



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

Determinación de los índices de toxicidad del extracto metanólico de *Vernonanthura patens* y evaluación del efecto sobre *Fasciola hepatica* mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

GERARDO FRANCISCO MARQUEZ

TUTORA PRINCIPAL:

DRA. YOLANDA VERA MONTENEGRO

FMVZ-UNAM

COMITÉ TUTORAL:

Dr. JOSÉ GUILLERMO ÁVILA ACEVEDO

FES IZTACALA-UNAM

Dr. JOSÉ LUÍS OCAMPO CAMBEROS

FMVZ-UNAM

Ciudad de México, México, 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS INTITUCIONALES

- ❖ Al Posgrado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la oportunidad para continuar con mis estudios de Maestría.
- ❖ Al Proyecto UNAM-DGPA-PAPIIT IT202917 por el financiamiento para la realización del presente proyecto.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada durante la duración de mis estudios de Maestría (No. CVU 933367).
- ❖ Al Laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helminos del Departamento de Parasitología de la FMVZ-UNAM, por las facilidades otorgadas para realizar los experimentos.
- ❖ Al Laboratorio de Fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO) de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, por las facilidades otorgadas para la utilización de los equipos.
- ❖ A la encargada del Microscopio Electrónico de Barrido del Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO), ubicado en el Instituto de Biología de la UNAM. M. en C. María Berenit Mendoza Garfias, por las facilidades otorgadas para los estudios de Microscopia Electrónica de Barrido.
- ❖ Al encargado del Laboratorio de Ficología del Instituto de Biología de la UNAM. Dr. José Luis Godínez Ortega por las facilidades otorgadas para la identificación del Alga.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

- ❖ A mi asesora, la Dra. Yolanda Vera Montenegro por brindarme su apoyo, tiempo, dedicación y por enseñarme la metodología científica. Sin su apoyo nada de esto hubiera sido posible.
- ❖ Al Dr. Froylán Ibarra Velarde por sus enseñanzas durante mi formación académica.
- ❖ Al Dr. José Guillermo Ávila Acevedo y la Dra. Ana María García Bores por su tiempo, dedicación y asesoría a lo largo de este proyecto.
- ❖ A mi comité tutor, integrado por el Dr. José Guillermo Ávila Acevedo y el Dr. José Luis Ocampo Camberos, por sus asesorías a lo largo de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos (as) gracias por su apoyo y confianza.

Agradezco por no dejarme solo en momento difíciles. Como me dijeron en algún momento mientras nosotros estemos vivos te seguiremos apoyando.

CONTENIDO

LISTA DE CUADROS	6
LISTA DE GRÁFICAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
Abreviaturas y siglas usadas	9
RESUMEN	10
I. INTRODUCCIÓN	11
Morfología	11
Ciclo biológico	12
Patogenia y lesiones	14
Epidemiología	15
Importancia económica	15
Resistencia a fasciolicidas	16
Medicina tradicional	18
México y las plantas medicinales	18
Metabolitos secundarios	19
Pruebas toxicológicas	19
Producción de Metacercarias	20
Microscopia electrónica de barrido	20
II. ANTECEDENTES	21
Plantas con actividad Fasciolicida	21
Descripción Botánica	22
<i>Vernonanthura patens</i> (Tsapala)	22
III. JUSTIFICACIÓN	24
IV. HIPÓTESIS	24
V. OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos específicos	25
VI. MATERIALES Y MÉTODO	26
Localización del área de estudio	26
Colecta del material vegetal	26
Preparación del extracto	27

Determinación de la toxicidad aguda	27
Determinación de los índices de toxicidad y genotoxicidad en ratones mediante la prueba de micronúcleos.....	30
Determinación por microscopía electrónica de barrido el modo de acción del extracto de <i>Vernonanthura patens</i> contra <i>Fasciola hepatica</i>	31
VII. RESULTADOS.....	32
VIII. DISCUSIÓN.....	53
IX. CONCLUSIONES	55
X. REFERENCIAS.....	56

LISTA DE CUADROS

1. Reporte de resistencia antihelmíntica.
2. Diseño experimental de la toxicidad aguda en ratones CD1.
3. Diseño experimental de la toxicidad sub crónica en ratones CD1.
4. Diseño experimental de la toxicidad y genotoxicidad en ratones CD1.
5. Promedio de la ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en machos CD-1.
6. Promedio de la ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en hembra CD-1.
7. Porcentajes totales del índice de toxicidad del extracto metanólico de *V. patens* por grupo y horas de análisis.
8. Porcentaje total de micronúcleos del extracto metanólico de *V. patens*.

LISTA DE GRÁFICAS

1. Toxicidad aguda promedio del extracto metanólico de *V. patens* por concentración en ratones machos CD1.
2. Toxicidad aguda promedio del extracto metanólico de *V. patens* por concentración en ratones hembras CD1.
3. Toxicidad sub crónica promedio del extracto metanólico de *V. patens* por semana en ratones macho CD1.
4. Toxicidad sub crónica promedio del extracto metanólico de *V. patens* por semana en ratones hembra CD1.
5. Ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en machos CD1.
6. Ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en hembras CD1.
7. Porcentajes totales del índice de toxicidad del extracto metanólico de *V. patens* por grupo.

LISTA DE FIGURAS

1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*.
2. Tsapala (*Vernonanthura patens*).
3. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
4. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
5. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
6. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
7. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
8. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
9. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
10. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
11. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
12. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
13. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
14. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
15. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
16. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
17. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica.
18. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica.
19. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
20. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
21. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 125 mg/L.
22. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 125 mg/L.
23. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
24. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
25. Vista dorsal de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 250 mg/L.
26. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 250 mg/L.
27. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
28. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
29. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 375 mg/L.

30. Ventosa oral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 375 mg/L.
31. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
32. Vista dorsal de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento.
33. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 500 mg/L.
34. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 500 mg/L.

Abreviaturas y siglas usadas

1. ADP: Adenosín difosfato
2. ATP: Adenosín trifosfato
3. E: Espina
4. ENC: Eritrocitos normocromáticos
5. EPC: Eritrocitos policromáticos
6. g: Gramos
7. H₂O: Agua
8. HD: Huésped definitivo
9. HD: Huésped intermediario
10. Kg: Kilogramos
11. L: Litros
12. MEB: Microscopía electrónica de barrido
13. mg: miligramos
14. MN: Micronúcleos
15. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa
16. PE: Poro excretor
17. VO: Ventosa oral
18. VV: Ventosa ventral

RESUMEN

- El presente estudio tuvo como objetivo determinar la inocuidad del extracto metanólico de *Vernonanthura patens* mediante la prueba de toxicidad aguda, sub crónica y de micronúcleos, Así como la identificación de los daños ocasionados del extracto mediante microscopia electrónica de barrido sobre fasciolas juveniles Para la prueba de toxicidad aguda se utilizaron 100 ratones CD-1 de 8 semanas de edad. Se formaron 10 grupos con 10 ratones cada uno. Grupo 1 control negativo; Grupo 2 control positivo con H₂O; los Grupos 3, 4, y 5; se evaluaron a las dosis de 1250, 2500, y 5000 mg/Kg del extracto. Los resultados mostraron que después de la administración oral con el extracto de *V. patens*, no se presentó ningún efecto tóxico en las dosis evaluadas (P<0.05). Para la prueba de toxicidad sub-crónica, se utilizaron 120 ratones CD-1 de 8 semanas de edad. Se formaron 10 grupos con 10 ratones cada uno. Grupo 1 control negativo (sin Tx); Grupo 2 control positivo con H₂O; los Grupos 3, 4, 5, y 6; se evaluaron a las dosis de 125, 250, 375 y 500 mg/Kg. A todos los grupos se les administró cada semana una sola dosis vía oral, hasta cumplir un máximo de 6 administraciones, los estudios histopatológicos demostraron que las dosis evaluadas no presentaron un efecto tóxico (P<0.05). Para la prueba de micronúcleos se utilizaron 20 ratones de 8 semanas de edad. Grupo 1 control negativo (sin Tx); Grupo 2 control positivo con Ifosfamida aplicada una sola vez intraperitonealmente los Grupos 3, 4, y 5; se evaluaron a las concentraciones de 125, 375, y 500 mg/L con el extracto. Cada uno de los tratamientos fue administrado cada 24 horas hasta cumplir un máximo de tres dosis. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48, 72, y 96 horas post-tratamiento para obtener un total de 3 frotis por cada ratón. Las evaluaciones se realizaron mediante la identificación de eritrocitos policromaticos (EPC), eritrocitos normocromaticos (ENC) y micronúcleos (MN), Los resultados de la prueba de genotoxicidad demostraron que el extracto no presenta daños en la replicación celular, debido a que no se encontraron indicios de micronúcleos. Para poder elucidar los daños estructurales del extracto de *V. patens* sobre *Fasciola hepatica* por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) , se utilizaron 150 fasciolas desenquistadas artificialmente y tratadas con el extracto metanólico a las concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L, con su respectivo grupo testigo sin tratamiento. Los resultados obtenidos demostraron los daños del extracto sobre el tegumento del parásito, con base a los resultados obtenidos de toxicidad del extracto metanólico de *V. patens*, se concluye que el extracto es inócuo desde una concentración de 125 mg/Kg hasta 5000 mg/Kg.

I. INTRODUCCIÓN

La fasciolosis es una enfermedad parasitaria de distribución mundial, ocasionada por el trematodo *Fasciola hepatica*, se localiza en el hígado y conductos biliares de los ovinos, bovinos, caprinos, cerdos, equinos, conejos, venados y el ser humano (Taylor et al., 2015).

En México se conoce también a la enfermedad con los nombres de distomatosis hepática, conchuela del hígado, hígado picado, hígado podrido, mal de botella, palomilla. Es una enfermedad de gran importancia ya que provoca un proceso inflamatorio generalmente crónico del hígado y conductos biliares, ocasionando trastornos digestivos y de nutrición (Cruz, 2000).

