractos crudos.

Estas pruebas *in vitro* fueron realizadas en el laboratorio de Quimioterapia Experimental del Depto. Parasitología de la FMVZ-UNAM. Para el bioensayo de eficacia fasciolicida del extracto crudo obtenido, se utilizaron fasciolas desenquistadas artificialmente. Las metacercarias fueron expuestas a ditionato de sodio como medio de activación durante hora y media a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO₂. Una vez pasado este período, se colocaron en un medio de emergencia formado por solución de Hank y bilis de bovino durante dos horas y medio bajo las mismas condiciones de incubación, finalmente las fasciolas desenquistadas fueron suspendidas en medio de cultivo Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640® y suero de bovino, procedimiento descrito por Ibarra y Jenkins (1984).

Para reconstituir el extracto crudo seco y obtener las diferentes concentraciones a trabajar, se realizó una solución madre con una concentración de 500 mg/L en 10 mL de agua destilada, a partir de esta se realizaron diluciones dobles para obtener las concentraciones correspondientes. Las fasciolas fueron expuestas por triplicado a las concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L del extracto, incorporando los correspondientes controles de cada solvente para corroborar que por sí solo no afecta al parásito y los controles negativos sin ningún tratamiento. Adicionalmente, se colocaron pozos de controles positivos, utilizando como fármaco de referencia se TCBZ a las concentraciones de 10 y 50 mg. Este procedimiento se realizó en cajas de cultivo celular NUNC® de 24 pozos, en cada uno de ellos se colocó 1.6 mL de medio RPMI, 0.2 ml de extracto solubilizado y 0.2 mL conteniendo 10 fasciolas.

Las lecturas de la prueba se llevaron a cabo a las 24, 48 y 72h postexposición, utilizando un microscopio invertido a 40x. Durante este periodo de prueba las cajas se mantenían en incubación de 37°C y 5% de CO₂. Todos los procedimientos descritos fueron realizados bajo condiciones asépticas utilizando una campana de flujo laminar (Álvarez et al., 2015).

5.5 Eficacia fasciolicida.

La eficacia anti-fasciola se midió comparando la sobrevivencia del grupo tratado con relación al grupo control (Wood et al., 1995):

$$Eficacia (\%) = \frac{\text{No. fasciolas grupo control} + \text{No. fasciolas grupo tratado}}{\text{No. fasciolas grupo control}} \times 100$$

5.6 Fraccionamiento del extracto con mayor eficacia fasciolicida.

Una vez llevado a cabo la evaluación fasciolicida del extracto, se fraccionó por un sistema de cromatografía de columna abierta (CC) y utilizando un gel de sílice F254 (tamaño de partícula de 0.063 – 0.200 mm, Merk malla 70-230 ASTM) como fase estacionaria. La fase móvil estuvo conformada por solventes de polaridad ascendente en distintas proporciones (diclorometano:metanol, metanol, metanol:agua y agua). Las fracciones fueron separadas con base en las diferencias cromatográficas de acuerdo a su patrón de corrimiento cromatografía de capa fina en placas con base de gel sílice G25 y usando como agente revelador luz ultravioleta (UV) en longitud de onda corta (254 nm) y en longitud de onda larga (365 nm) (Wagner y Bladt, 1998; Stahl, 1969).

5.7 Evaluación *in vitro* de las fracciones.

Las fracciones obtenidas se evaluaron *in vitro*, con el mismo procedimiento descrito anteriormente para el extracto crudo. En este caso se trabajaron concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L de cada una de las fracciones.

5.8 Purificación de la fracción con mayor eficacia fasciolicida.

La fracción que presentó una eficacia superior al 90%, se purificó preparando un segundo sistema de CC separando cada fracción de acuerdo a su comportamiento en cromatografía de placa fina.

5.9 Evaluación *in vitro* de fracciones purificadas.

Las fracciones purificadas fueron evaluadas *in vitro* como sus antecesoras, en las concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L de cada una de ellas.

5.10 Pruebas fitoquímicas de las fracciones con mayor eficacia.

Aquella(s) fracción(es) que presentaron eficacias superiores al 90%, se les realizó un análisis fitoquímico mediante reacciones coloridas para determinar el perfil fitoquímico general y poder señalar algunas de las familias de metabolitos secundarios presentes en la fracción y que son responsables del efecto fasciolicida (Shukla et al., 2013; Rivas et al., 2016).

5.11 Cromatografía líquida de alta eficacia o high performance liquid chromatography (HPLC) acoplado a espectrometría de masas o liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS).

Para llegar a la identificación exacta de la familia de metabolitos secundarios con el probable efecto fasciolicida, se llevó a cabo un análisis mediante HPLC del extracto de estafiate (*A. ludoviciana*) con mayor eficacia y sus fracciones correspondientes que de igual manera presentarán eficacias superiores al 90 % (Latif y Sarker, 2012; Romero et al., 2007).

El sistema HPLC utilizado está conformado por un detector PDA (210–350 nm) con una columna Nucleodex β -OH Machery Nagel 720124 (200 mm $\times$ 4 mm, 5 μ m). Las muestras fueron analizadas usando un gradiente de 0.1% de ácido fórmico mezclado en agua (v/v), 0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo (v/v) y 0.1% ácido fórmico en metanol (v/v). La concentración inicial de los extractos, fracciones fue de

1,000 ppm. El volumen de inyección fue de 20 μ L y la concentración se expresa en mg de compuesto / 1 mg de extracto de planta.

5.12 Microscopía electrónica.

Para elucidar el daño provocado al parásito por efecto directo del extracto, se realizaron pruebas de microscopía electrónica de barrido (MEB). Para ello se recuperaron las fasciolas tratadas con el extracto a las concentraciones de 125 y 500 mg/L, además de los grupos sin tratamiento para su comparación.

Los parásitos fueron lavados con solución salina fisiológica al 9% (SSF) y fijados en formol al 2% durante 24 horas, pasado ese tiempo fueron lavados nuevamente con SSF y deshidratados en series ascendentes de etanol y mantenidos a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, los especímenes fueron secados a su punto crítico con dióxido de carbono extra seco (CO_2). Una vez secos, los parásitos fueron fijados en tiras adhesivas de carbón y colocados en bases de aluminio, fueron recubiertas con una película de oro de 20 mA durante 2 minutos (Acevedo et al., 2019). Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico de barrido S450 Hitachi© de 10 – 15 kW, dentro de las instalaciones del Instituto de Biología de la UNAM.

5.12 Prueba de toxicidad aguda.

Para conocer el grado de toxicidad se utilizaron 50 ratones hembra CD-1 de 8 semanas de edad y un peso entre 25 y 30 gramos. Se formaron 5 grupos, con 10 ratones cada uno, en el siguiente cuadro se muestra cómo se organizaron (cuadro 4):

Cuadro 4. Grupos de ratones hembra CD-1 para la prueba de toxicidad aguda.

GRUPO	TRATAMIENTO
1	Control negativo (sin tratamiento)
2	Control positivo (Carboximetilcelulosa 1%)
3	Extracto 1250 mg/Kg
4	Extracto 2500 mg/Kg
5	Extracto 5000 mg/Kg

A todos los grupos se les administró una sola dosis, el extracto de *A. ludoviciana* fue reconstituido con 1% de Carboximetilcelulosa y fue administrado vía oral (PO) con ayuda de una sonda esofágica del #12, a las dosis de 1250, 2500 y 5000 mg/Kg de peso vivo (PV). Los animales fueron observados durante una hora post-administración para evaluar su estado físico y determinar si había algún cambio en su comportamiento, la observación se llevó a cabo cada 24 horas hasta cumplir 14 días. El manejo de los animales y protocolo del estudio se hizo de acuerdo con la NOM-062-ZOO y a los estatutos de la OECD/OCDE. Estas pruebas se realizaron dentro de las instalaciones del Bioterio FES-Iztacala UNAM.

Todas las observaciones se registraron de forma individual, tomando en cuenta constantes fisiológicas y estado de ánimo de cada ratón (cuadro 5). Se llevó a cabo el pesaje de los ratones al inicio y al término de la prueba para determinar si existían diferencias entre la ganancia de peso de los diferentes grupos. Cada vez que hubo mortalidad de alguno de los individuos, se colectaron los cadáveres y se transportaron al departamento de Patología de la FMVZ-UNAM, para realizar las necropsias de estos y estudios de histopatología de los órganos afectados y se llevó a cabo el cálculo de la dosis letal 50 (DL₅₀) por medio de un análisis Probit.

Cuadro 5. Constantes fisiológicas normales en roedores de experimentación CD-1.

VALOR	RATÓN
Temp.	35.8 – 37. 6 °C
FC	328 – 728
FR	90 – 220
Rango peso hembra (adulto)	25 – 40 g.
Rango peso macho (adulto)	25 – 40 g.
Consumo de agua	4 – 7 (ml/día)
Consumo de alimento	3 – 6 (g/día)
Edad a la madurez sexual	40 – 60 días
Expectativa de vida	1 – 3 años

*Adaptado de: Fox et al., 2002.

5.13 Prueba de toxicidad sub-crónica (dosis repetidas).

Para saber el grado de toxicidad, se utilizaron 50 ratones macho y 50 hembras CD-1 de 8 semanas de edad y un peso entre 30 y 40 gramos. Se formaron 5 grupos, con 10 ratones cada uno, de cada sexo (cuadro 6).

Cuadro 6. Grupos de ratones CD-1 para la prueba de toxicidad sub-crónica (dosis repetidas).

GRUPO	TRATAMIENTO
1	Control negativo (sin tratamiento)
2	Control positivo (Aceite de maíz)
3	Extracto 375 mg/Kg
4	Extracto 500 mg/Kg
5	Extracto 1000 mg/Kg

El extracto de *A. ludoviciana* fue reconstituido con aceite de maíz como vehículo y fue administrado a las dosis de 375, 500 y 1000 mg/Kg de PV. Se formó un grupo control negativo y un grupo control positivo al cual se le administró sólo aceite de maíz. Las administraciones de los grupos tratados y testigo se llevaron a cabo PO cada semana con ayuda de una cánula esofágica. Los animales fueron observados durante una hora post-administración para evaluar su estado físico y determinar si hay algún cambio en su comportamiento, la observación se llevó a cabo cada 24 horas hasta cumplir 6 semanas. El manejo de los animales y protocolo del estudio

se hizo de acuerdo con la NOM-062-ZOO, a los estatutos de la OECD/OCDE y a la guía de la OMS/WHO.

Todas las observaciones se registraron de forma individual, tomando en cuenta constantes fisiológicas y estado de ánimo de cada ratón. Se llevó a cabo el pesaje de los ratones al inicio y cada dos semanas hasta el término de la prueba para determinar si existían diferencias entre la ganancia de peso de los diferentes grupos.

Al finalizar la prueba, los ratones fueron eutanasiados en las instalaciones del Bioterio FES-Iztacala UNAM por medio de una cámara de CO₂ de acuerdo con lo establecido en la NOM-062-ZOO y los cadáveres de estos fueron refrigerados y transportados al departamento de Patología de la FMVZ-UNAM para llevar a cabo los estudios de necropsia e histopatología para determinar si existía algún daño en los órganos internos.

5.14 Análisis de datos

Los datos obtenidos, se analizaron por medio de la prueba de Análisis de varianza (ANOVA), análisis Probit, prueba de Dunnett y prueba de Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95%, para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (Systat Software V12, 2008).

VI. RESULTADOS

A continuación, se muestran los rendimientos totales de la colecta, secado y elaboración de extracto crudo de estafiate con acetato de etilo.

Cuadro 7. Rendimientos totales de la colecta, secado y elaboración de extracto de estafiate.

Estafiate	Materia verde colectada	Materia seca (MS)	Cantidad de extracto crudo
	3.5 Kg.	875.30 g.	96.90 g.

En el siguiente cuadro se muestran los caracoles colectados junto con su identificación taxonómica, la cual fue realizada con ayuda de claves taxonómicas y asesorados por personal del IB UNAM:

Cuadro 8. Limneidos colectados durante el estudio.

	<i>Lymnaea bulimoides</i>	<i>Lymnaea cubensis</i>
Cantidad colectada en campo	537	257
Promedio de masas ovígeras, colectadas por semana	95	69
Promedio de caracoles eclosionados, colectados por semana	1,115	759
Porcentaje de mortalidad, a los 30 días de eclosión	62%	46%

A partir de los caracoles obtenidos en laboratorio, se obtuvieron las generaciones necesarias para la infección de estos. De manera periódica, se llevaba a cabo la infección de 150 a 350 caracoles para la obtención de metacercarias necesarias para los ensayos *in vivo*. Durante el lapso del desarrollo de las fases larvarias intra-caracol, la mortalidad de estos oscilaba entre el 55 y 80%.