Por otro lado, las características epidemiológicas y de transmisión de la fasciolosis hacen que la enfermedad tenga una distribución irregular; los focos guardan relación con su distribución geográfica la cual corresponde a la de los hospederos intermediarios, que son caracoles dulceacuícolas pulmonados de la familia *Lymnaeidae*. Los estudios sobre el terreno y en el laboratorio han demostrado que la fasciolosis tiene una gran capacidad de propagación, que guarda relación con la capacidad de ampliación de nichos ecológicos de los limneidos huéspedes intermediarios y con la considerable capacidad de colonización y adaptación del parásito. También estos trematodos han puesto en práctica distintas estrategias de adaptación que permite tasa más elevadas de transmisión del parásito (Vera, 2011).

Morfología

Fasciola hepatica es un platelminto hermafrodita de cuerpo ancho y aplanado dorsoventralmente, el parásito adulto mide de 15-18 x 4-13 mm. Posee dos ventosas muy próximas, la ventral más grande que la oral y un proceso cónico en su extremo anterior donde se encuentra la boca. Los órganos internos que conforman el aparato digestivo y reproductor son muy ramificados, especialmente los ciegos que son largos y con numerosos divertículos laterales. Los testículos ocupan la parte media corporal. El cirro está bien desarrollado y la bolsa del cirro incluye también a la próstata y la vesícula seminal. Cuenta con un solo ovario y el útero se localiza anteriormente a los testículos. Las glándulas vitelógenas están formadas por finos folículos, se unen formando dos transversales que drenan en la glándula de Mehlis, desde la cual comunica con el ootipo (Taylor et al., 2015).

El tegumento está cubierto por numerosas espinas dirigidas hacia atrás. Los huevos miden de 130 a 150 x 63 a 90 μm , posee un opérculo y su cáscara es

relativamente delgada la cual está teñida por pigmentos biliares de tonos amarillos en su interior. Entre numerosas células vitelinas yace el embrión de color claro y posición central (Taylor et al., 2015).

Ciclo biológico

El parásito adulto se localiza en los conductos biliares del hospedador definitivo donde vierte sus huevos (Fig. 1). Los cuales pasan al duodeno junto con la bilis y de ahí son evacuados con las heces. En condiciones de temperatura (26 °C) y humedad 80%) adecuadas, los huevos se desarrollan y eclosionan aproximadamente entre 2 y 3 semanas. Los huevos no eclosionan hasta estar libres en el agua, pues las condiciones anaerobias de las masas fecales impiden su desarrollo. La primera fase larvaria es el miracidio, es ciliado y posee dos manchas oculares semilunares. Pueden vivir libres en el agua hasta 24 horas, pero pierden su capacidad de penetrar al caracol entre las tres a seis horas posteriores a su eclosión. Al aproximarse a un caracol hospedero intermediario (*Lymnaea bulimoides*, *L. humilis*, *L. cubensis*), los receptores quimiotácticos los dirigen hacia las sustancias del mucus. Una vez en contacto con los caracoles, los miracidios giran sobre su propio eje mayor vertiendo una secreción histolítica que facilita su entrada, penetran en ellos por la cavidad respiratoria o a través del tegumento del pie, pierden la cubierta ciliada, pasan a los canales linfáticos y a los vasos sanguíneos, alojándose en la glándula digestiva, donde se transforman en la segunda fase larvaria el esporocisto; en un lapso de 14 días, cada esporocisto produce y libera de 5 a 8 redias, que se transportan al hepatopáncreas del caracol. Cada redia da origen a redias hijas y cercarías. La cercaria es la última fase evolutiva que parasita al caracol, con un promedio de 9 a 649 por miracidio; después de 4 a 6 semanas las cercarías abandonan a las redias a través de su abertura tocológica y al caracol por su aparato respiratorio (Vera, 2011; Taylor et al., 2015).

En el agua, las cercarias se adhieren a objetos, especialmente plantas o a la superficie inferior de la película superficial del agua; pierden su color y segregan a su alrededor un quiste de doble pared. El enquistamiento se completa de 20 a 30 minutos formando las metacercarias. La metacercaria mide aproximadamente 0.2 mm es redondeada, de color blanquecino, requiere de 24 horas para madurar y poder ser infectante (Taylor et al., 2015).

Las metacercarias son ingeridas por el hospedador definitivo junto con el alimento o el agua. El desenquistamiento de las metacercarias tiene lugar en dos fases: la primera o de activación comienza en el rumen, en una atmosfera de anhídrido carbónico concentrado, bajo condiciones reductivas y a temperatura de 39 °C. La segunda o emergencia tiene lugar en el duodeno, más allá de la abertura del conducto biliar, donde la bilis provoca la emergencia activando las enzimas de la

metacercaria, que provoca la apertura del orificio de emergencia del quiste. Las metacercarias se alimentan de la mucosa intestinal y después perforan rápidamente la pared intestinal. La mayoría de las duelas están en la cavidad peritoneal 24 horas después del desenquistamiento, desde allí emigran hacia el hígado. A las 90 horas post infección comienza la penetración de la cápsula de Glisson; en este momento las fasciolas tienen forma lanceolada y miden 1-2 mm. Tras un periodo de migración, alimentación y crecimiento rápido en el parénquima de aproximadamente 6 semanas, los parásitos se alojan finalmente en los conductos biliares a partir de los 40 días post infección, aproximadamente donde alcanzan la madurez sexual. Las fasciolas se autofecundan. Los primeros huevos aparecen en las heces del hospedador a partir de 55-56 días desde la ingesta de las metacercarias (Vera, 2011).

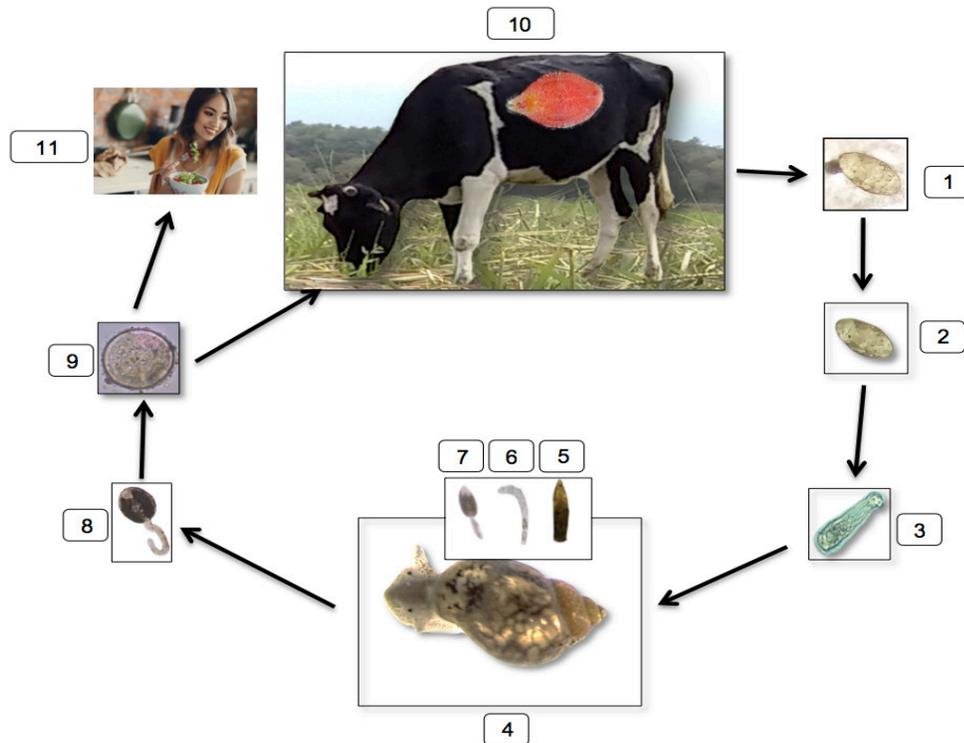


Fig. 1. Ciclo biológico de *Fasciola hepatica*; 1: Huevo; 2: Huevo larvado; 3: Miracidio; 4: Caracol del género *Lymnaea* spp; 5: Esporocisto; 6: Redia; 7: Cercaria; 8: Cercaria fuera del caracol; 9: Metacercaria; 10: Huésped definitivo; 11: Huésped definitivo humano. Imágenes 1-10: Laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helmintos. Depto. Parasitología FMVZ-UNAM; Imagen 11: <https://www.freepik.es>.

Patogenia y lesiones

El grado de patogenicidad depende del número de metacercarias y su infectividad. La infección se puede presentar en forma crónica y aguda. La forma crónica pocas veces llega a tener consecuencias fatales y se debe a la presencia de los parásitos adultos en los conductos biliares; en hígado presenta fibrosis y colangitis hiperplástica. En los bovinos se presenta calcifilaxis, es decir calcificación en los conductos biliares. La forma aguda, que es casi exclusiva de los borregos, es causada por el tránsito sin rumbo de las fasciolas inmaduras por el hígado. La lesión característica es una hepatitis traumática. Los signos clínicos que se presentan en la forma aguda son casi inaparentes. En animales muy afectados se pueden observar depresión, anorexia, aislamiento, fatiga y ascitis. En la forma crónica se manifiesta la anemia, edema submandibular y en casos extremos la enfermedad degenera produciendo mortalidad (Vera, 2011; Álvarez et al., 2014; Siles et al., 2021; Mas-coma et al., 2022).

Diagnóstico

El diagnóstico para la fasciolosis, puede realizarse mediante; a) Diagnóstico clínico: Mediante la observación del estado general del animal, los signos clínicos que se presentan: diarrea, edema submandibular, emaciación, anorexia, palidez de las mucosas, anemia y abortos; b) De laboratorio: El método tradicional es la utilización de la técnica coprológica por sedimentación, la cual a pesar de ser un muy antiguo continúa siendo preciso, barato y fácil de realizar, ya que muestra la presencia de infección activa a través de la demostración de los huevos del trematodo en heces (Siles et al., 2021) ; c) Pruebas inmunológicas: Existen considerables técnicas inmunológicas tales como: Difusión doble en agar, inmunoelectroforesis, contraelectroforesis, hemaglutinación pasiva, aglutinación en látex, Inmunofluorescencia, fijación de complemento, ELISA indirecto y coproantígenos (Vera, 2011); d) Mediante pruebas moleculares; Las pruebas mas utilizadas son: Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), PCR en tiempo real, PCR multiplex y amplificación isotérmica mediada por bucle (Arifin et al., 2016; Shoriki et al., 2016; Ollivier et al., 2020; Carnevale et al., 2021; Davies et al., 2021); e) Por necropsia: Este método es el más utilizado en los rastros, en donde el veterinario inspecciona la presencia o no de fasciolas en los conductos biliares, de los hígados de los animales que son sacrificados (Vera, 2011; Álvarez et al., 2014; Doxon et al., 2016; Wilson et al., 2019).