Fueron identificadas cuatro especies diferentes de alga: *Oscillatoria simplicissima*, *Kamptomena laetevirens*, *Pseudanabaena minima* y *Lyngbya martensiana*. La primera de ellas era predominante en cantidad, por este motivo se aisló para el cultivo *in vitro* en el laboratorio y suministrar de forma constante como alimento a los caracoles dentro del estudio.

Los porcentajes de eficacia *in vitro* del extracto de estafiate, mostró que a partir de las 24 horas post-exposición, el extracto de acetato de etilo tuvo una eficacia del 100% en todas sus concentraciones ($P < 0.05$) (cuadro 9) En todas las cajas de cultivo, se incluyó un control negativo para verificar cada 24 horas la viabilidad de los parásitos en cada una de ellas durante el periodo de evaluación.

Cuadro 9. Porcentaje de eficacia fasciolicida *in vitro* del extracto crudo de estafiate (*A. ludoviciana*).

TIEMPO (horas)	TRATAMIENTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)					
		10	50	125	250	375	500
24	Acetato de etilo	-	-	100	100	100	100
	TCBZ	100	100	-	-	-	-
	Control negativo	0	0	0	0	0	0
48	Acetato de etilo	-	-	100	100	100	100
	TCBZ	100	100	-	-	-	-
	Control negativo	0	0	0	0	0	0
72	Acetato de etilo	-	-	100	100	100	100
	TCBZ	100	100	-	-	-	-
	Control negativo	0	0	0	0	0	0

*TCBZ: Triclabendazol; Control negativo: sin tratamiento.

Tras corroborar su eficacia y rendimiento, el extracto crudo de acetato de etilo se fraccionó a través de un sistema de columna abierta. En total se obtuvieron 14 fracciones (1-14) de acuerdo con su patrón cromatográfico en capa fina.

En la actividad fasciolicida de las fracciones del extracto de acetato de etilo, se observa que las fracciones “3” y “4” obtuvieron el 100% de eficacia *in vitro* a las 48 horas post-exposición en las cinco diferentes concentraciones, mientras que la fracción “2” obtuvo el 100% a las 72 horas ($P < 0.05$) (cuadro 10). En todas las evaluaciones, se incluyó un control negativo para verificar la viabilidad de los parásitos en cada caja durante el periodo de evaluación.

Cuadro 10. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de fracciones obtenidas a partir del extracto de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*).

Tiempo (horas)	Fracción	Concentración (mg/L)				
		100	200	300	400	500
24	Testigo	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	100
	3	92 ± 0.072	100	100	100	100
	4	96 ± 0.072	87.5 ± 0.125	100	100	100
	5	0	0	0	62.5 ± 0.544	100
	6	0	0	0	0	12.5 ± 0.216
	7	0	4 ± 0.072	8 ± 0.072	33 ± 0.072	42 ± 0.190
	8 - 11	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	0	4 ± 0.072
	13	0	0	0	29 ± 0.260	29 ± 0.505
	14	0	0	0	0	0
48	Testigo	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	2	21 ± 0.072	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100
	4	100	100	100	100	100
	5	0	0	0	67 ± 0.473	100
	6	0	0	0	4 ± 0.072	50 ± 0.125
	7	0	4 ± 0.072	8 ± 0.072	54 ± 0.401	100
	8 - 11	0	0	0	0	0
	12	0	0	0	75	100
	13	0	0	4 ± 0.072	46 ± 0.072	58 ± 0.260
	14	0	0	0	0	0
72	Testigo	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0
	2	100	100	100	100	100
	3	100	100	100	100	100
	4	100	100	100	100	100
	5	0	0	0	88 ± 0.216	100
	6	0	4 ± 0.072	8 ± 0.072	67 ± 0.072	100
	7	0	4 ± 0.072	8 ± 0.072	54 ± 0.401	100
	8 - 11	0	0	0	0	0
	12	25 ± 0.125	21 ± 0.072	100	100	100
	13	0	0	13 ± 0.125	92 ± 0.144	92 ± 0.144
	14	0	0	0	0	0

± Desviación estándar.

Debido a la actividad fasciolicida que presentó la fracción “3”, se seleccionó para llevar a cabo su purificación, obteniendo un total de 12 fracciones purificadas (A-L).

Las eficacias *in vitro* totales de las fracciones purificadas, presentaron diferencias significativas entre si ($P < 0.05$), con respecto a los controles negativos. Las fracciones “F”, “G” y “J” fueron las únicas que presentaron el 100% de eficacia fasciolicida desde las 24 horas postexposición en todas las concentraciones (cuadro 11).

Cuadro 11. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de las fracciones purificadas obtenidas a partir de la fracción “3” de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*), a las 24 horas post-exposición.

TIEMPO (horas)	FRACCIÓN “3”	CONCENTRACIÓN (mg/L)				
		100	200	300	400	500
24	Testigo	0	0	0	0	0
	A	4 ± 0.072	4 ± 0.072	12 ± 0.125	17 ± 0.072	33 ± 0.072
	B	4 ± 0.072	12 ± 0.125	12 ± 0.125	37 ± 0.125	67 ± 0.314
	C	50 ± 0.125	54 ± 0.144	92 ± 0.144	100	100
	D	67 ± 0.190	96 ± 0.072	100	100	100
	E	96 ± 0.072	100	100	100	100
	F	100	100	100	100	100
	G	100	100	100	100	100
	H	67 ± 0.381	75 ± 0.25	83 ± 0.288	83 ± 0.144	100
	I	75 ± 0.216	83 ± 0.19	83 ± 0.144	87 ± 0.125	100
	J	100	100	100	100	100
	K	17 ± 0.19	42 ± 0.072	62 ± 0.125	71 ± 0.721	100
	L	25 ± 0.125	58 ± 0.36	79 ± 0.072	87 ± 0.125	100

± Desviación estándar.

Las fracciones “D”, “E”, “H” y “K” completaron el 100% de eficacia en todas las concentraciones a las 48 horas ($P < 0.05$) (cuadro 12).

Cuadro 12. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de las fracciones purificadas obtenidas a partir de la fracción “3” de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*), a las 48 horas post-exposición.

Tiempo (horas)	Fracción “3”	Concentración (mg/L)				
		100	200	300	400	500
48	Testigo	0	0	0	0	0
	A	4 ± 0.072	4 ± 0.072	58 ± 0.072	83 ± 0.19	96 ± 0.072
	B	83 ± 0.19	100	100	100	100
	C	79 ± 0.19	79 ± 0.26	92 ± 0.144	100	100
	D	100	100	100	100	100
	E	100	100	100	100	100
	F	100	100	100	100	100
	G	100	100	100	100	100
	H	100	100	100	100	100
	I	95 ± 0.072	92 ± 0.072	100	100	100
	J	100	100	100	100	100
	K	100	100	100	100	100
	L	92 ± 0.144	100	100	100	100

± Desviación estándar.

Finalmente, a las 72 horas, las fracciones “B”, “C”, y “L” completaron el 100% de eficacia en todas sus concentraciones. En todos los tiempos de evaluación, los negativos no presentaron ningún cambio ($P < 0.05$) (cuadro 13).

Cuadro 13. Porcentaje de eficacias fasciolicidas *in vitro* de las fracciones purificadas obtenidas a partir de la fracción “3” de acetato de etilo de estafiate (*A. ludoviciana*), a las 72 horas post-exposición.

Tiempo (horas)	Fracción “3”	Concentración (mg/L)				
		100	200	300	400	500
72	Testigo	0	0	0	0	0
	A	4 ± 0.072	4 ± 0.072	100	100	100
	B	100	100	100	100	100
	C	100	100	100	100	100
	D	100	100	100	100	100
	E	100	100	100	100	100
	F	100	100	100	100	100
	G	100	100	100	100	100
	H	100	100	100	100	100
	I	95 ± 0.072	100	100	100	100
	J	100	100	100	100	100
	K	100	100	100	100	100
	L	100	100	100	100	100

± Desviación estándar.

Al realizar la comparación estadística de las eficacias globales de estas, se determinó que la fracción purificada “J” es estadísticamente superior al resto ($P < 0.05$) (Fig. 3)

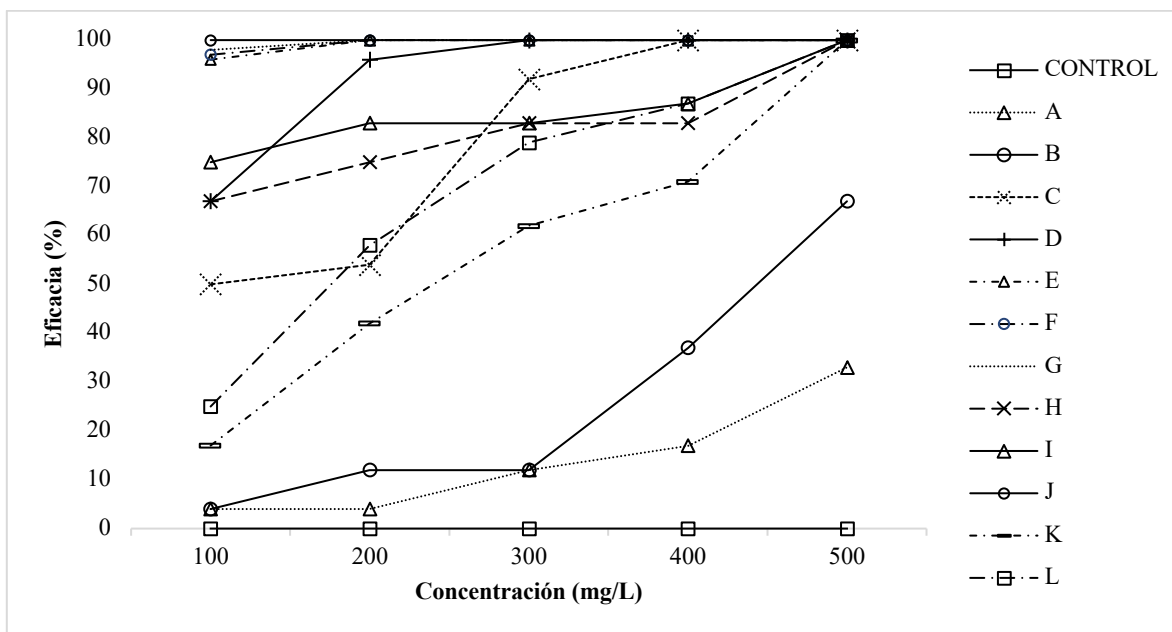


Figura 3. Eficacias globales de las fracciones purificadas, a partir de la fracción "3".

Para indagar cuales eran las familias de metabolitos secundarios inmiscuidos en las diferentes eficacias de los bioensayos, se llevó a cabo un perfil bioquímico cualitativo, tanto en el extracto de estafiate de acetato de etilo y las respectivas fracciones que presentaban la mejor eficacia, para saber que metabolitos persistian después de las purificaciones. A continuación se muestran los resultados de las pruebas fitoquímicas, observando la presencia de lactonas sesquiterpénicas como familia predominante (cuadro 14).

Cuadro 14. Pruebas fitoquímicas realizadas al extracto de acetato de etilo de estafiate (*A.ludoviciana*) y sus respectivas fracciones.

Prueba	Extracto	Fracción "3"	Fracción "J"
Alcaloides (Meyer)	+	-	-
Alcaloides (Dragendorff)	+	+	-
Compuestos fenólicos (FeCl ₃)	+	+	-
Cumarinas (UV)	+	-	-
Esteroides y triterpenos (Lieberman-Burchard)	-	-	-
Flavonoides (NH ₃)	-	-	-
Flavonoides (Shinoda)	-	-	-
Glicósidos (α -naphthol)	+	+	-
Glicósidos cardiogénicos (Keller-Killiani)	+	+	-
Lactonas sesquiterpénicas (Baljet)	+	+	+

*(+): positivo; (-): negativo.

Tomando en cuenta estos resultados, se llevó a cabo los análisis de HPLC-LCMS del extracto de acetato de etilo, la fracción "3" y la subfracción "J". Como estándar de cuantificación y tomando en cuenta los resultados del perfil fitoquímico y la revisión bibliográfica, se utilizó artemisinina con un 98% de pureza (adquirido de SIGMA-ALDRICH®, lote #MKCD1179). Los resultados muestran a la artemisinina con un tiempo aproximado de retención de 31 minutos en todos los casos y una concentración final en la subfracción "J" de $0.187 \pm 3.78 \times 10^{-6}$ mg/ 1 mg de extracto de planta. Además, la absorbancia de la artemisinina es similar a la encontrada en la fracción "J" (211 y 210 nm UV, respectivamente), como se observa en el siguiente cromatograma:

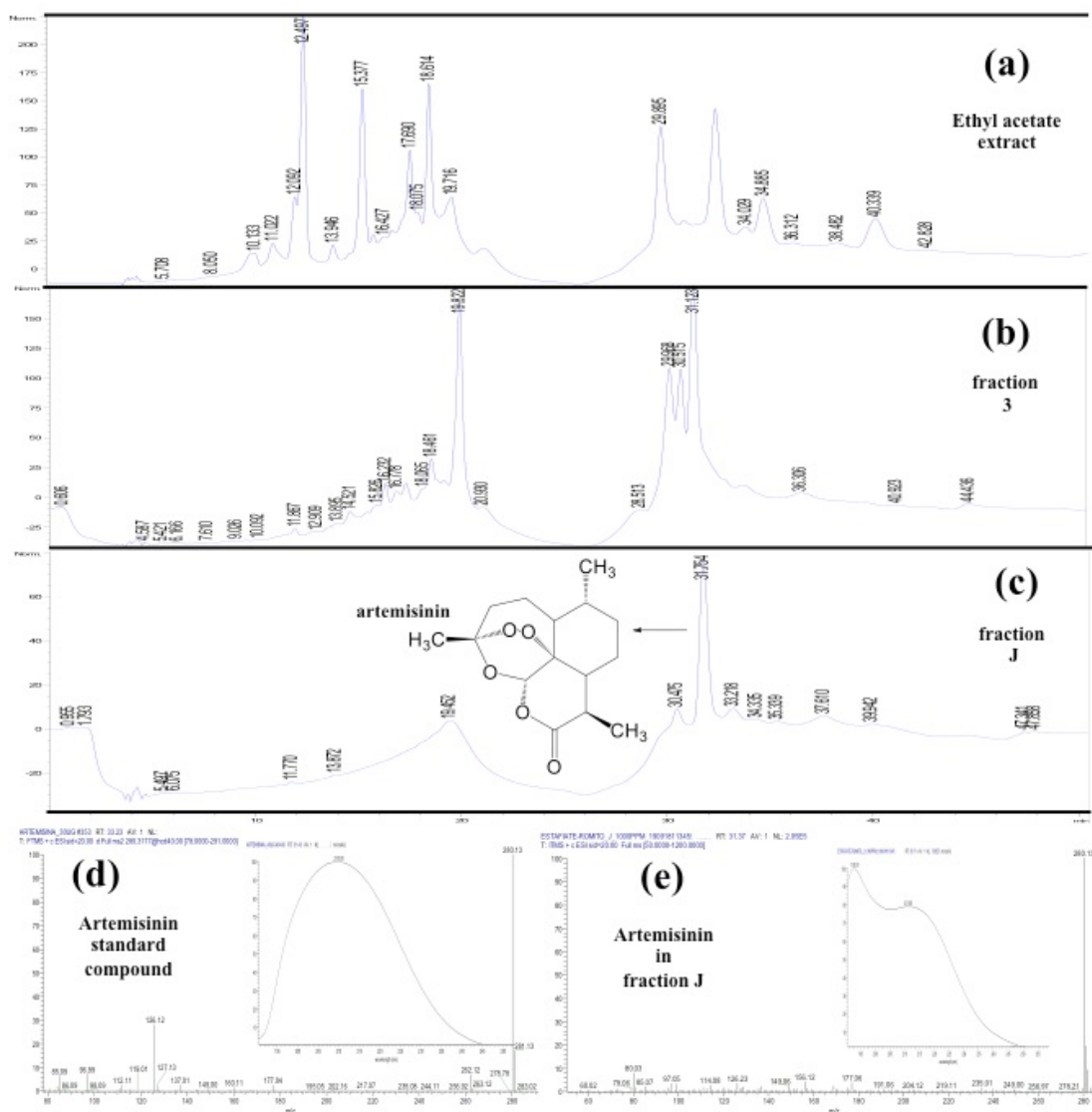


Figura 4. Cromatogramas de: a) extracto de acetato de etilo de estafiate (*Artemisia ludoviciana*). b) fracción “3”. c) fracción purificada “J”. Espectro de masas y UV de d) artemisinina como estándar y e) presente en la fracción “J”.

La cantidad de los diferentes compuestos presentes en las muestras fue disminuyendo de acuerdo con el fraccionamiento realizado por las distintas columnas cromatográficas realizadas con anterioridad. La subfracción “J”, muestra una diferencia significativa en la presencia de estos compuestos con respecto a sus

antecesoras. Estos hallazgos confirman la presencia de lactonas sesquiterpénicas, específicamente a la artemisina como la posible causante del efecto fasciolicida.

Con respecto a los resultados de MEB, los especímenes recuperados de los grupos controles negativos, no presentaron ningún cambio en la superficie del tegumento. Se aprecian, tanto en la vista dorsal como en la vista ventral, estructuras anatómicas importantes como las espinas, la ventosa oral, ventral y el poro excretor (Figs. 5a-5f).

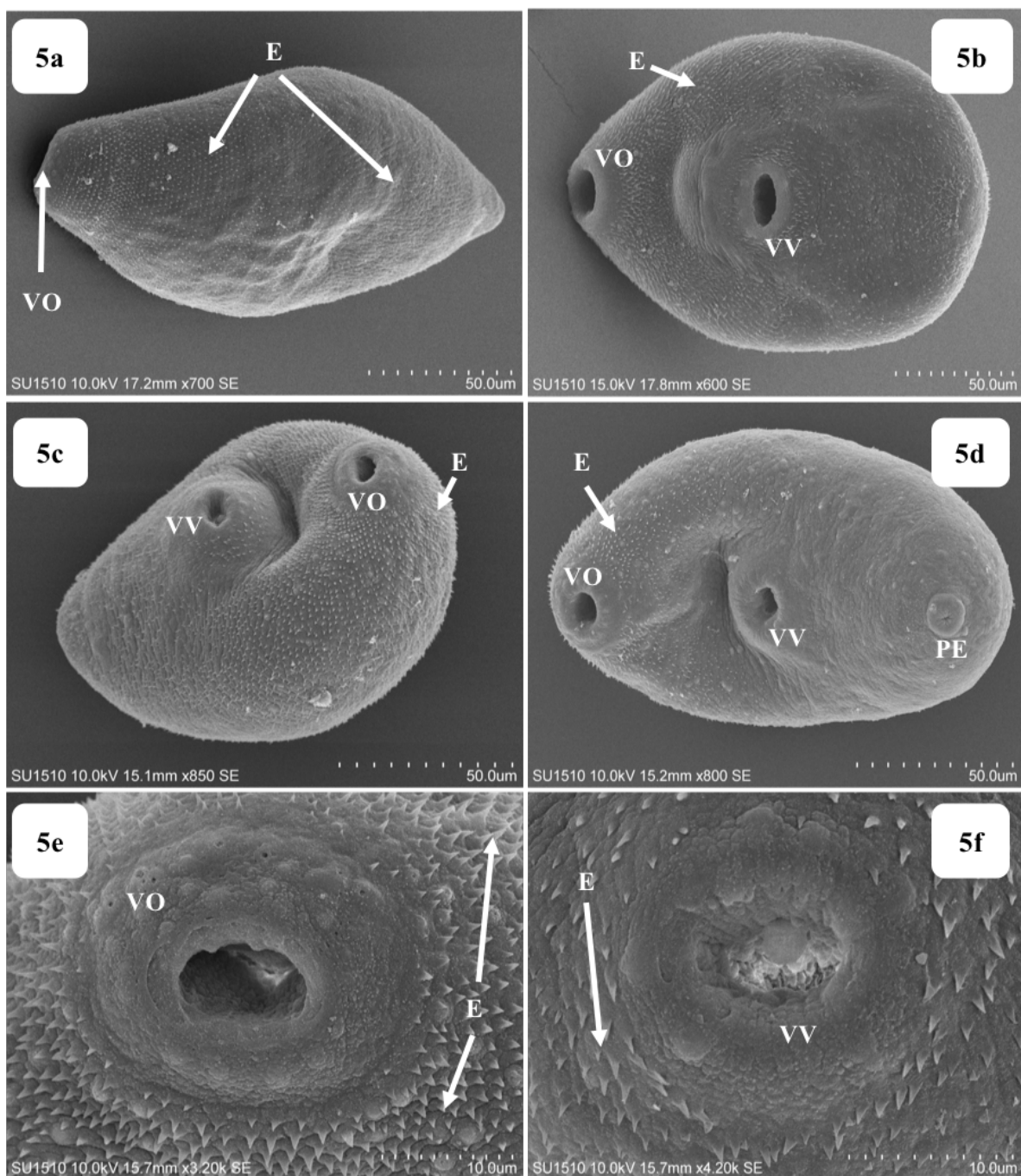


Figura 5(a-f). *Fasciola hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E) tanto en el plano dorsal (Fig. 5a) y en el ventral (Figs. 5b a 5f). Las estructuras anatómicas la ventosa oral (VO), ventosa ventral (VV) y el poro excretor (PE) se observan sin alteraciones (aumento: 5a-x700, 5b-x600, 5c-x850, 5d-x800, 5e-x3.20, 5f-x4.20).

Los especímenes recuperados, que fueron expuestos a la concentración de 125 mg/L del extracto de estafiate, se aprecian con cambios directos sobre el tegumento del parásito y la aparición de vesículas sobre el tejido afectado (Figs. 6a-6d). En la porción apical se observa una disrupción de la ventosa oral y una discontinuidad de las espinas que la rodean (Fig. 6b). Se observa un daño en las espinas (E) (Figs. 6a-6c) y en algunas zonas se aprecia una discontinuidad de estas (Fig. 6b, zona circular).

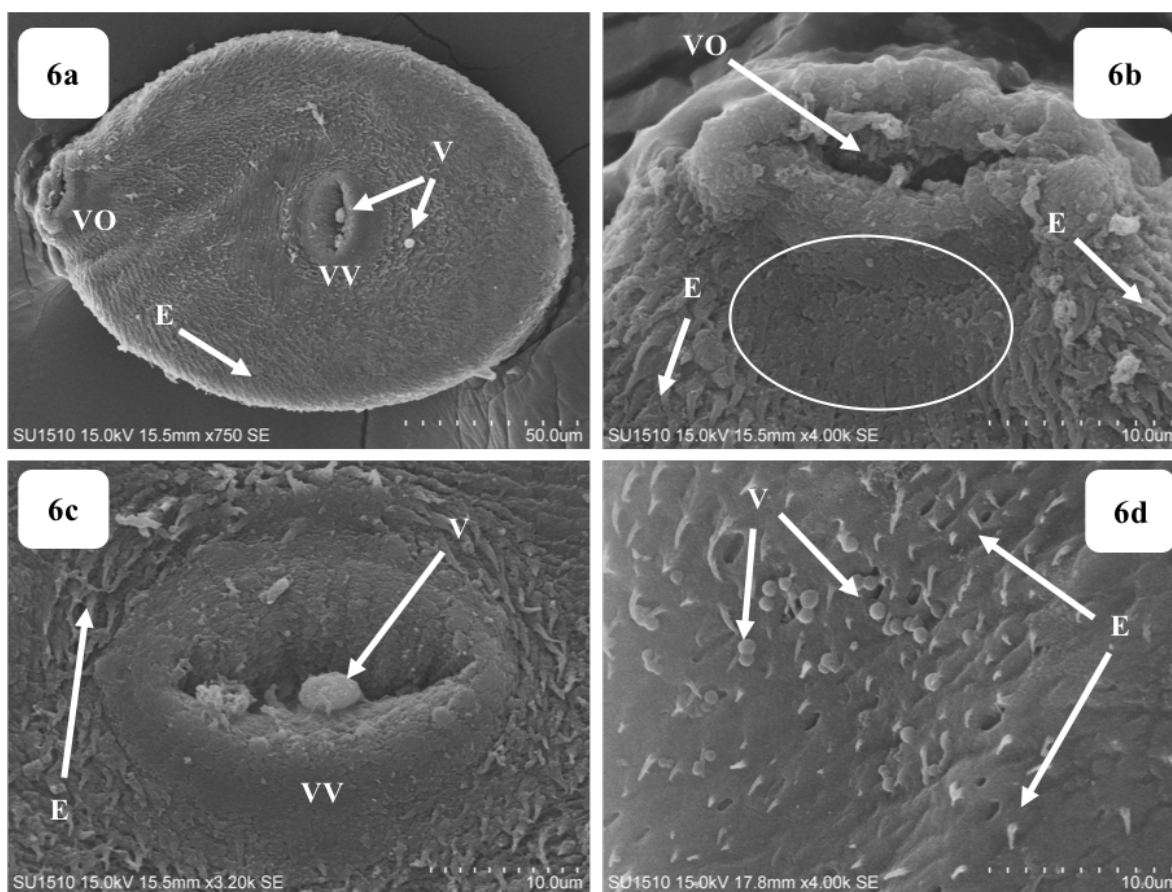


Figura 6 (a-d). *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 125 mg/L del extracto de estafiate (24 hrs postexposición). Se distinguen vesículas (V) sobre la superficie del tegumento dañado (Figs. 6a, 6c y 6d). Las espinas (E) presentan un daño en comparación a su anatomía normal, en diferentes áreas del tejido (Figs. 6a-6c) y en algunas zonas se aprecia una discontinuidad de estas (Fig. 6b, zona circular) (aumento: 6a-x750, 6b-x4.00k, 6c-x3.20k, 6d-x4.00k).