Epidemiología

La epidemiología de la fasciolosis está relacionada con las características geográficas y ambientales del área donde se produce la transmisión. Los estudios sobre el terreno y en el laboratorio han demostrado que la fasciolosis tiene una gran capacidad de propagación debido a la ampliación de los nichos ecológicos y a la adaptabilidad a factores geoclimáticos, ecológicos y antropogénicos por parte del huésped intermediario. También estos trematodos han puesto en práctica distintas estrategias de adaptación lo cual permite tasas más elevadas de transmisión (Vera, 2011; Beesley et al., 2017; Guerrero et al., 2020).

Importancia económica

Se estima que 300 millones de bovinos y 250 millones de ovinos, a nivel mundial, se encuentran afectados por *F. hepatica* (Mas-Coma et al., 2005; Cwiklinski et al., 2015; Ibarra et al., 2018;). Además, se estima una pérdida de \$ 3 mil millones de dólares a nivel mundial (Dalton et al., 2013). En México, esta enfermedad se encuentra diagnosticada en 29 de los 32 estados (Ibarra et al., 2018), lo cual estima una pérdida de \$ 4,239,667 millones de dólares por año (Rodríguez-Vivas et al., 2017).

Tratamiento

Durante décadas la quimioterapia tanto en México como a nivel mundial, ha sido la forma habitual de control de la fasciolosis, en virtud de haber demostrado ser hasta el momento el método más eficaz para remover los parásitos cuando estos se encuentran en el huésped definitivo. A través de las décadas se han desarrollado un considerable número de fasciolicidas los cuales han demostrado eficacia de mayor o menor grado contra las diferentes edades de este parásito. La mayoría de estos productos están incluidos dentro de los siguientes grupos químicos (Vera, 2011; Ezeta, 2021):

1. Benzimidazoles:

Carbamatos: El Albendazol® produce deficiencia de energía en el parásito y subsecuentemente la muerte y el Mebendazol® inhibe el paso de glucosa al parásito.

Benzimidazoles: El Triclabendazol® bloquea el paso de glucosa en el parásito.

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 Nitroxinil® inhibe la contracción muscular del parásito.
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.

Debido al paso de los años algunos de ellos han sido descontinuados, hasta la fecha el grupo mas utilizado a nivel mundial es el de los benzimidazoles, siendo el Triclabendazol el de mayor eficacia clínica, debido a que a diferencia de los otros fasciolicidas actúa contra todas las fases del parásito (Moll, 2000; Vera, 2005).

Resistencia a fasciolicidas

Debido al uso indiscriminado de estos medicamentos junto con una mala prevención y un mal diagnóstico ha permitido la generación y resistencia por parte del parásito a estos fármacos en diferentes países del mundo (Fairweather et al., 2020) (cuadro 1).

Cuadro 1. Reporte de resistencia antihelmíntica

Referencia	Año	Fármaco	País	Huésped	
				Bovinos	Ovinos
Overend y Bowen, 1995.	1995	Triclabendazol	Australia		x
Mitchell et al., 1998.	1998	Triclabendazol	Escocia		x
Moll et al., 2000.	2000	Triclabendazol	Holanda	x	x
Thomas et al., 2000.	2000	Triclabendazol	Glaes		x
Borgsteede et al., 2005.	2005	Triclabendazol	Holanda		x
Álvarez-Sanchez et al., 2006.	2006	Albendazol y Triclabendazol	España		x
Elitok et al., 2006.	2006	Albendazol y Rafoxanida	Turquía	x	
Olivera et al., 2008.	2008	Triclabendazol	Brasil		x
Mooney et al., 2009.	2009	Triclabendazol	Irlanda		x
Mamani et al., 2009.	2009	Albendazol y Triclabendazol	Bolivia		x
Flanagan et al., 2010.	2010	Triclabendazol	Irlanda (Norte)		x
Martínez-Valladares et al., 2010.	2010	Triclabendazol	España		x
Sargison et al., 2011.	2011	Triclabendazol	Escocia		x
Olaechea et al., 2011.	2011	Triclabendazol	Argentina	x	
Daniel et al., 2012.	2012	Triclabendazol	Gales y Escocia		x
Gordon et al., 2012. ^a	2012	Triclabendazol	Escocia		x
Gordon et al., 2012. ^b	2012	Triclabendazol	Escocia		x
Novobilský et al., 2012.	2012	Albendazol	Suecia		x
Chávez et al., 2012.	2012	Albendazol y Triclabendazol	Perú	x	
Rojas et al., 2012.	2012	Triclabendazol	Perú	x	
Shokier et al., 2013.	2013	Albendazol y Rafoxanida	Egipto	x	
Ortiz et al., 2013.	2013	Triclabendazol	Perú	x	x
Robles-Pérez et al., 2013.	2013	Albendazol y Clorsulon	España		x
Sanabria et al., 2013.	2013	Albendazol	Argentina		x
Martínez-Valladares et al., 2014.	2014	Albendazol y Clorsulon	España		x
Brockwell et al., 2014.	2014	Triclabendazol	Australia	x	
Elliott et al., 2015.	2015	Albendazol y Triclabendazol	Filipinas	x	
Novobilský et al., 2015.	2015	Triclabendazol	Australia	x	
Hanna et al., 2015.	2015	Triclabendazol	Irlanda (Norte)		x
Novobilský et al., 2016.	2016	Closantel	Suecia	x	x
Nzalawahe et al., 2018.	2018	Albendazol	Tanzania	x	
Romero et al., 2019.	2019	Triclabendazol	Chile	x	
Kamaludeen et al., 2019.	2019	Triclabendazol	Inglaterra, Gales		x
Ceballos et al., 2019.	2019	Albendazol	Uruguay y Argentina		x

Una alternativa para esta problemática es la utilización de plantas medicinales o el uso de extractos de plantas con actividad fasciolicida.

Medicina tradicional.

Las formas de utilización indígena de los recursos naturales son múltiples e integrales. El conocimiento adquirido se trasmite de generación en generación dicho conocimiento, está vinculado a la forma de percibir la realidad y su relación (Monroy, 2017). Las plantas medicinales han demostrado ser un método alternativo debido a que sintetizan una gran cantidad de compuestos los cuales no son estrictamente necesarios para su crecimiento o reproducción, pero cuya presencia es indispensable y puede ser demostrada genéticamente, fisiológicamente o bioquímicamente. Estos compuestos son denominados metabolitos secundarios (Kotni, 2019). Recientemente se ha presentado atención a la actividad biológica de estos compuestos, tal interés se debe al hecho de que durante las últimas décadas los productos naturales han presentado una gran ventaja sobre las drogas sintéticas debido a la amplia gama de compuestos que presentan, los cuales podrían tener un efecto exitoso para el tratamiento de varias enfermedades, La organización mundial de la salud, estima que alrededor del 80% de la población especialmente países en vías de desarrollo, utilizan las plantas medicinales como medicamentos (Kasterova et al., 2019).

México y las plantas medicinales

El uso de las plantas en México se ha registrado desde tiempos prehispánicos. En la medicina tradicional mexicana se utiliza una gran variedad de plantas para el tratamiento de enfermedades gastrointestinales. En México, la medicina tradicional es la primera alternativa en el cuidado de la salud (Torres et al., 2023). Las autoridades sanitarias mexicanas han mostrado interés en la investigación de las plantas medicinales por lo cual en el 2001 publicaron la primera edición de la Farmacopea Herbolaria y en el 2013 la segunda edición; en dichos documentos se consigan los métodos generales de análisis y sus especificaciones técnicas que deben cubrir las plantas y sus derivados para la elaboración de medicamentos herbolarios (FHEUM, 2001, 2013). Sin embargo, solo se ha estudiado un pequeño grupo de plantas medicinales, lo cual representa una gran ventaja sobre los productos químicos, debido a que solo el 40.9 % de la población mexicana tiene acceso a los servicios de salud. Esto significa que el 59.1 % de la población no tienen acceso a una institución de salud pública. Por lo cual, recurren a la medicina alternativa (plantas medicinales) (Alonso et al., 2017).

Metabolitos secundarios

Las plantas producen una gran variedad de compuestos bioactivos llamados metabolitos secundarios como medio de defensa al ataque de insectos, microorganismos y de adaptación a condiciones ambientales adversas (temperatura, humedad, intensidad de luz, sequia, etc.) (Ramakrishna et al., 2011). Los principios activos son aquellos, compuestos que tiene la capacidad de provocar efectos farmacológicos o toxicológicos en humanos y/o animales (Vélez, 2014). El contenido de los principios activos en los tejidos vegetales puede variar en función de factores genéticos, los ontogénicos y los fenológicos propios de cada especie y puede ser afectado por las condiciones ambientales (climáticas, luz, temperatura y precipitación), las características del suelo y presencia de depredadores. La consideración de estos factores es imprescindible para el estudio y aprovechamiento de estas sustancias. La acción farmacológica o terapéutica de una planta medicinal depende de uno o varios principios activos, existiendo sinergismo y acciones coadyuvantes (Hernández, 2009).

Sin embargo, antes de considerar a los extractos para futuras evaluaciones *in vivo*, es necesario realizar estudios previos de toxicidad para determinar su inocuidad y de microscopia electrónica de barrido para determinar los daños ocasionados por parte del extracto a *Fasciola hepatica*.

Pruebas toxicológicas

La toxicidad aguda de una sustancia se refiere a los efectos adversos que se manifiestan tras la administración de una sola dosis por vía oral o cutánea, El principio de la prueba nos permite calcular la dosis letal 50 (DL₅₀). Una de las especies animales mas utilizadas son los ratones, debido a su facilidad de manejo y costos de mantenimiento (OECD/OCDE 2001, Shayne, 2007). Otra prueba de gran importancia es la de toxicidad sub crónica, a través de esta prueba se pueden saber los efectos adversos que se tienen tras una administración prolongada en los órganos de los animales (OECD/OCDE 2017). Otro estudio importante es la prueba de micronúcleos. El principio es la detección de micronúcleos. Los cuales se forman durante la replicación debido a que el material genético que se desprende, no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, originando un nuevo núcleo de menor tamaño denominado micronúcleo (MN) (Krishna et al., 2000).

Producción de Metacercarias

Las metacercarias de *F. hepatica* utilizadas para los estudios de microscopía electrónica, fueron producidas en el laboratorio de Malacología del Depto. Parasitología de la FMVZ-UNAM, a partir de la infección de 200 caracoles *L. humilis* de 20 días de edad, infectados de 3 a 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. Transcurrido este tiempo, los caracoles infectados fueron sometidos a estrés térmico con ayuda de una bombilla eléctrica, por 24 horas para facilitar la liberación de las 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 su posterior evaluación.

Microscopia electrónica de barrido

Los estudios de microscopía electrónica son de suma importancia para poder distinguir detalles finos de una imagen. La microscopia electrónica de barrido (MEB), permite conocer la morfología superficial de las muestras, debido a la generación de electrones los cuales interactúan con la muestra, posteriormente esas interacciones son captadas por unos detectores específicos los cuales captan la señal electrónica generando la imagen la cual es proyectada en una pantalla (Ipohorski, 2013).

II. ANTECEDENTES

Se han llevado a cabo diversos estudios con respecto a la eficacia de diferentes extractos de plantas contra distintos parásitos. Lográndose obtener inhibiciones *in vitro* del 91.2% de larvas L3 de *Haemonchus contortus*, utilizando extractos de *Acacia pennatula* (Huizache), *Leucaena leucocephala* (Leucaena), *Lysiloma latisiliquum* (Tzalam) (Alonso., 2008). Váradyova en el 2018, demostró eficacias *in vitro* del 100% de *Artemisia absinthium* (Ajenjo) sobre larvas de *H. contortus*. De igual forma Busari en el 2021, reporta la eficacia *in vitro* del 89% del extracto metanólico de *Terminalia glaucescens* (Mirtilo) contra huevos de *H. contortus*.

Hossain., en el 2022 demostró el efecto antihelmíntico *in vitro* utilizando parásitos adultos de *Paramphistomun explanatum*, con un extracto metanólico de Machiguá (*Dregea volubilis*) a diferentes concentraciones, provocando la parálisis y muerte del parásito.

Harba et al., en el 2019 reporta una eficacia *in vitro* del 90 % del extracto de *Cymbopogon citratus* (Zacate limón) y de *Pulicaria undulata* (Pulga) con *Gardia lamblia*.

Campos (2021), logran obtener una eficacia del 100 % en condiciones *in vitro* utilizando el extracto de *Schinus terebinthifolia* Raddi (Pimentero) contra *Ancylostoma* spp. Trabajando con larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con el extracto de *Achyrocline satureioides* (La marcela), Fantatto, en el 2022 logra una eficacia acaricida *in vitro* del 100%.

Martínez et al., en el 2022, reporta una eficacia *in vitro* del 100% con la fracción (AE-Hbr) de *Habranthus brachyandrus* (Panadera) contra *Trypanosoma cruzi*.

Plantas con actividad Fasciolicida

Para determinar la eficacia fasciolicida de extractos de plantas, se han llevado a cabo diversos estudios, donde se demostró que los extractos crudos de *Tilia mexicana* (Tila), *Coffea arabica* (Café), *Eriobotrya japónica* (Níspero japonés), *Ternstroemia pringlei* (Tila roja) a concentraciones de 50 y 500 mg/L. mostraron eficacias del 100 % *in vitro* (Vera, 2008). En el 2013 Álvarez demostró la eficacia fasciolicida *in vitro* de extractos crudos de *Artemisa ludoviciana* Nutt. Spp *mexicana* (Estafiate) y *Bocconia frutescens* (Gordolobo) a concentraciones de 125, 250 y 500 mg/L, obteniendo el 100 % de eficacia en las concentraciones evaluadas. Sánchez en el 2015 obtuvo una eficacia fasciolicida *in vitro* del 83.3 y 98 % con los extractos crudos de *Buddleia cordata* (Tepozán) y de *Bocconia*

frutescens a concentraciones de 500 mg/L. Francisco en el 2015, consiguió una eficacia fasciolicida *in vitro* del 100 % con los extractos crudos de *Psidium guajava* (Guayaba), *Casimiroa edulis* (Zapote blanco) y *Vernonanthura patens* (Tsapala) a concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L. Landeros en el 2015 reporta una eficacia fasciolicida *in vitro* de la fracción (i) de *Bocconia frutescens* a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. obteniendo una eficacia del 100 % en todas las concentraciones evaluadas. En el 2016 Ezeta, determinó la eficacia fasciolicida de algunas fracciones de *Artemisa ludoviciana* Nutt. Spp *mexicana* a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. obteniendo el 100 % de eficacia en todas las concentraciones evaluadas. En el 2020 Ezeta reporta el efecto antihelmíntico de la sub fracción “J”, obtenida a partir de la fracción 3 del extracto de acetato de etilo a concentraciones de 100, 200, 300, 400 y 500 mg/L. obteniendo el 100 % de eficacia en todas las concentraciones evaluadas.

Descripción Botánica

Reino: Plantae

División: Tracheophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Asterales

Familia: Compositae

Género: *Vernonanthura*

Epíteto específico: *patens*

***Vernonanthura patens* (Tsapala)**

Se distribuye a través de México, las Antillas, América Central y del Sur. Las decocciones de sus hojas son empleadas en la medicina folclórica para combatir el paludismo, dolores estomacales, erupciones en la piel, diarreas, aliviar dolores de cabeza y como antihelmíntico, a pesar de los usos tradicionales, sus estudios químicos son muy escasos. Investigaciones realizadas por Manzano en el 2012, determina la presencia de triterpenos y sesquiterpenos en las hojas de la planta. Además reporta una actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* y *Penicillium notatum* (Manzano et al., 2013a). En las flores identifica la presencia de compuestos fenólicos, taninos y triterpenos. además de mostrar actividad biológica contra *Plasmodium falciparum* (Manzano et al., 2013b). En el 2015, reporta la presencia de compuestos fenólicos, taninos, y flavonoides en las hojas de planta (Manzano et al., 2015). Por último, en el 2021, reporta la presencia de un triterpenoide en las hojas de la planta (Manzano., et al 2021).

En México, Estudios realizados en el 2015 por Francisco, demostraron la eficacia fasciolicida *in vitro* del extracto crudo de que planta a concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L. obteniendo el 100 % de eficacia en todas las concentraciones evaluadas y la presencia de alcaloides, taninos y flavonoides en el extracto crudo. Así mismo Gutiérrez en el 2018 reporta la presencia de alcaloides y flavonoides en algunas fracciones aisladas del extracto crudo *V. patens*. Hasta el momento no se cuenta con información sobre la seguridad del extracto metanólico de *V. patens*, por lo tanto, esto motivo a realizar estudios de toxicidad para demostrar la inocuidad o toxicidad del extracto (Figura 2).



Fig. 2 Tsapala (*Vernonia patens*).

III. JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes *in vitro* han demostrado que el extracto metanólico de *Vernonanthura patens* presenta una eficacia promisorio contra *Fasciola hepatica*, sin embargo, antes de considerar al extracto como una opción terapéutica es necesario llevar a cabo pruebas toxicológicas bajo condiciones *in vivo* para determinar la inocuidad o toxicidad de la planta.

IV. HIPÓTESIS

El extracto crudo de *Vernonanthura patens* no presenta un efecto tóxico en ratones CD1.

El extracto crudo de *Vernonanthura patens* presenta un efecto sobre el tegumento de *Fasciola hepatica*.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar la inocuidad del extracto metanólico de *Vernonanthura patens* mediante pruebas toxicológicas en ratones CD1 y el efecto sobre fasciolas recién desenquistadas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB).

Objetivos específicos

- ❖ Obtener el extracto crudo de *Vernonanthura patens* con solvente orgánico (metanol) a partir de hojas de la planta para determinar los efectos toxicológicos del extracto.
- ❖ Evaluar la toxicidad aguda del extracto crudo en ratones CD1 para calcular la dosis letal 50 (DL₅₀).
- ❖ Evaluar la toxicidad sub crónica del extracto crudo en ratones CD1 para determinar daños en los órganos.
- ❖ Evaluar la genotoxicidad del extracto crudo en ratones CD1, mediante la prueba de micronúcleos para determinar si existe algún daño en la replicación celular.
- ❖ Evaluar los daños estructurales por parte del extracto sobre fasciolas recién desenquistadas mediante microscopia electrónica de barrido (MEB).

VI. MATERIALES Y MÉTODO

Localización del área de estudio

- ❖ La colecta del material vegetal de *Vernonanthura patens* se realizó en el municipio de Amixtlán en la Sierra Norte de Puebla. El secado de la planta se llevó a cabo a la sombra en el mismo municipio.
- ❖ La identificación taxonómica de la planta se realizó en las instalaciones del Herbario Nacional, ubicado en el Instituto de Biología de la UNAM.
- ❖ La obtención del extracto se realizó en el laboratorio de fitoquímica de la Unidad de Biotecnología y Prototipos (UBIPRO), de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala-UNAM, Tlalnepantla, Estado de México.
- ❖ Las pruebas de toxicidad se llevaron a cabo dentro de las instalaciones del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala-UNAM.
- ❖ Los ensayos *in vitro* para la obtención de los especímenes para microscopía electrónica de barrido se llevaron a cabo en el laboratorio de Quimioterapia Experimental de Helmintos, del Depto. de Parasitología de la FMVZ-UNAM, Ciudad de México.
- ❖ Los estudios de microscopía electrónica de barrido (MEB), se llevaron a cabo en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO), ubicado en el Instituto de Biología de la UNAM.