Las fasciolas expuestas a la concentración de 500 mg/L del extracto, se aprecian con cambios en un mayor grado de severidad que las del grupo de 125 mg/L. Se observan áreas extendidas de hinchazón sobre el tegumento y la presencia de vesículas sobre todo el tejido afectado. Las espinas perdieron su secuencia en diferentes zonas y al realizar un acercamiento de las lesiones, en la parte media se observa la ruptura del tegumento y la lamina basal, exponiendo los tejidos internos del parásito (Figs. 7a-7d). En la última imagen se aprecia una lesión severa sobre el tegumento del espécimen, exponiendo la musculatura interna del mismo (Fig. 7d).

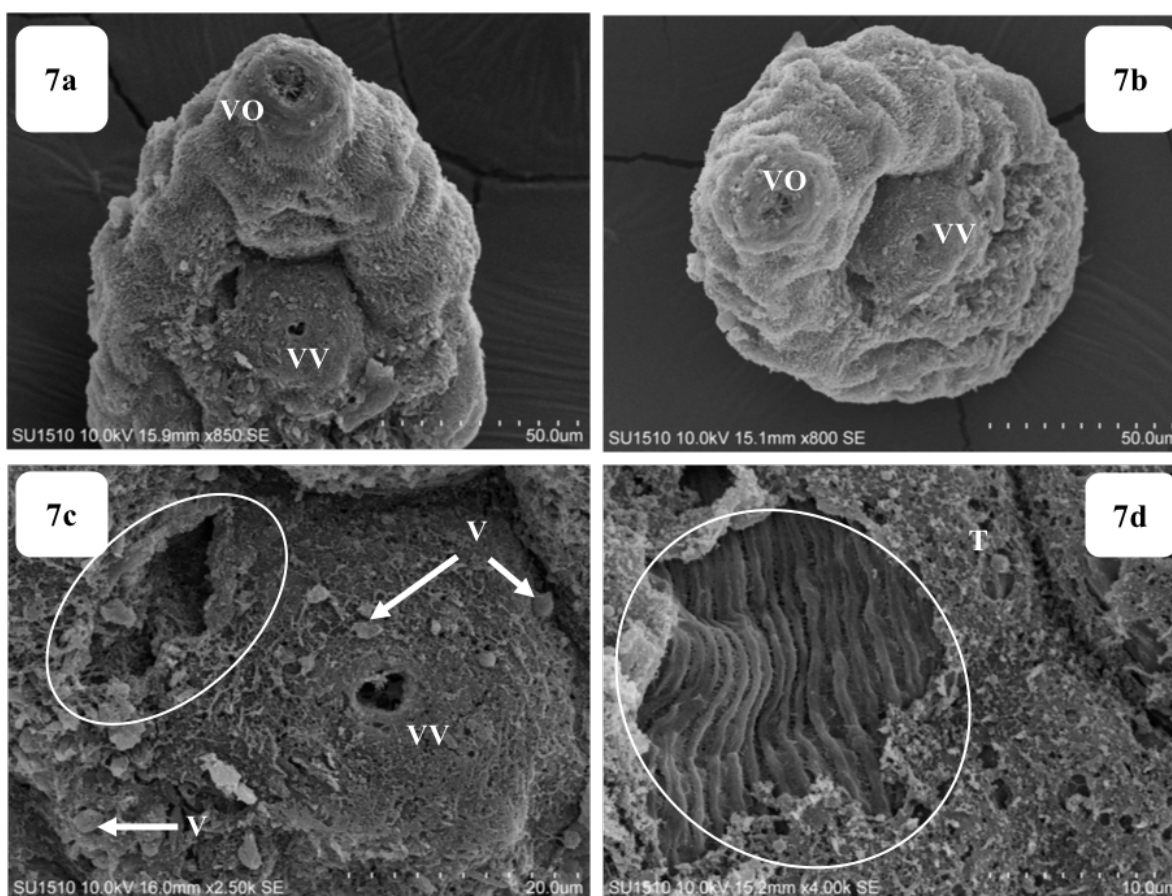


Figura 7 (a-d). *Fasciola hepatica* tratada con una concentración de 500 mg/L de extracto de estafiate (24 hrs postexposición). Se observan zonas extensas de severa inflamación sobre el tegumento, generando una pérdida de la forma habitual del parásito (Figs. 7a y 7b). En un acercamiento, se distingue una pérdida de la continuidad del tegumento, rodeada por vesículas (Fig. 7c). En la última imagen se aprecia una lesión severa sobre el tegumento

del espécimen, exponiendo la musculatura interna del mismo (Fig. 7d) (aumento: 7a-x850, 7b-x800, 7c-x2.50k, 7d-x4.00k).

En lo referente a las pruebas de toxicidad, los resultados de la prueba de toxicidad aguda muestran que la concentración de 1250 mg/Kg no presentó ninguna toxicidad en ninguno de los individuos tratados durante los 14 días del estudio. Con respecto a la concentración de 2500 mg/Kg, se presentó el 40% de mortalidad a las primeras 24 horas post-administración, manteniéndose así hasta los 14 días. Finalmente, en la concentración de 5000 mg/Kg se observó el 50% de mortalidad a las primeras 24 horas post-administración, aumentando al 60% a las 48 horas post-administración, permaneciendo este porcentaje hasta el final de la prueba. Ninguno de los controles presentó alteraciones durante el periodo de la prueba (Figura 8).

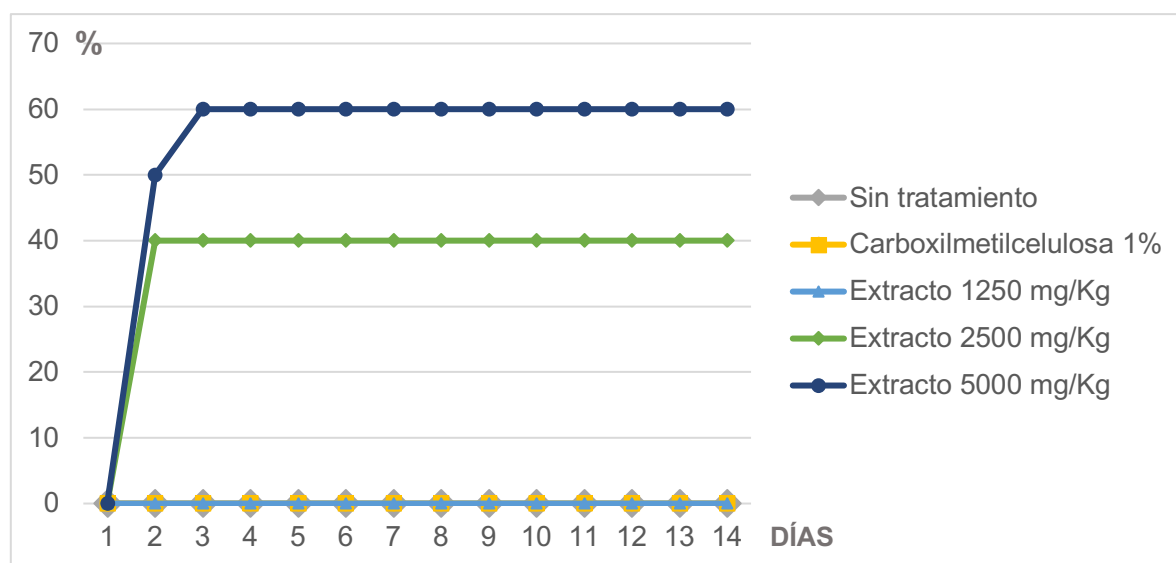


Figura 8. Porcentajes de mortalidad en ratones CD-1, de los diferentes grupos y por día de evaluación.

Al realizar el análisis Probit de los datos, se determinó que la dosis letal 50 (DL₅₀) es de 3750 mg/Kg (Figura 9).

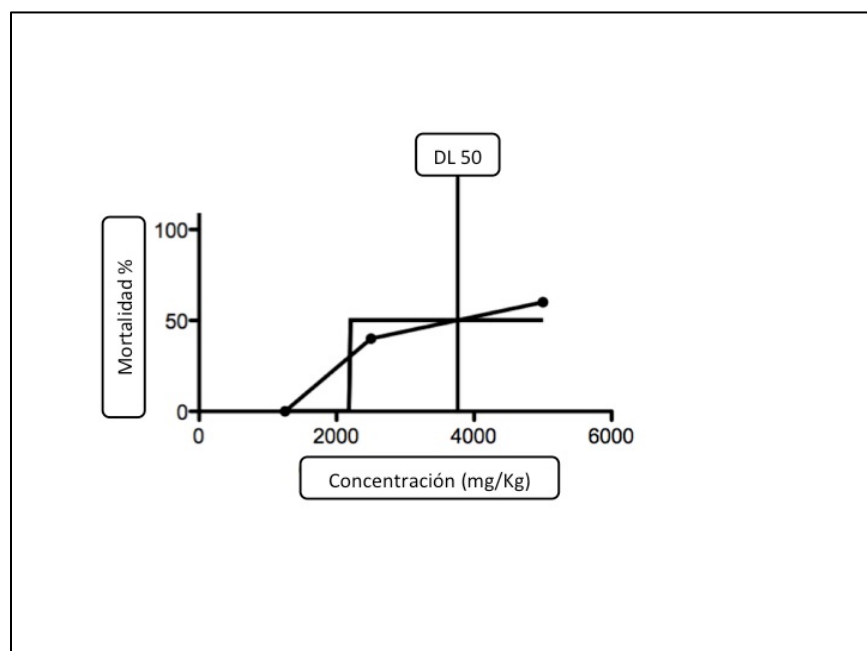


Figura 9. DL₅₀ del extracto de estafiate a partir de acetato de etilo en ratones CD-1.

La necropsia e histopatología de los decesos muestran que en el grupo de roedores al que se administró 2500 mg/Kg del extracto, existía degeneración y necrosis tubular leve en los riñones, degeneración hepatocelular multifocal leve en el hígado y linfonecrosis moderada en órganos linfoides (bazo, timo y linfonodos). Los ratones afectados del grupo al que se administró 5000 mg/Kg del extracto, presentaron las mismas lesiones, pero el grado de severidad era grave. Todas estas alteraciones fueron comparadas con los controles negativos, los cuales no presentaron ningún cambio y sólo en un par de casos se apreciaron ligeros cambios histopatológicos derivados del proceso de autólisis.

Los riñones de los controles negativos se aprecian sin ningún cambio (Fig. 10a), mientras que en el riñón afectado del grupo tratado con 5000 mg/Kg a las 24 horas post-tratamiento, se aprecia vacuolización e hipercromasia eosinofílica citoplasmática, núcleos celulares en cariólisis y cariorrexis sugerente a degeneración tubular (Fig. 10b).

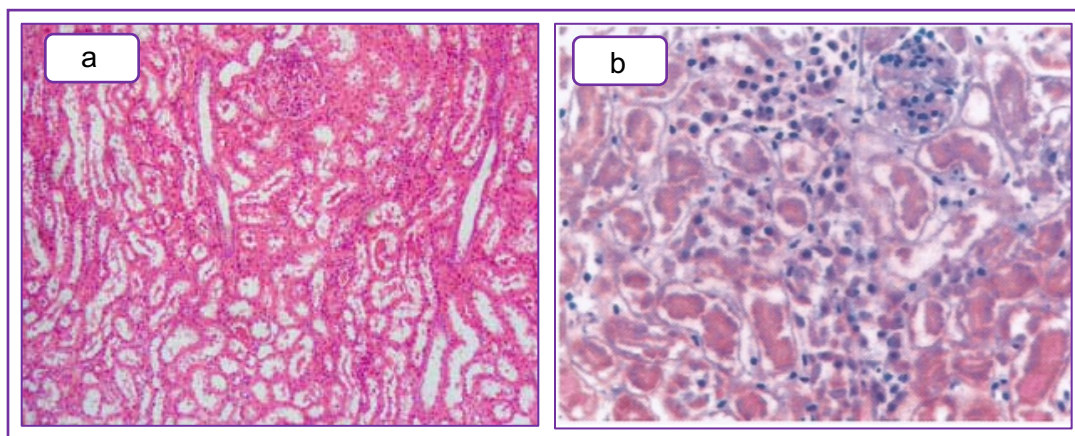


Figura 10. Histopatología de riñón de la prueba de toxicidad aguda. a) riñón sano del grupo control, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 40x); b) riñón afectado del grupo tratado con 5000 mg/Kg a las 24 horas post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 40x).

El hígado sano del grupo control negativo no presenta ninguna alteración (Fig. 11a), en comparación con el hígado afectado del grupo tratado con 5000 mg/Kg a las 24 horas post-tratamiento, en donde se observan vacuolas intracitoplasmáticas, indicativas de degeneración hepatocelular (Fig. 11b).

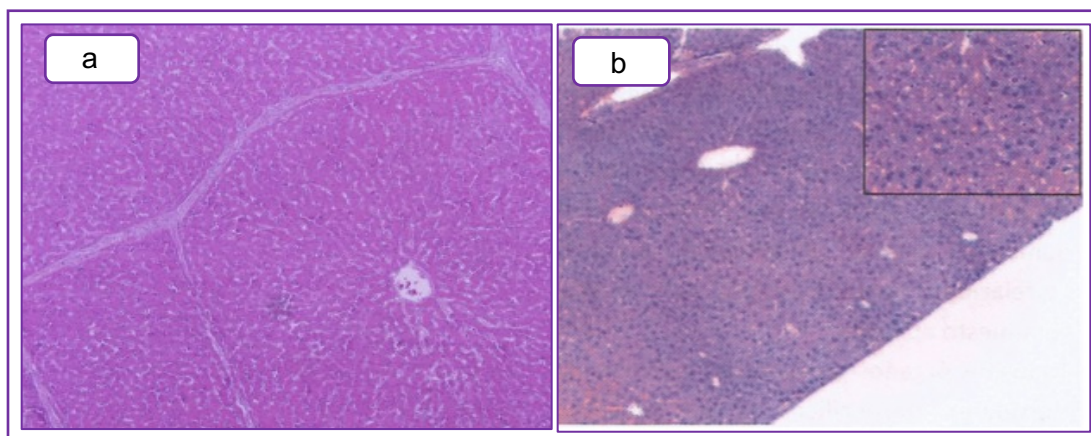


Figura 11. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad aguda. a) hígado sano del grupo control sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 10x); b) hígado afectado del grupo tratado con 5000 mg/Kg a las 24 horas post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 4x).

Con respecto a los órganos linfoides, el timo del grupo control negativo se observa sin alteraciones celulares significativas (Fig. 12a), en comparación con el timo que presenta fragmentación nuclear y restos celulares, característicos de linfonecrosis, del grupo tratado con 2500 mg/Kg a las 24 horas post-tratamiento (fig. 12b).

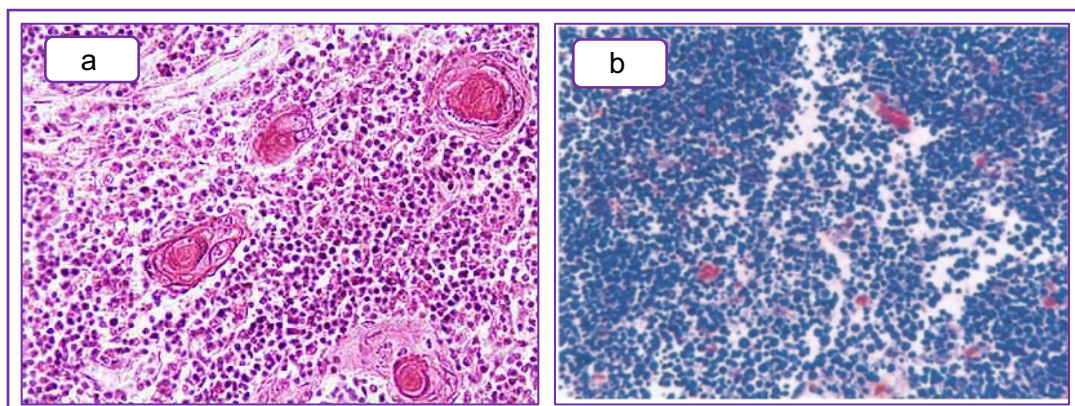


Figura 12. Histopatología del timo de la prueba de toxicidad aguda. a) timo sano del grupo control, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 40x); B) timo afectado del grupo tratado con 2500 mg/Kg a las 24 horas post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 40x).

Finalmente, el bazo del grupo control negativo se caracteriza por no presentar cambios celulares (Fig. 13a), comparado con el bazo afectado del grupo tratado con 5000 mg/Kg a las 48 horas post-tratamiento, en este caso se observan linfocitos con citoplasma hipereosinófilico, fragmentación nuclear y la presencia de macrófagos fagocitando restos celulares, sugere a linfonecrosis (Fig. 13b).

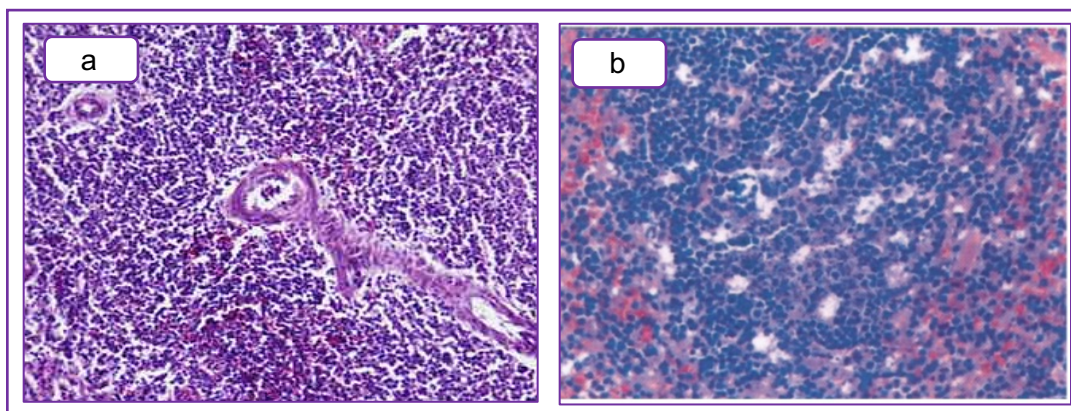


Figura 13. Histopatología del bazo de la prueba de toxicidad aguda. a) bazo sano del grupo control, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 40x); b) bazo afectado del grupo tratado con 5000 mg/Kg a las 48 horas post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 40x).

En la prueba de toxicidad subcrónica no se observó en ninguno de los individuos tratados, alguna alteración fisiológica o mortalidad con respecto a los grupos controles, durante el período de estudio. Al realizar los estudios histopatológicos de los ratones, no se encontraron lesiones en algún órgano sugerentes a algún grado de toxicidad, derivado de la administración del extracto de estafiate, en sus diferentes concentraciones. En algunos cortes histológicos se apreciaron ligeros cambios autolíticos. En las ganancias de peso (GDP) totales se registraron cambios durante el tiempo de evaluación, el peso promedio de los ratones macho antes de comenzar el estudio fue de 37.80 gramos y el de las hembras fue de 29.74 gramos, en el siguiente cuadro (cuadro 15) y figura (Fig. 14) se muestran las ganancias de peso.

Cuadro 15. Promedios de las ganancias de peso (gramos), por sexo de los diferentes grupos de la prueba de toxicidad sub-crónica.

GRUPOS	SEMANAS							
	0		2		4		6	
	H	M	H	M	H	M	H	M
Control negativo	25.8±0.45	38±0.78	28.6±0.55	43±0.65	30.6±0.55	43.8±0.72	33.4±0.45	45.4±0.55
Control positivo	27.6±0.52	33.5±0.52	31.6±0.50	37±0.50	34.8±45	41.1±0.45	38.2±0.45	42±0.50
375 mg/kg	26.5±0.45	32±0.45	30±0.45	34±0.45	34.5±0.40	40.26±0.55	39.7±0.55	44±0.55
500 mg/Kg	26±0.45	33.3±0.55	29.5±0.50	37.7±0.45	34.4±0.50	39±0.50	36.1±0.45	45.3±0.45
1000 mg/Kg	28±0.55	37.6±0.45	32.1±0.45	42±0.50	33.7±0.55	43.1±0.45	36.9±0.50	45.2±0.55

*H: hembras, M: machos. ± Desviación estándar.

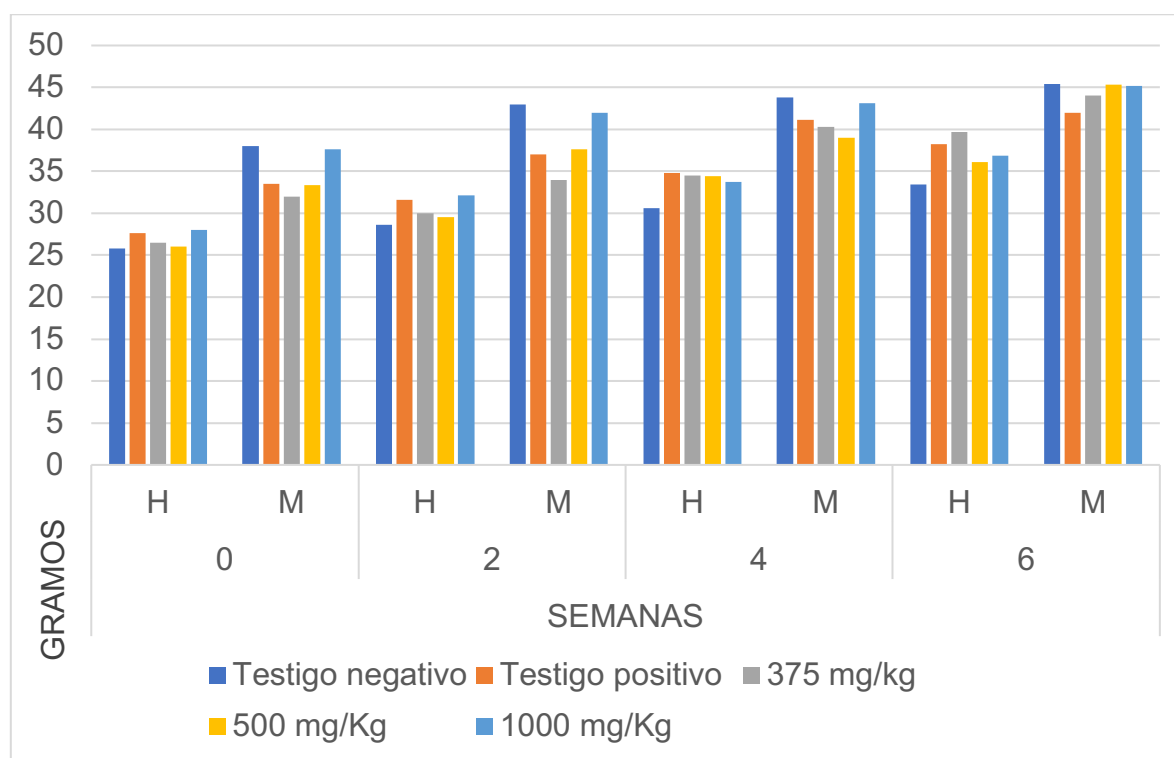


Figura 14. Promedios de las ganancias de peso (gramos), por sexo de los diferentes grupos de la prueba de toxicidad sub-crónica.

VII. DISCUSIÓN

El género *Artemisia* spp ha demostrado a través de estudios previos, un potencial trematocida, principalmente de *A. annua* y *A. absinthium* (Ferreira et al., 2011).

Ibarra et al. (2012), llevaron a cabo un estudio en dónde se probaron un total de 60 extractos de plantas, entre ellas el estafiate, el cual mostró una eficacia promisorio. Este estudio se vio limitado a la presencia o ausencia de la eficacia fasciolicida, sin determinar familias de metabolitos secundarios inmiscuidas en el efecto.

Por otra parte, Álvarez et al. (2015) llevaron a cabo un estudio en dónde se evaluaron 15 extractos de plantas, incorporando el estafiate dentro de este, mostrando nuevamente un potencial fasciolicida. Además, se llevaron a cabo pruebas fitoquímicas cualitativas, evidenciando a grandes rasgos la presencia de alcaloides, esteroides, lactonas sesquiterpénicas, entre otras familias de metabolitos, contenidas en el extracto de estafiate. Sin embargo, no se llevó a cabo el fraccionamiento del extracto ni se identificó con certeza que familias de metabolitos eran las responsables del daño al parásito.