Colecta del material vegetal

Se colectaron 5 kilogramos de la planta las cuales fueron secadas a temperatura ambiente por 15 días de acuerdo a la metodología descrita por Monroy et al. 2007. posteriormente las hojas fueron molidas y almacenadas en recipientes de plástico para ser transportadas.

Preparación del extracto

Para la obtención del extracto se usaron las hojas de la planta, utilizando metanol como solvente orgánico, en una proporción de 100 gramos de hoja seca por 500 mL. de solvente, dejando macerar durante 7 días. Pasando este periodo se realizó la destilación del solvente cada semana durante 6 meses, utilizando un rotoevaporador Heidolph a baja presión. El extracto fue almacenado en un envase de vidrio a una temperatura de 4°C, hasta la evaluación *in vivo* (Harnborne, 1970).

Determinación de la toxicidad aguda

La determinación de la toxicidad aguda se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Kabbaoui et al., 2017 y Maimaiti et al., 2021. Se utilizaron 100 ratones CD-1 (50 machos y 50 hembras) de 8 semanas de edad, de 30 gramos de peso. Se formaron 10 grupos con 10 ratones cada uno. Grupo 1 control negativo (sin Tx); Grupo 2 control positivo con H₂O; los Grupos 3, 4, y 5 se evaluaron a las dosis de 1250, 2500, y 5000 mg/Kg de peso vivo con el extracto de *V. patens* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Diseño experimental de la toxicidad aguda en ratones CD-1.			
	Grupos (n=10)	Tratamiento	Dosis
HEMBRAS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo	Agua
	3	<i>Vernonanthura patens</i>	1250 mg/Kg
	4		2500 mg/Kg
	5		5000 mg/ Kg
MACHOS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo*	Agua
	3	<i>Vernonanthura patens</i>	1250 mg/ Kg
	4		2500 mg/ Kg
	5		5000 mg/ Kg

Para llevar a cabo la administración del extracto de *V. patens* se preparó una solución madre (5000 mg/Kg), reconstituida con H₂O (agua), posteriormente se realizaron las diluciones correspondientes (1250 y 2500 mg/Kg), a todos los grupos se les administró una sola dosis vía oral con ayuda de una cánula esofágica del número 12. Las inspecciones se realizaron cada 24 horas hasta cumplir 14 días (Wang et al., 2014 y Shin et al., 2019). Los animales fueron monitoreados durante una hora post-administración para determinar cualquier síntoma o comportamiento extraño. También se determinó el peso corporal al inicio y al final del experimento. El manejo y cuidado de los ratones dentro del bioterio, se llevaron a cabo de acuerdo a la directriz 420 y 425 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD/OCDE), y la NOM-062-ZOO.

Determinación de la toxicidad sub crónica

Se utilizaron 120 ratones CD-1 (60 machos y 60 hembras) de 8 semanas de edad entre los 25 y 30 gramos. Se formaron 10 grupos con 10 ratones cada uno. Grupo 1 control negativo (sin Tx); Grupo 2 control positivo con H₂O; los Grupos 3, 4, 5 y 6; se evaluaron a las dosis de 125, 250, 375 y 500 mg/Kg de peso vivo con el extracto de *V. patens*. (Cuadro 3).

Cuadro 3. Diseño experimental de la toxicidad sub crónica en ratones CD-1.			
	Grupos (n=10)	Tratamiento	Dosis
HEMBRAS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo	Agua
	3	<i>Vernonanthura patens</i>	125 mg/Kg
	4		250 mg/Kg
	5		375 mg/Kg
	6		500 mg/ Kg
MACHOS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo	Agua
	3	<i>Vernonanthura patens</i>	125 mg/ Kg
	4		250 mg/ Kg
	5		375mg/ Kg
	6		500 mg/ Kg

Se realizó una solución madre del extracto a la concentración de 500 mg/Kg, reconstituida con H₂O (agua), después se realizaron las diluciones correspondientes (125, 250 y 375 mg/Kg), a todos los grupos se les administró cada semana una sola dosis vía oral con ayuda de una cánula esofágica del número 12, hasta cumplir un máximo de 6 administraciones. Las observaciones fueron llevadas a cabo cada 24 horas hasta cumplir 42 días, se registró cualquier síntoma o comportamiento extraño. También se determinó el peso corporal al inicio y al final del experimento. El ensayo se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Akindede et al., 2014; Pavan et al., 2018; Feistel et al., 2018; Hyun et al., 2021 y Sundaram et al., 2021. Los Animales se mantuvieron en el Bioterio de la FES-Iztacala-UNAM. Al finalizar el experimento se realizó la eutanasia de los ratones de acuerdo con lo establecido en norma NOM-062-ZOO y bajo los estándares de la directriz 408 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OECD/OCDE), posteriormente los cadáveres de estos fueron refrigerados y transportados al departamento de patología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para realizar los estudios de necropsia e histopatología para determinar si existía algún daño en los órganos internos.

Determinación de los índices de toxicidad y genotoxicidad en ratones mediante la prueba de micronúcleos

Se utilizaron 20 ratones (10 machos y 10 hembras) de 8 semanas de edad, entre los 25 y 30 gramos. Grupo 1 control negativo (sin Tx); Grupo 2 control positivo con Ifosfamida aplicada una sola vez intraperitonealmente los Grupos 3, 4, y 5; se evaluaron a las concentraciones de 125, 375, y 500 mg/L con el extracto de *V. patens* respectivamente (Cuadro 4).

Cuadro 4. Diseño experimental de la toxicidad y genotoxicidad en ratones CD-1.			
	Grupos (n=10)	Tratamiento	Dosis
HEMBRAS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo*	60 mg/Kg
	3	<i>Vernonanthura patens</i>	125 mg/L
	4		250 mg/L
	5		500 mg/ L
MACHOS	1	Control negativo	Sin tratamiento
	2	Control positivo*	60 mg/Kg
	3	<i>Vernonanthura patens</i>	125 mg/ L
	4		250 mg/L
	5		500 mg/ L

*Ifosfamida

Para la administración del extracto, se hizo una solución madre a la concentración de 500 mg/ Kg, para llevar a cabo las diluciones correspondientes (125, 250 y 375 mg/Kg), Cada uno de los tratamientos fue administrado cada 24 horas hasta cumplir un máximo de tres dosis. Se tomaron muestras de la sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48, 72, y 96 horas post-tratamiento para obtener un total de 3 frotis por cada ratón, posteriormente fueron teñidos con hematoxilina/eosina durante 10 minutos para poder efectuar el conteo celular. Las evaluaciones se realizaron mediante la identificación de eritrocitos policromaticos

(EPC), eritrocitos normocromáticos (ENC) y micronúcleos (MN) se contabilizaron un total de 2000 células por cada ratón por día. Los porcentajes de toxicidad se obtuvieron de las siguientes fórmulas:

(%) Toxicidad = No. de células policromáticas / No. de células normocromáticas x 100

(%) Genotoxicidad = No. de micronúcleos en células policromáticas / 2000 (Células totales) x 100

Los ensayos se realizaron de acuerdo con lo descrito por Dos Santos et al. 2021 y por la directriz 473 y 487 de la OECD/OCDE.

Para analizar los resultados, se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una prueba de Dunnett y una prueba de Kruskal-Wallis con un intervalo de confianza del 95%, para determinar si existían diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos (Systat Software V12 2008).

Determinación por microscopía electrónica de barrido el modo de acción del extracto de *Vernonanthura patens* contra *Fasciola hepatica*

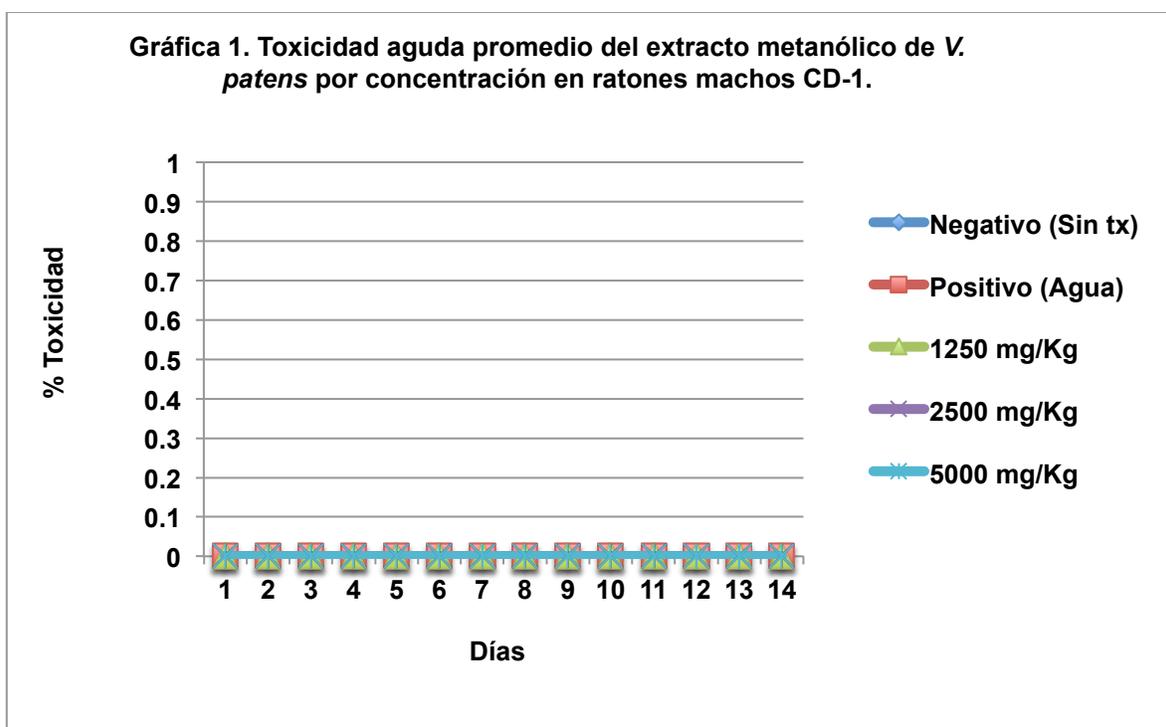
Para elucidar los daños estructurales del extracto metanólico de *V. patens* se utilizaron fasciolas desenquistadas artificialmente, de acuerdo a la técnica descrita por Ibarra y Jenkins en 1984. Para ello se recuperaron 150 fasciolas tratadas con el extracto a las concentraciones de 125, 250, 375 y 500 mg/L, con su respectivo grupo testigo sin tratamiento (30 por cada concentración). Se llevaron a cabo lavados con solución salina fisiológica al 9% (SSF) y fijados en formol al 2% durante 24 horas, posteriormente se realizó otro lavado con SSF y deshidratadas en series ascendentes de etanol hasta etanol al 96 % 100%? y mantenidas a 4°C durante 24 horas. Posteriormente, los especímenes fueron secados a su punto crítico con dióxido de carbono seco (CO₂). Una vez secos, los parásitos fueron fijados en tiras adhesivas de carbón y colocadas en una base 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 10-15kw, ubicado en el Laboratorio Nacional de Biodiversidad (LANABIO), dentro de las instalaciones del Instituto de Biología de la UNAM.