En el presente estudio se demostró que el extracto crudo de acetato de etilo, obtenido a partir de estafiate y sus fracciones, presentan una eficacia fasciolicida *in vitro* del 100% en contra de formas juveniles de *Fasciola hepatica* a partir de las 24 horas post-exposición, reafirmando el potencial antihelmíntico de la planta.

Al realizar análisis fitoquímicos cualitativos al extracto de acetato de etilo y sus fracciones, se muestra que las posibles familias de metabolitos secundarios implicadas en el efecto parasiticida son lactonas sesquiterpénicas. Al realizar una cuantificación más específica con ayuda de HPLC-LCMS se comprueba esto y se demuestra la presencia de la artemisinina como el principal componente del extracto.

Las lactonas sesquiterpénicas son una subclase de isoprenoides, los cuales han demostrado una eficacia antineoplásica y antimalaria, siendo la artemisina la más importante dentro de este rubro (Yarnell, 2007). Se conocen hasta la fecha alrededor de 35,000 estructuras diferentes de estos compuestos y son biosintetizados en su mayoría por plantas de la familia *Asteraceae* (Adekenov, 2017). La artemisinina es un metabolito constante dentro del género *Artemisia* spp y a través de los años se ha utilizado para combatir al parásito *Plasmodium falciparum*, agente etiológico de la malaria (Klayman, 1985). El mecanismo de acción de este metabolito se debe a que cuenta con un puente peróxido, el cual reduce el hierro del grupo hemo en la sangre generado por la degradación de la hemoglobina por parte del parásito, lo cual provoca una serie de radicales libres que lo afectan directamente y ocasionan su muerte; además se menciona que produce una interferencia con el retículo endoplásmico del parásito y sus funciones mitocondriales (Ferreira et al., 2011; Keiser y Utzinger, 2007).

Los estudios de microscopía son de suma importancia para evaluar el daño real de diferentes fasciolicidas (Stitt y Fairweather, 1993; Toner et al., 2010; Walker et al., 2004; McConville et al., 2008; Rivera et al., 2004) y extractos o derivados de los mismos (Shalaby et al., 2009; Abdelaal et al., 2016), convirtiendo en muchos casos al tegumento como su órgano blanco (McKinstry et al., 2003).

En los trematodos, el tegumento es un órgano de vital importancia, debido a que confiere protección al parásito y sus funciones de osmorregulación (Halton, 2004). Las ventosas (oral y ventral) son determinantes sobre la supervivencia del parásito, ya que estos órganos brindan el soporte adecuado y los movimientos migratorios necesarios dentro de los conductos biliares. Las espinas que recubren el tegumento son necesarias para mantener una adecuada posición y al erosionar el epitelio del huésped definitivo confiere una buena alimentación por parte del parásito (Fairweather et al, 1999). Al existir un daño sobre estas estructuras las funciones básicas del parásito se ven comprometidas y producen la muerte de éste.

Anteriormente O'Neill et al. (2015a), realizaron un estudio con artesunato, el cual es un derivado semisintético de la artemisinina, para evaluar los daños externos e internos que ocurren en Fasciolas adultas obtenidas de ratas previamente infectadas y tratadas con 200 mg/Kg de artesunato. Al llevar a cabo la observación a través de MEB y microscopía electrónica de transmisión (MET), observaron un menor daño en el tegumento en comparación con las células intestinales de las Fasciolas tratadas.

O'Neill et al. (2015b), llevaron a cabo un estudio comparativo sobre el impacto del arteméter y el artesunato (dos derivados semisintéticos de la artemisinina), en el sistema reproductivo de Fasciolas adultas. Los resultados mostraron que el tratamiento tiene un efecto sobre las células embrionarias y por ende disminuye la producción de huevos. Los mismos derivados, interrumpieron la espermatogénesis en Fasciolas adultas afectando directamente los testículos del parásito en un estudio a cargo de O'Neill et al. (2017). En estos trabajos no se evidenció un daño sobre el tegumento del parásito.

Las lesiones presentes en los especímenes recuperados dentro de este estudio, demuestran que el extracto crudo de estafiate tiene un potencial fasciolicida debido a que produce un daño directo sobre el tegumento del parásito, presumiblemente derivado de la artemisinina predominante dentro del mismo. Es importante recalcar que las pruebas en este estudio se llevaron a cabo con Fasciolas jóvenes.

Desafortunadamente, en la prueba de toxicidad aguda, las lesiones encontradas en todos los órganos afectados sugieren un efecto tóxico agudo del extracto, principalmente en riñones e hígado; mientras que la linfonecrosis de órganos linfoides puede deberse a diferentes etiologías, entre ellas la toxicidad, lo que puede explicar el efecto en conjunto.

El hígado es un órgano vulnerable a sustancias tóxicas y las lesiones por este tipo de etiología se debe a una toxicidad directa en los hepatocitos, lo que provoca

apoptosis, necrosis o alteración celular de los mismos. También se puede deber a la transformación de un producto de origen natural o sintético en una toxina activa y finalmente a una respuesta inmunitaria hacia un fármaco o metabolito que actúan como haptenos para convertir una proteína celular en inmunógeno (Kumar et al., 2010).

En lo concerniente al riñón, Kumar et al. (2010) menciona que una lesión renal aguda por toxinas ocasiona una necrosis tubular e insuficiencia renal debido a las reacciones inflamatorias o inmunitarias por hipersensibilidad a las mismas. Esto genera un daño sobre las células y altera el flujo sanguíneo provocando una isquemia.

Asimismo, estos hallazgos indican que el extracto de estafiate (*A. ludoviciana*) a partir de acetato de etilo, es tóxico en dosis de 2500 y 5000 mg/Kg. Aunque la DL_{50} es de 3750 mg/Kg, desde los 2500 mg/Kg comienzan a observarse efectos de toxicidad en ratones CD-1.

Por otro lado, la prueba de toxicidad aguda demuestra que la concentración máxima de 1000 mg/Kg del extracto crudo no presenta ningún efecto tóxico dentro del organismo de los ratones, a pesar de haber administrado una dosis total por individuo de 6000 mg/Kg. Esto puede deberse al intervalo de administración del extracto, ya que permite que se dé una buena biotransformación y excreción de éste a través del hígado y riñones, siendo estos los órganos más importantes de depuración de compuestos con actividad terapéutica (Wilkinson, 2001).

Los resultados de necropsia e histopatología confirman esta teoría al tomar en cuenta las lesiones reportadas en la toxicidad aguda, ya que se observa un efecto tóxico agudo con consecuencias letales para ciertos individuos, todo esto derivado de la concentración máxima administrada en una sola dosis, mientras que en la segunda prueba no existió ninguna alteración, además de no observar diferencias significativas en cuanto a los pesos promedio de los ratones.

Estos hallazgos son de importancia, en virtud de que permiten continuar realizando diversas pruebas de evaluación biológica en ovinos, a fin de determinar la viabilidad del extracto de estafiate como una alternativa que pudiera ser viable para el posible tratamiento integral de la fasciolosis.

VIII. CONCLUSIONES

El extracto de estafiate (*Artemisia ludoviciana*), obtenido a partir de acetato de etilo, presenta una eficacia promisorio *in vitro* contra fasciolas jóvenes. Las fracciones obtenidas y purificadas a partir de este mantienen la eficacia y se demuestra la presencia de lactonas sesquiterpénicas dentro de ellas. La identificación por medio de HPLC-LCMS constata la presencia de artemisinina como el metabolito responsable de la eficacia.

El extracto crudo de estafiate (*Artemisia ludoviciana*) tiene un efecto sobre el tegumento de *Fasciola hepatica*, comprobado con estudios de MEB.

Las pruebas de toxicidad muestran que el extracto de estafiate puede presentar efectos nocivos para organismos vivos si se administra a dosis altas. Sin embargo, al dosificarse con intervalos de tiempo, el efecto se minimiza o no se presenta.

IX. REFERENCIAS

1. Abdelaal, M.M.O., Brennan, G.P., Abdel-Aziz, A., Fairweather, I. 2016. Ultrastructural changes to the tegumental system and gastrodermal cells of adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with a commercial preparation of myrrh (Mirazid). J. Helminthol. 91(6):672-685.
2. Acevedo R. P. M. del C., Hallal C. C., Flores P. I., Alba H. F., Mendoza G. M. B., Castro C. N., Barajas R. 2019. Anthelmintic effect and tissue alterations induced *in vitro* by hydrolysable tannins on the adult stage of the gastrointestinal nematode *Haemonchus contortus*. Vet. Parasitol. 266:1-6.
3. Adekenov, S.M. 2017. Sesquiterpene lactones with unusual structure. Their biogenesis and biological activity. J. Fitote. 121:16-30.
4. Aguilar C. A., Camacho J. R., Chino S., Jacquez P., López M. E. 1994. Plantas Medicinales del Herbario del IMSS; Cuadros básicos por aparatos y sistemas del cuerpo humano. IMSS Editorial. México, D.F.
5. Alcibar M. P., Anaya D. G. R. M., Flores C. R. 1985. Evaluación de la infectividad de miracidios y metacercarias de *Fasciola hepatica* en bovinos y ovinos con relación a su origen. Téc. Pec. Méx. 48:39-45.
6. Almazán C., Ávila G., Quiroz H., Ibarra F., Ochoa P. 2001. Effect of parasite burden in the detection of *Fasciola hepatica* antigens in serum and feces of experimentally infected sheep. Vet. Parasitol. 91:101-112.
7. Alonso D. M. A., Torres A. J. F. J., Sandoval C. C. A., Capetillo L. C., Brunet S., Hoste H. 2008. Effects of four tropical tanniniferous plant extracts on the inhibition of larval migration and the exsheathment process of *Trichostrongylus colubriformis* infective stage. Vet. Parasitol. 153(1-2):187-192.^a
8. Alonso D. M.A., Torres A. J. F. J., Sandoval C. C. A., Aguilar C. A. J., Hoste H. 2008. *In vitro* larval migration and kinetics of exsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. Vet. Parasitol. 153(3-4):313-319.^b

9. Álvarez J. M. 2016. Determinación de metabolitos secundarios de gordolobo (*Bocconia frutescens*) con actividad fasciolicida y su evaluación biológica *in vitro* (Tesis de Maestría). Ciudad de México, México. UNAM.
10. Álvarez J. M., Ibarra F., Alonso M. A., Vera Y., Ávila J. G., García A. M. 2015. *In vitro* antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. BMC Vet. Res. 11:45.
11. Bhalla R., Narasimhan K., Swarup S. 2005. Metabolomics and its role in understanding cellular responses in plants. Plant Cell Rep. 24(10):562-571.
12. Bowman D. D. 2011. Parasitología para veterinarios. 9ª Ed. Elsevier. España. Pp. 115-124.
13. Biblioteca digital de la medicina tradicional (BDMTM). Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (APMTM). Estafiate 2009. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). En línea: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=A Artemisia%20ludoviciana&id=7823>
Fecha de última consulta: 18 septiembre 2020.
14. Cameán A., Repetto M. 2006. Toxicología alimentaria. Ediciones Díaz de Santos. España. Pp. 77-94.
15. Cano A. L. M. 1997. Flora medicinal de Veracruz; I. Inventario Etno-botánico. Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz. México.
16. Ceballos L., Moreno L., Alvarez L., Shaw L., Fairweather I., Lanusse C. 2010. Unchanged triclabendazole kinetics after co-administration with ivermectin and methimazole: failure of its therapeutic activity against triclabendazole-resistant liver fluke. Vet. Res. 6:1-8.
17. Ceballos, L., Canton, C., Pruzzo, C., Sanabria, R., Moreno, L., Sanchis, J., Suarez, G., Ortiz, P., Fairweather, I., Lanusse, C., Alvarez, L., Martinez-Valladares, M., 2019. The egg hatch test: a useful tool for albendazole resistance diagnosis in *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol. 271:7–13.
18. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2019. Parasites, Fascioliasis. Online: <https://www.cdc.gov/dpdx/fascioliasis/index.html>
Fecha de última consulta: 03 septiembre 2020.

19. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO). Ficha Informativa, *Artemisia ludoviciana* Nutt. 2009. En línea: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/artemisia-ludoviciana/fichas/ficha.html>
Fecha de última consulta: 18 septiembre 2020.
20. Córdoba D. 2006. Toxicología. Manual Moderno, 5ª Edición. Bogotá. Pp. 105-109.
21. Cotelle S., Testolin R. C., Foltete A. S., Rissardi G. B., Silveira R. A. y Radetski C. M. 2012. Genotoxicity potential of a new natural formicide. Environ. Sci. Pollut. Res. 19:628-635.
22. Dargie J. D. 1987. The impact on production and mechanisms of pathogenesis of trematode infections in cattle and sheep. Int. J. Parasitol. 17:453-463.
23. Evans S., Hoffman R. 2012. Plantas de los dioses. Orígenes y uso de los alucinógenos. 2ª Ed. Fondo de Cultura Económica. México D.F.
24. Ezeta, M. A. 2016. Determinación de metabolitos secundarios de estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *mexicana*) con actividad fasciolicida y su evaluación biológica *in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. UNAM.
25. Fairweather I., Threadgold T. L., Hanna R. E. B. 1999. Development of *Fasciola hepatica* in the Mammalian Host. En: Fasciolosis. Ed. Dalton J. P. CAB International. United Kingdom. Pp. 47-111.
26. Fairweather I., Brennan G. P., Hanna R. E. B., Robinson M. W., Skuce P. J. 2020. Drug resistance in liver flukes. IJP: Drugs and drug resistance 12:39-59.
27. Fernández V., Estein S., Ortiz P., Luchessi P., Solano V., Solana H. A. 2015. A single aminoacid substitution in isozyme GSTmu in Triclabendazole resistant *Fasciola hepatica* (sligo strain) can substantially influence the manifestation of anthelmintic resistance. Exp. Parasitol. 159:274-279.

28. Ferreira J. F. S., Peadar P., Keiser J. 2011. *In vitro* trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis*. Trematocidal plant alcoholic extracts. Parasitol. Res. 109:1585-1592.
29. Flores A. K. 2017. Estudio del ciclo biológico de caracoles del género *Lymnaea* infectados experimentalmente con *Fasciola hepatica* para la obtención de metacercarias (Tesis de licenciatura). Cuautitlán Izcalli, Estado de México. UNAM.
30. Fox J.G., Anderson L.C., Loew F.M., Quimby F.W. 2002. Laboratory Animal Medicine. 2nd Academic Press. New York, USA.
31. Francisco G. 2015. Actividad fasciolicida *in vitro* de extractos de plantas provenientes de Amixtlán, Puebla. Tesis de licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México Ciudad de México. UNAM.
32. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 157, 35-37.
33. Fuenmayor G., Jonte L., Rosales L. N., Morales E. (2009). Crecimiento de la cianobacteria marina *Oscillatoria spp* MOF-06 en relación al pH en cultivos discontinuos. Rev. Soc. Ven. Microbiol. 29:21-25
34. Gemedé H., Ratta N. 2014. Antinutritional factors in plant foods: Potential health benefits and adverse effects. Int. J. Nut. and Food Sci. 3(4):284-289.
35. Guillard R. R., Ryther L. (1973). Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith W. L., Chanley M. H. (Eds.) Culture of marine Invertebrates Animals. Plenum Press. E.U.A. P. 26-60.
36. Halton, D.W. 2004. Microscopy and the helminth parasite. Micron. 35, 361-390.
37. Hanna R. E. B., Mc Mahon C., Ellison S., Edgar H. W., Kajugu P. E., Gordon A., Irwin D., Barley J. P., Malone F.E., Brennan G.P., Fairweather I., 2015. *Fasciola hepatica*: a comparative survey of adult fluke resistance to

- triclabendazole, nitroxynil and closantel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. *Vet. Parasitol.* 207, 34-43.
38. Harnborne J. B. 1970. Phytochemical phylogeny; proceedings of the Phytochemical Society Symposium. London Academic. London.
 39. Hayashi M., Hamada S., Sizuyo M., Takeshi W., Akihiro A., Shougo H., Satoko O., Shigenari K., Koji K., Madoka S., Hiroyasu O., Koji K., Yasushi A., Norihide S., Sei-ichi T., Hironobu Y., Nobuhiro R., Marshall C., Moore D., Blakey L., Schechtman J., Weaver D., Torous R., Proflock S., Itto C., Namiki Y. 2001. Evaluation of the Rodent Micronucleus Assay by a 28-Day Treatment Protocol: Summary of the 13th Collaborative Study by The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test (CSGMT) /Environmental Mutagen Society of Japan (JEMS)-Mammalian Mutagenicity Study Group (MMS). *Environ. Mol. Mutagen.* 37:93-110.
 40. Hayashi M. J. T., Mac Gregor J. T., Gatehouse G. D., Adler I. D., Blakey D. H., Dertinger S. D., Krishna G., Morita T., Russo A. y Sutou S. 2000. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. *Environ. Mol. Mutagen.* 35(3): 234-252.
 41. Hossain E., Chandra G., Nandy A.P., Mandal S.C., Gupta J.K. 2012. Anthelmintic effect of a methanol extract of leaves of *Dregea volubilis* on *Paramphistomum explanatum*. *Parasitol. Res.* 110:809-814.
 42. Huffman M. 2003. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. *Proc. Nat. Soc.* 62: 371-381.
 43. Ibarra, O. F. y Jenkins, D. C. 1984. An *in vitro* screen for new fasciolicidal agents. *Zeitschrift für Parasitenkunde*; 70:655-661.
 44. Ibarra M. S., Ibarra V. F., Ávila A. J. G. 2012. *In Vitro* Evaluation of Fasciolicide Activity with Hexane, Methanol and Ethyl Acetate with Extracts Processed and Obtained from Some Mexican Plants Used in Traditional Medicine Based on Ethno Botanical Studies. *Am. J. Plant Sci.* 3:506-511^a.

45. Ibarra M. S., Ibarra V. F., Ávila A. J. G. 2012. Obtaining the minimum lethal dose against *Fasciola hepatica* *in vitro* using plant extract hexanes with fasciolicide activity and toxicity evaluation on CD1 male mice. *Am. J. Plant Sci.* 3:899-903^b.
46. Kamaludeen, J., Graham-Brown, J., Stephens, N., Miller, J., Howell, A., Beesley, N., Hodgkinson, J., Learmount, J., Williams, D., 2019. Lack of efficacy of triclabendazole against *Fasciola hepatica* is present on sheep farms in three regions of England, and Wales. *Vet. Res.* 184, 502–507.
47. Kaplan R. M., Vidyashankar A. N. 2012. An inconvenient truth: Global worming and anthelmintic resistance. *Vet. Parasitol.* 186:70-78.
48. Kathleen R. Pritchett-Corning, Aurélie Girod, Gloria Ave- Ilaneda, Patricia E. Fritz, Sonja Chou y Marilyn J. Brown. 2011. Manual de signos clínicos en roedores y conejos. Charles River Laboratories. 1ª Edición.
49. Keiser J., Utzinger J. 2007. Food-borne trematodiasis: current chemotherapy and advances with artemisinins and synthetic trioxolanes. *Trends Parasitol.* 23(11):555-562.
50. Kelley J. M., Rathinasamy V., Elliot T. P., Rawlin G., Beddoe T., Stevenson M. A., Spithill T. W. 2020. Determination of the prevalence and intensity of *Fasciola hepatica* infection in dairy cattle from six irrigation regions of Victoria, South-eastern Australia, further identifying significant triclabendazole resistance on three properties. *Vet. Parasitol.* 277:109019.
51. Klayman D.L., 1985. Qinghaosu (artemisinin):an antimalarial drug from China. *Science* 228:1049-1055.
52. Krishna G. y Hayashi M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.* 455:155-166.
53. Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Aster J. C. (2010). Patología estructural y Funcional. 8º Ed. Cotran R. S. y Robbins S. L. Elsevier. España.
54. Latif Z., Sarker S.D. 2012. Isolation of Natural Products by Preparative High Performance Liquid Chromatography (Prep-HPLC). En: *Natural Products Isolation, Methods and Protocols* (3º Ed.) Ed. Sarker S.D., Nahar L. Humana Press. New York, USA. PP. 255-274.

55. Mas-Coma, S., Bargues, M.D., Valero, M.A. 2005. Fasciolasis and other plant-borne trematode zoonoses. *Int. J. Parasitol.* 35:1255-1278.
56. McConville, M., Brennan, G.P., Flanagan, A., Edgar, H.W.J., McCoy, M., Castillo, R., Hernández-Campos, A., Fairweather, I. 2008. Surface and internal tegumental changes in juvenile *Fasciola hepatica* following treatment *in vivo* with the experimental fasciolicide, compound alpha. *Vet. Parasitol.* 153:52-64.
57. McKinstry B., Fairweather I., Brennan G. P., Forbes A. B. 2003. *Fasciola hepatica*: tegumental surface alterations following treatment *in vivo* and *in vitro* with Nitroxinil (Trodax). *Parasitol. Res.* 91:251-263.
58. Mehmood K., Zhang H., Sabir A.J., Abbas R.Z., Ijaz M., Durrani A.Z., Saleem M.H., Rehman M.U., Iqbal M.K., Wang Y., Ahmad H.I., Abbas T., Hussain R., Ghorri M.T., Ali S., Khan A.U., Li J., 2017. A review on epidemiology, global prevalence and economical losses of fasciolosis in ruminants. *Microb. Pathog.* 109:253–262.
59. Moll L., Gaasenbeek C.P.H., Vellema P., Borgsteede F.H.M. 2000. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle and sheep in The Netherlands. *Vet. Parasitol.* 91:153-158.
60. Monroy O. C. y Castillo, E. P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. CONABIO. México.
61. Novobilsky, A., Solis, N.A., Skarin, M., Höglund, J., 2016. Assessment of flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* in sheep in Sweden in the absence of a standardised test. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 6:141–147.
62. Olaechea F., Lovera V., Larroza M., Raffo F., Cabrera R. 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Vet. Parasitol.* 178:364–366.
63. Olazabal M. E., Morales M. A., Serrano P. H., Brito A. E. 1999. Obtención de metacercarias de *Fasciola hepatica* en *Lymnaea cubensis* y relación parásito-hospedero en ratones Wistar y Balb/c. *Vet. Méx.* 30(1):109-115.

64. O'Neill J. F., Johnston R. C., Halferty L., Brennan G. P., Keiser J., Fairweather I. 2009. Adult triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*: morphological changes in the tegument and gut following *in vivo* treatment with artemether in the rat model. J. Helminthol. 83:151-163.
65. O'Neill J. F., Johnston R. C., Halferty L., Brennan G. P., Fairweather I., 2015a. Ultrastructural changes in the tegument and gut of adult *Fasciola hepatica* following *in vivo* treatment with artesunate. Exp. Parasitol. 154:143-154.
66. O'Neill J. F., Johnston R. C., Halferty L., Hanna R. E. B., Brennan G. P., Fairweather I. 2015b. A comparative study on the impact of two artemisinin derivatives, artemether and artesunate, on the female reproductive system of *Fasciola hepatica*. Vet. Parasitol. 211:182-194.
67. O'Neill J. F., Johnston R. C., Halferty L., Hanna R. E. B., Brennan G. P., Fairweather I., 2017. Disruption of spermatogenesis in the liver fluke, *Fasciola hepatica* by two artemisinin derivatives, artemether and artesunate. J. Helminthol. 91:55-71.
68. Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO). 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Organización para la Alimentación y la Agricultura; 157:35-37.
69. Organización Mundial de la Salud (OMS). 2002. Pautas generales para las metodologías de investigación y evaluación de la medicina tradicional. 81 pp. En línea: <http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/s4930s/s4930s.pdf>. Fecha de última consulta: 10 julio 2020.
70. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD) (2001). Guideline for testing of chemicals 420. Acute Oral Toxicity-Fixed Dose Procedure. 17 December. En línea: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948362.pdf> Fecha de última consulta: 13 diciembre 2020.
71. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD) (2008). Guideline for testing of chemicals 425. Acute Oral Toxicity-Up and Down Procedure (UDP). 3 October.

En línea: <https://www.oecd.org/env/test-no-425-acute-oral-toxicity-up-and-down-procedure-9789264071049-en.html>

Fecha de última consulta: 13 diciembre 2020.

72. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD) (2009). Guideline for testing of chemicals 452. Chronic Toxicity Studies. 7 September.

En línea: https://www.oecd.org/env/ehs/testing/E452_2009.pdf

Fecha de última consulta: 13 diciembre 2020.

73. Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) (2000). General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva. WHO/EDM/TRM/2000.1 En línea:

<http://apps.who.int/medicinedocs/pdf/whozip42e/whozip42e.pdf>

Fecha de última consulta: 23 julio 2020.

74. Organización Mundial de la Salud (World Health Organization, WHO). 2007. Report of the WHO. Informal Meeting on use of triclabendazole in fascioliasis control. WHO Headquarters, Geneva, Switzerland. October. 33 pp. En línea: http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/WHO_CD_S_NTD_PCT_2007.1.pdf.

Fecha de última consulta: 07 abril 2020.

75. Ortiz P., Scarcella S., Cerna C., Rosales C., Cabrera M., Guzmán M., Lamenza P., Solana H. 2013. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Cajamarca (Perú): a clinical trial and an *in vitro* efficacy test in sheep. Vet. Parasitol. 195:118-121.