VII. RESULTADOS

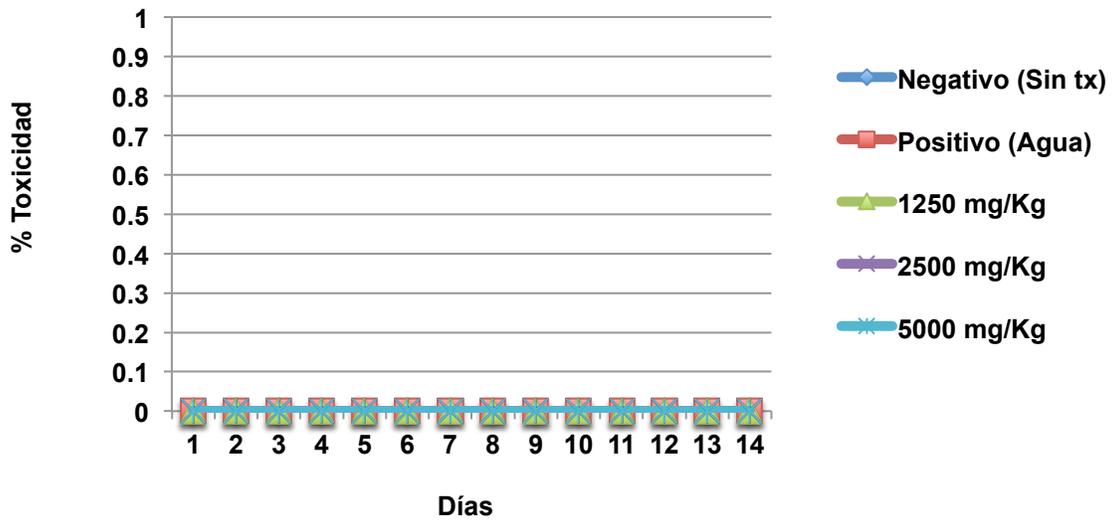
Con respecto al rendimiento obtenido del material vegetal colectado (5 kg), se obtuvo un total de 1.326 Kg de materia seca, del cual obtuvimos 250 gramos de extracto metanólico.

Los resultados obtenidos, en la prueba de toxicidad aguda demostraron que las dosis de 1250, 2500 y 5000 mg/Kg no presentaron indicios de toxicidad durante los 14 días del estudio, en comparación grupo testigo negativo ($P < 0.05$). La información obtenida indica que el extracto es seguro a dosis de hasta 5000 mg/Kg (Gráfica 1 y 2).

Con relación a las observaciones generales de los ratones, no se observaron cambios en cola, ojos, genitales, heces, orina, reflejo de agarre, reflejo de escape, alopecia, ataxia, convulsiones, disnea, lesiones, frecuencia cardiaca y temblores. Con relación al peso corporal se obtuvieron ganancias para las hembras de 2.86 y para los machos de 5.04 grs. El efecto de la toxicidad aguda del extracto metanólico de *V. patens* fue determinado por la directriz 420 y 425 de la OECD, en la cual la máxima dosis permitida es de 5000 mg/kg. Por lo cual se concluye que el extracto metanólico de *V. patens* no mostró toxicidad aguda a las concentraciones evaluadas en ratones CD1.

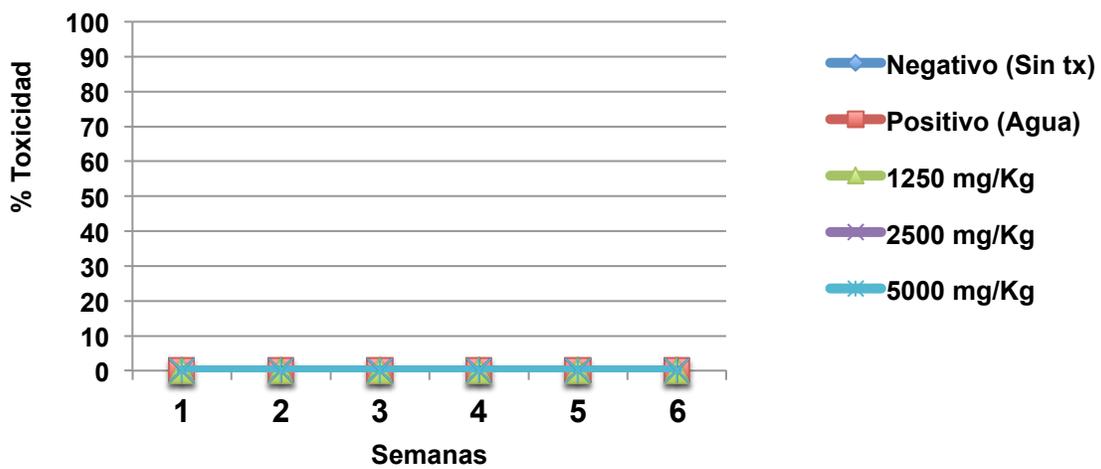


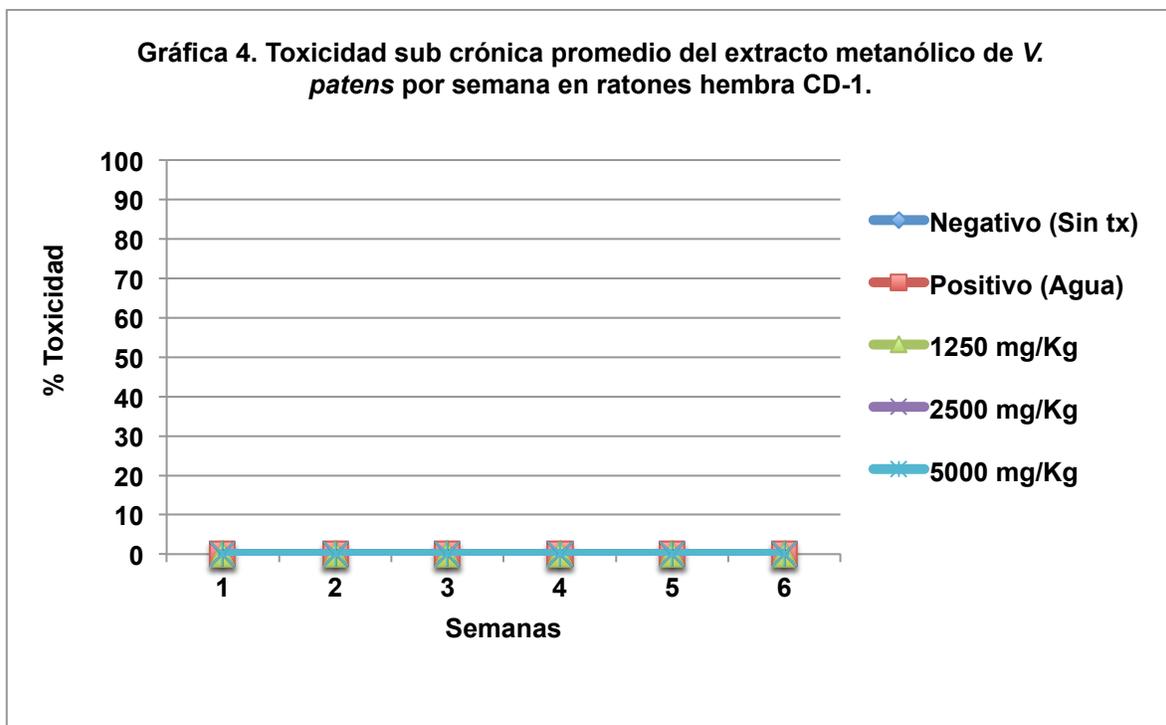
Gráfica 2. Toxicidad aguda promedio del extracto metanólico de *V. patens* por concentración en ratones hembra CD-1.



Los resultados de toxicidad sub crónica demostraron que el extracto de *V. patens*, no presentó ningún efecto tóxico a las dosis de 125, 250, 375 y 500 mg/Kg con respecto al grupo testigo (Gráfica 3 y 4).

Gráfica 3. Toxicidad sub crónica promedio del extracto metanólico de *V. patens* por semana en ratones macho CD-1.





Con respecto a los resultados obtenidos de los estudios enviados a patología de los experimentos subcrónicos, mostró que los ratones macho presentaban un buen estado de conservación y una buena condición corporal. La descripción microscópica (histología) demostró que los órganos no presentaron cambios patológicos aparentes que indique algún signo de toxicidad sub crónico por parte de los tratamientos (125, 250, 375 y 500 mg/Kg) con el extracto de *V. patens* en comparación con el grupo testigo sin tratamiento. Las lesiones observadas fueron leves en el riñón y el hígado, por lo que no se consideran relevantes en ausencia de signos clínicos asociados, dado que en todos los tratamientos presentaron lesiones similares y no hubo predominio de ellas, lo cual nos indica que su desarrollo no se encuentra asociado a ninguno de los tratamientos (Fig. 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10).