76. Pan American Health Organization. World Health Organization (PAHO/WHO). 2003. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud, Organización Mundial de la Salud. 580(3):132-141.

77. Piedrafita D., Sphithill T. W., Smith R. E., Raadsma H. W. 2010. Improving animal and human health through understanding liver fluke immunology. Parasitol. Immunol. 572-581.

78. Quiroz R. H. 2003. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial Limusa. Ciudad de México, México. pp. 232-239.
79. Rai M., Cordell G. A., Martínez J.L., Marinoff M., Rastrelli L. 2012. Herbal drugs used for domestic animals. Medicinal plants: Biodiversity and drugs. New York: CRC press. P. 334-355.
80. Remigio M.A.C., Ferrer J. P., Hurtado Y. V., Ferrala C. R. y Carballo C. 2007. Evaluación genotóxica del extracto hidroalcohólico de *Tamarindus indica* L. empleando el ensayo de micronúcleos en médula ósea de ratón. Rev. Cubana Plant. Med. 12(2).
81. Rivas M. C., Oránday C. M. A., Verde S. M. J. 2016. Investigación en plantas de importancia médica. Omnia Science. Nuevo León, México.
82. Rivera N., Ibarra F., Zepeda A., Fortoul T., Hernández A., Castillo R., Cantó G. 2004. Tegumental Surface changes in adult *Fasciola hepatica* following treatment *in vitro* and *in vivo* with an experimental fasciolicide. Parasitol. Res. 93:283-286.
83. Rodríguez, A.M.; Coombes, A.J. y Jimenez, R.J. 2009. Plantas silvestres de puebla herbario y jardín botánico BUAP. México: Herbario BUAP.
84. Rodríguez-Vivas, R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Silva, V. H., Torres-Acosta, J. F., Fragoso, S. H., Romero, S. D., Rosario, C. R., Saldierna, F., García, C. D. 2017. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. Rev. Mex. Cienc. Pecu. 8(1), 61-74.
85. Rojo V. F. A., Meana A., Valcárcel F., Martínez V. M. 2012. Update on trematode infections in sheep. Vet. Parasitol. 189:15-38.
86. Romero G.R., Fernández M.J.L., Plaza B.P., Garrido F.A., Martínez V.J.L. 2007. Empleo de la espectrometría de masas como herramienta para la determinación de tóxicos en alimentos: hacia la seguridad alimentaria. Rev. Esp. Salud Pública, Vol. 81, No. 5.
87. Romero, J., Villaguala, C., Quiroz, F., Laudaeta-Aqueveque, C., Alfaro, G., Pérez, R., 2019. Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of triclabendazole and nitroxylnil in cattle of the central valley of Chile. Brazil J. Vet. Parasitol. 28:164–167.

88. Romo P. A. K. (2002). Manual para el cultivo de microalgas (Tesis de licenciatura). La Paz, Baja California Sur. Universidad Autónoma de Baja California Sur.
89. Rzedowsky G. C., Rzedowsky J. 1997. Compositae: Tribu *Anthemideae*. Flora del bajío y regiones adyacentes: Instituto de Ecología Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México. Fascículo 60.
90. Schmeller T, Latz-Brüning B, Wink M. 1997. Biochemical activities of berberine, palmatine and sanguinarine mediating chemical defence against microorganisms and herbivores. *Phytochemistry*. 44(2):257-266.
91. Shalaby H. A., El Namaky A. H., Kamel R. O. A. 2009. *In vitro* effect of artemether and triclabendazole on adult *Fasciola gigantica*. *Vet. Parasitol.* 160:76-82.
92. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Alimentaria (SENASICA). 1999. Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999): Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. [En línea]. Diario Oficial de la Federación. México.
En línea: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>
Fecha de última consulta: 16 noviembre 2020.
93. Shayne C. G. 2007. Animal models in toxicology. 2ª Ed. Taylor & Francis Group. USA. P. 48-71.
94. Shukla S., Mehta A., y Bajpai V. K. 2013. Phytochemical screening and anthelmintic and antifungal activities of leaf extracts of *Stevia rebaudiana*. *TBAP*. 3:(1)56-63.
95. Soulsby E. J. L. 1987. Parasitología y enfermedades parasitarias de los animales domésticos. Editorial Interamericana. México.
96. Stahl E. 1969. Thin layer chromatography: A laboratory handbook. Berlin: Springer.

97. Stitt, A.W., Fairweather, I. 1993. *Fasciola hepatica*: tegumental surface changes in adult and juvenile flukes following treatment *in vitro* with the sulphoxide metabolite of triclabendazole (Fasinex®). Parasitol. Res. 79:529-536.
98. Stuart J. A. 1999. The life cycle of *Fasciola hepatica*. En: Fasciolosis. Ed. Dalton J. P. (1999). CAB International. United Kingdom. Pag. 1-29.
99. Systat Software, Inc. 2008. Systat (Computer program) versión 12(32-bits) EUA. <http://www.systat.com>
100. Taylor M. A., Coop R. L., Wall R. L. (4ª Ed.) 2016. Veterinary Parasitology. Wiley Blackwell, UK. 1007 pp.
101. Toner, E., Brennan, G.P., Hanna, R.E.B., Edgar, H.W., Fairweather, I. 2010. Tegumental surface changes in adult *Fasciola hepatica* in response to treatment *in vivo* with triclabendazole in the sheep host. Vet. Parasitol. 172:238-248.
102. Torgerson P., Claxton J. 1999. Epidemiology and control. En: Fasciolosis. Ed. Dalton J. P. (1999). CAB International. United Kingdom. Pag. 113-149.
103. Vera M. R. Y. 1985. Evaluación de diferentes dietas alimenticias para cultivo en condiciones de laboratorio de *Lymnaea bulimoides*, *Lymnaea cubensis* y *Lymnaea humilis*. Tesis de licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México. Estado de México. UNAM.
104. Vera M. R. Y. 2005. Evaluación biológica y toxicológica de un fasciolicida experimental en bovinos. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México. UNAM.
105. Vera M. Y., Ibarra V. F., Ramirez A. G., Munguia X. I. 2008. *In vitro* fasciolicide activity of some plant extracts against newly excysted flukes. Ann. N. Y. Acad Sci. 1149:180-182.
106. Vera M.Y. 2011. Fasciolosis. En: Parasitología Veterinaria, Vol II. Helmintos. Eds: Ibarra V. F.; Figueroa C.J.A. y Quiroz R.H. 1ª. Edición. Ed. Color. México, D.F.

107. Wagner H., Bladt S. 1998. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. Springer. Alemania.
108. Wakata A., Miyamae Y., Sato S., Suzuki T., Morita T., Asano N., Awogi T., Kondo K. y Hayashi M. 1998. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: Summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS·MMS. Environ. Mol. Mutagen. 32: 84–100.
109. Walker S.M., McKinstry B., Boray J.C., Brennan G.P., Trudgett A., Hoey E.M., Fletcher H., Fairweather I. 2004. Response of two isolates of *Fasciola hepatica* to treatment with triclabendazole *in vivo* and *in vitro*. Parasitology Research; 94:427-438.
110. Wilkinson G.R. (2001). Farmacocinética. En: Las bases farmacológicas de la terapéutica, Vol. I. Eds: Hardman J. G., Limbird L. E. y Goodman G. A. 10ª Edición. Ed. Mc Graw-Hill Interamericana. México D. F. PP: 5-33.
111. Wink M. 1988. Plant breeding: importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. Theor. Appl. Genet. 75: 225-233.
112. Wood I. B., Amaral N. K., Bairden K., Duncan J. L., Kassai T., Malone J. B. Jr., Pankavic J. A., Reinecke R. K., Slocombe O., Taylor S. M., Vercruysse J. 1995. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) second edition of guidelines for evaluating the efficacy of anthelmintics in ruminants (bovine, ovine, caprine). Vet. Parasitol. 58:181-213.
113. Yarnell E. 2007. Plant chemistry in veterinary medicine: medicinal constituents. En: Wynn SG, Fougère BJ (eds). Veterinary herbal medicine. Sydney, Australia: Elsevier, pp. 159 - 182.
114. Zahir A.A., Rahuman A.A., Bagavan A., Geetha K., Kamaraj C., Elango G. 2012. Evaluation of medicinal plant extracts and isolated compound epicatechin from *Ricinus communis* against *Paramphistomum cervi*. Parasitol. Res. 111:1629-1635.



Efficacy of purified fractions of *Artemisia ludoviciana* Nutt. *mexicana* and ultrastructural damage to newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* *in vitro*

Alonso Ezeta-Miranda^a, Yolanda Vera-Montenegro^{a,*}, José Guillermo Avila-Acevedo^b, Ana María García-Borres^b, Edgar Antonio Estrella-Parra^b, Gerardo Francisco-Marquez^a, Froylán Ibarra-Velarde^a

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Departamento de Parasitología, UNAM, DF 04510, Mexico

^b Laboratorio de Fitoquímica, UBIPRO, FES-Iztacala, UNAM, Av. de los Barrios # 1, Tlalnepantla Estado de México, 54010. Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Artemisia ludoviciana
Fasciola hepatica
HPLC
SEM

ABSTRACT

The study aimed to evaluate the fasciolicidal efficacy of extracts and fractions of *Artemisia ludoviciana* and identify the active substance. Extracts from *A. ludoviciana* were obtained by using hexane, ethyl acetate and methanol. To test the extracts, newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica* were artificially obtained. The extracts were tested at concentrations of 125, 250, 375 and 500 mg/L. In each test run, an untreated control group and control wells containing triclabendazole sulfoxide were also included. The flukes were examined at 24, 48 and 72 h after treatment. Ethyl acetate extract (ALEAE) showed 100 % efficacy at 48 h of exposure ($P < 0.05$). Then, this extract was fractionated by column chromatography (CC), and the obtained fractions were evaluated *in vitro* as previously mentioned. The results indicated that fraction 3 yielded 100 % efficacy at 48 h ($P < 0.05$). Subsequently, the purification of fraction 3 was performed. New fractions were obtained (A–L), with sub-fraction “J” exhibiting 100 % efficacy at 24 h ($P < 0.05$). These sub-fractions were submitted to phytochemical analysis, demonstrated the presence of sesquiterpene lactones. Likewise, were analyzed by HPLC/MS/DAD, and the results showed that artemisinin was the main compound. In addition, flukes treated were examined by scanning electron microscopy (SEM) showing areas of inflammation throughout the tegument.

1. Introduction

Fasciolosis caused by *Fasciola hepatica* is the most important hepatic parasitic disease of livestock worldwide (Mas-Coma et al., 2005; Rojo et al., 2012). Its relevance lies in large economic losses, estimated in millions of dollars (Pan American Health Organization. World Health Organization (PAHO/WHO, 2003; Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2003; Mehmood et al., 2017). In Mexico, the estimated economic annual losses are approximately US\$4,239,667 (Rodríguez-Vivas et al., 2017).

Control of this disease is generally carried out with fascioliscides. However, the indiscriminate and inadequate use of these drugs has produced resistance in many parts of the world (Moll et al., 2000; Walker et al., 2004; Ceballos et al., 2010; Olaechea et al., 2011; Kaplan and Vidyashankar, 2012; Ortiz et al., 2013; Brockwell et al., 2014; Fernández et al., 2015; Hanna et al., 2015; Kelley et al., 2020).

On the other hand, the use of extracts and purified fractions of some

plants represents a viable alternative to control fasciolosis. In Mexico, the Asteraceae family of plants has approximately 380 genera with more than 3000 recognized species, including *Artemisia ludoviciana* Nutt. spp. *mexicana*. Several authors have used extracts of *Artemisia ludoviciana* for the treatment of a variety of pain conditions, gastrointestinal and respiratory problems and as antiparasitic drugs in humans (Aguilar et al., 1994; Cano, 1997; Rzedowski and Rzedowski, 1997; Heinrich et al., 1998; Hernández et al., 2003; Andrade, 2009; Calzada et al., 2010; Estrada et al., 2012; Juárez et al., 2013; Anaya et al., 2016; Alonso et al., 2017).

In the veterinary field, methanolic extracts of this plant have shown promising fasciolicidal efficacy when tested at concentrations *in vitro* of 500 mg/L (Ibarra et al., 2012) and 125, 250, 375 and 500 mg/L (Álvarez et al., 2015).

This efficacy is attributed to the important role of sesquiterpene lactones (Yarnell, 2007). The goals of this study were (1) to evaluate *in vitro* the fasciolicidal efficacy of some purified fractions of *Artemisia*

* Corresponding author at: Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, DF 04510, México.

E-mail address: fossaria@unam.mx (Y. Vera-Montenegro).