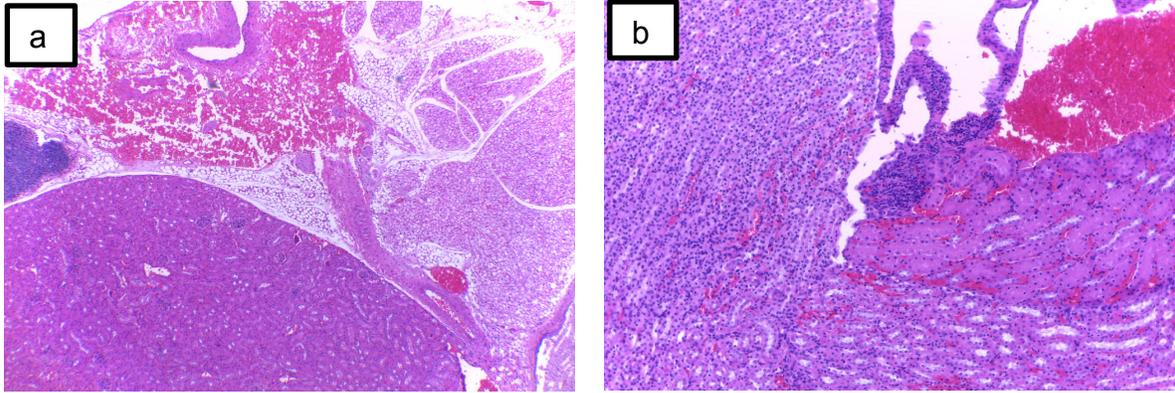


Fig. 3. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Riñón sano del grupo testigo sin tratamiento, no se aprecian cambios relevantes (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 10x); b) Riñón tratado con la dosis de 125 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión), se observó escasos infiltrados linfoplasmocítico adyacente a la pelvícula renal con distribución multifocal (nefritis intersticial).

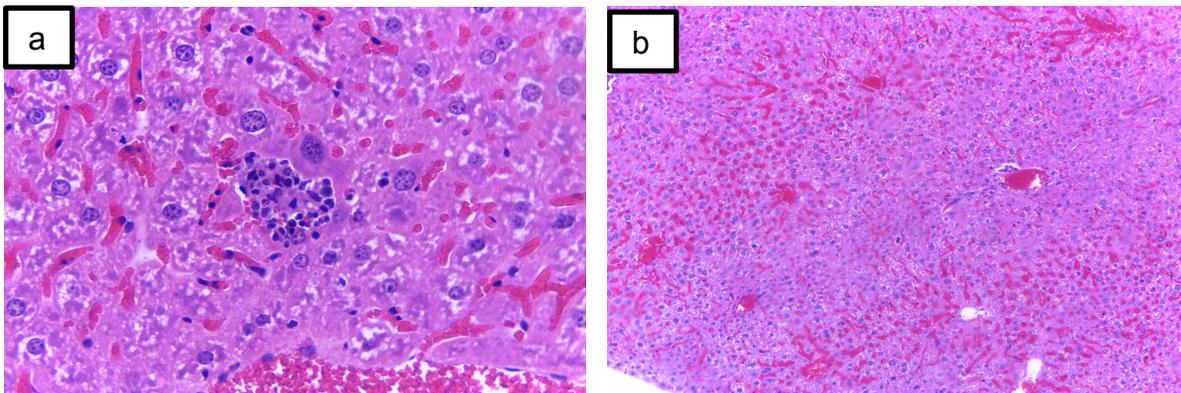


Fig. 4. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofilico; b) Hígado tratado con la dosis de 125 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión).

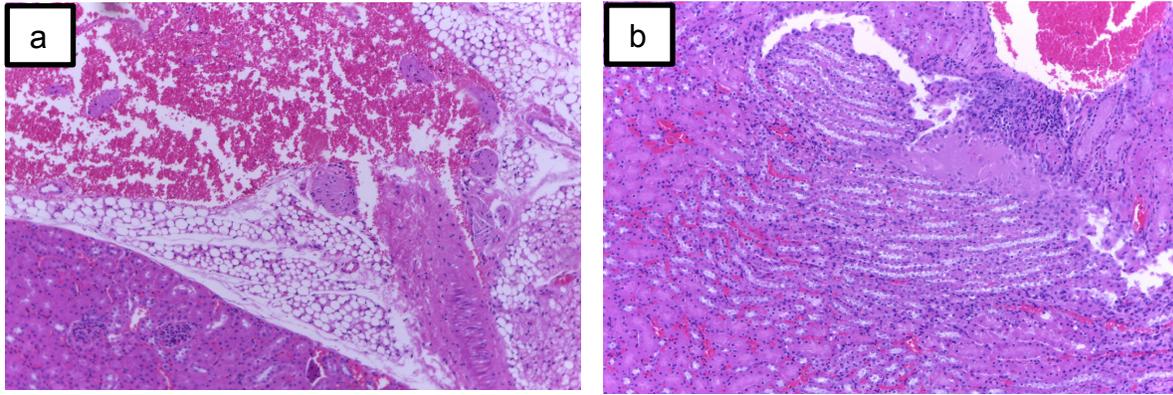


Fig. 5. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Riñón sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión) ; b) Riñón tratado con la dosis de 250 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Se observó de manera focal escaso infiltrado linfocítico adyacente a la pelvícula renal (nefritis intersticial).

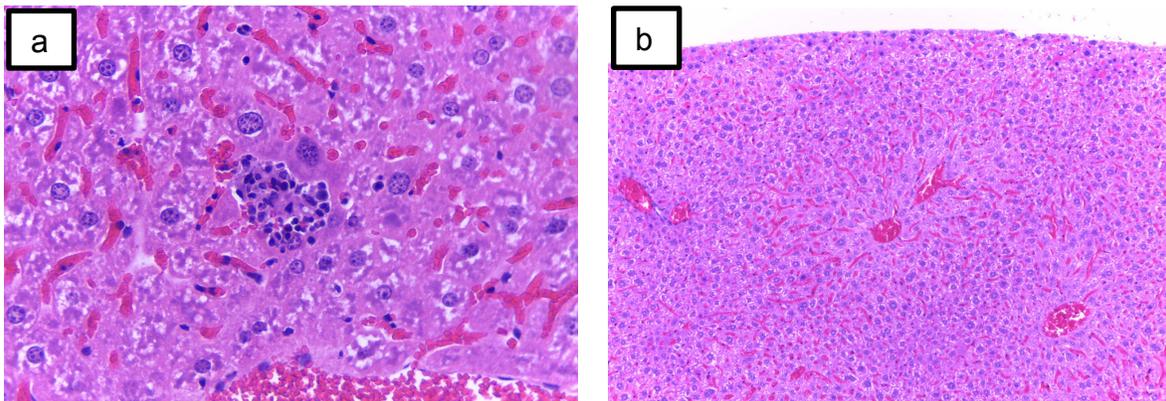


Fig. 6. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofilico; b) Hígado tratado con la dosis de 250 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión).

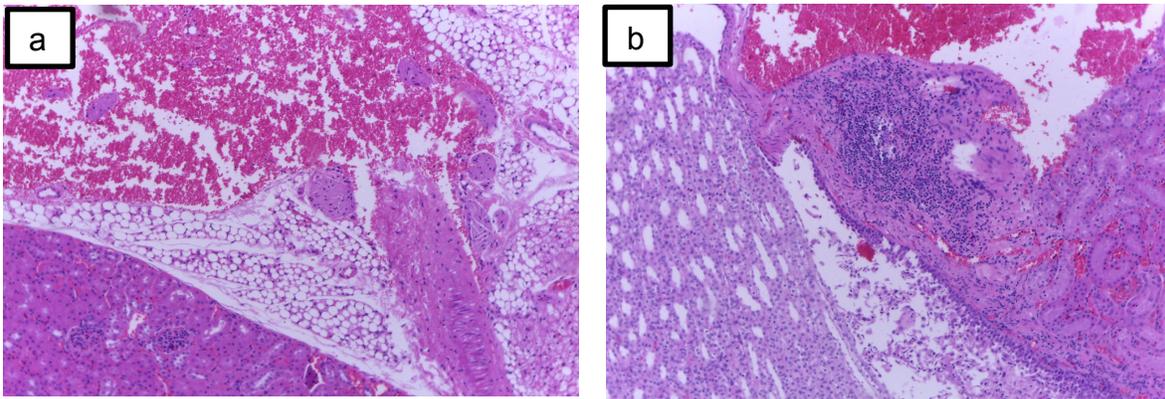


Fig. 7. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Riñón sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión); b) Riñón tratado con la dosis de 375 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Se observó de manera focal escaso infiltrado linfocítico adyacente a la pelvícula renal (nefritis intersticial).

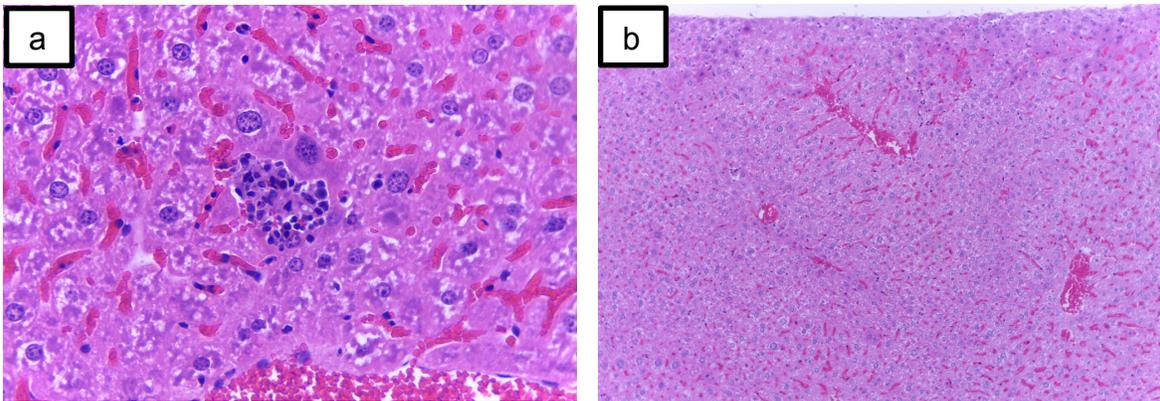


Fig. 8. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40x) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofílico; b) Hígado tratado con la dosis de 375 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10x). Los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión).

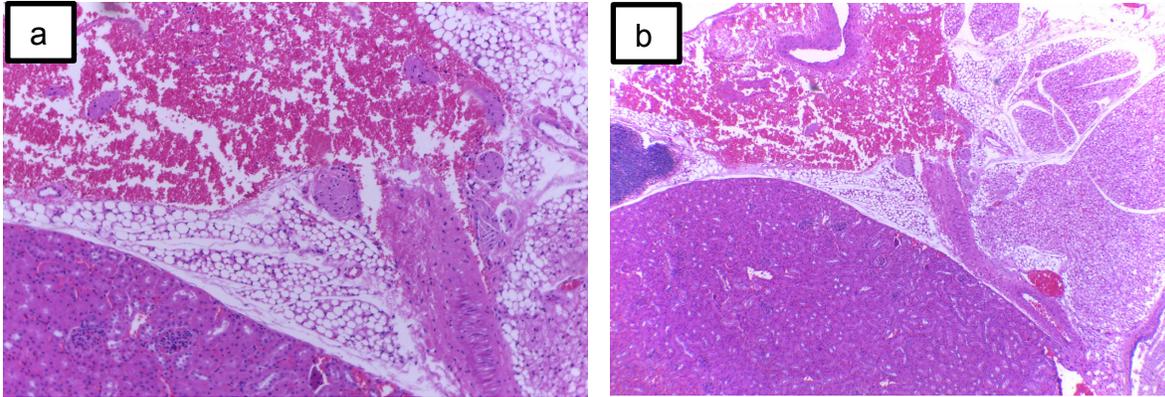


Fig. 9. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Riñón sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión); b) Riñón tratado con la dosis de 500 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Se observó de manera focal escaso infiltrado linfocítico adyacente a la pelvícula renal (nefritis intersticial).

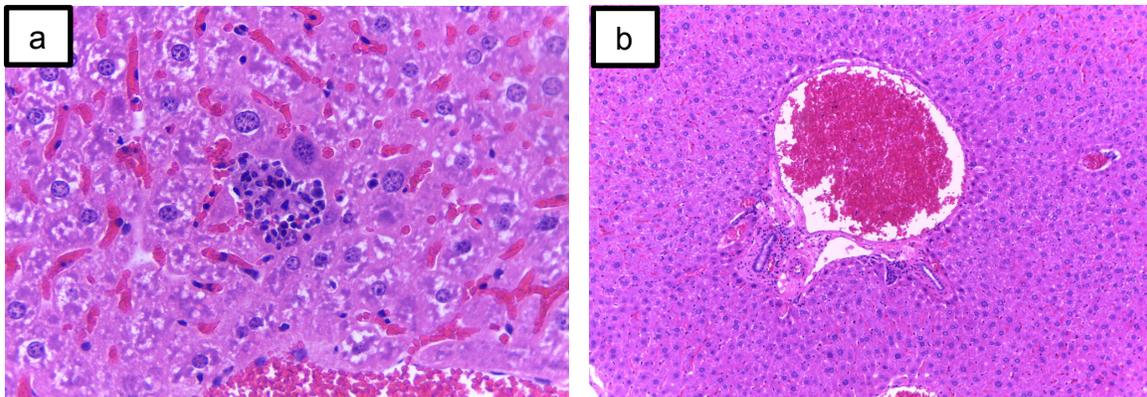


Fig. 10. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofilico; b) Hígado tratado con la dosis de 500 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina, aumento 10x). Se aprecia un foco de infiltrado linfoplasmocítico y neutrofilico periportal.

Con respecto a la descripción macroscópica post mortem de los ratones hembra se evidenció un buen estado de conservación y una buena condición corporal. La descripción microscópica (histología) demostró que los órganos de los ratones (hembra) no presentaron cambios patológicos aparentes que indique algún signo de toxicidad por parte de los tratamientos (125, 250, 375 y 500 mg/Kg) con el extracto de *V. patens* en comparación con el grupo testigo sin tratamiento, las lesiones observadas fueron leves, por lo que no se consideran relevantes en ausencia de signos clínicos asociados, dado que en todos los tratamientos presentaron lesiones similares y no hubo predominio de ellas, lo cual nos indica que su desarrollo no se encuentra asociado a ninguno de los tratamientos (Fig. 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 y 18).

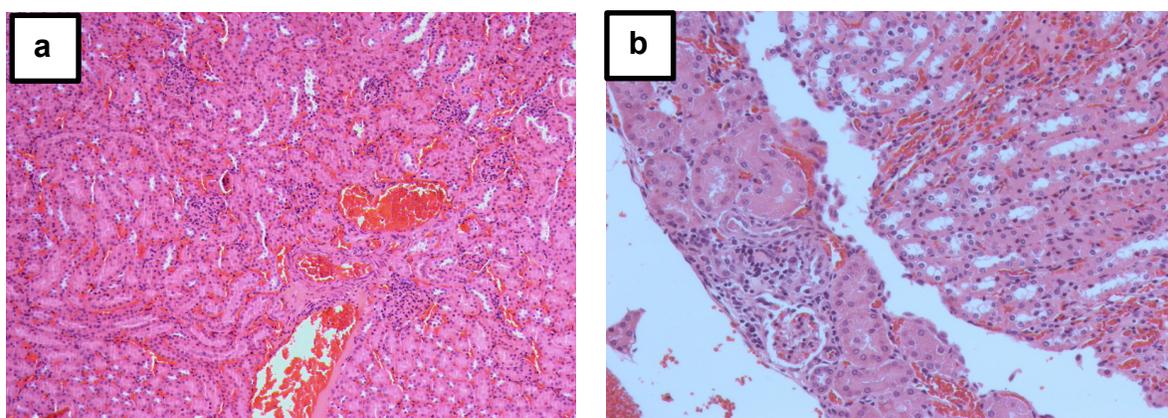


Fig. 11. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Riñón sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión) también se observó un foco de escaso infiltrado linfocítico y neutrofilico (nefritis intersticial); b) Riñón tratado con la dosis de 125 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Se observó escaso infiltrado linfoplasmocítico adyacente a un vaso sanguíneo (nefritis intersticial).

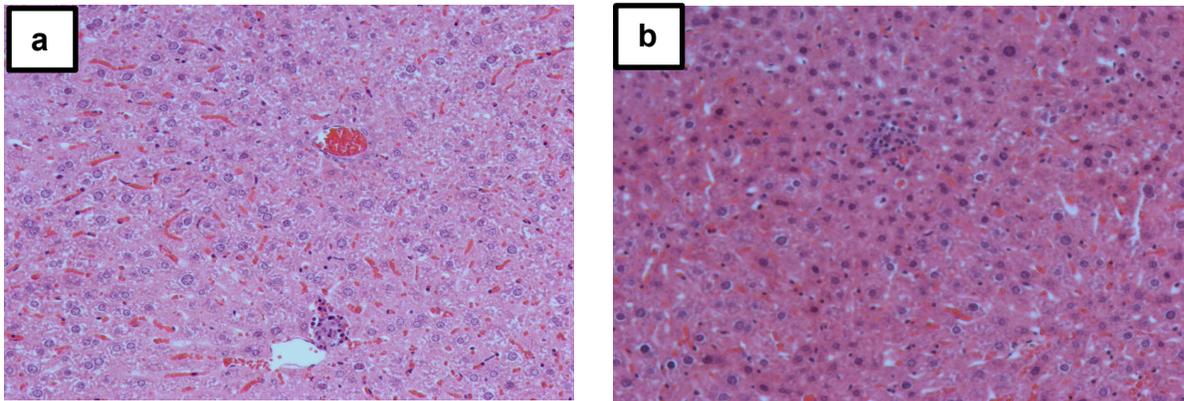


Fig. 12. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofílico; b) hígado tratado con la dosis de 125 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X). Se observan múltiples focos de inflamación compuesta por escasos neutrófilos e histiocitos.

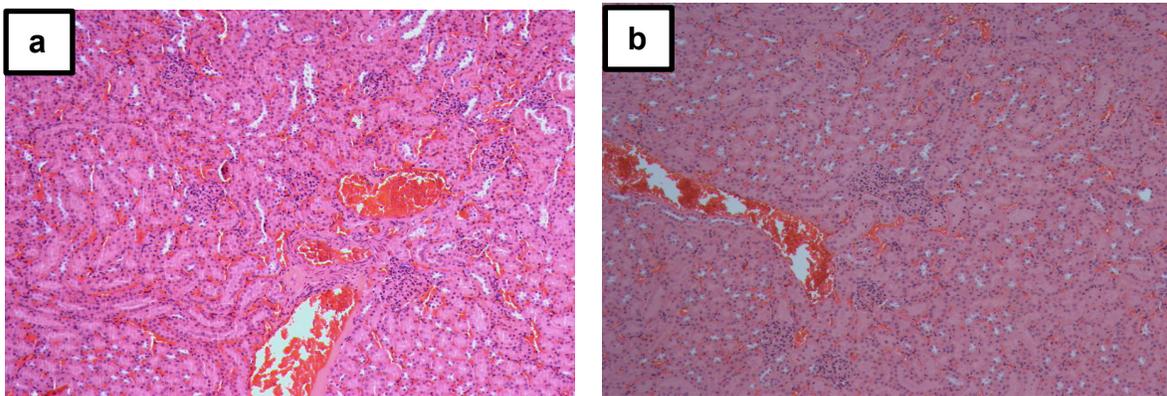


Fig. 13. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) riñón sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión) también se observó un foco de escaso infiltrado linfocítico y neutrofílico (nefritis intersticial); b) riñón tratado con la dosis de 250 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Se observó de manera focal escaso infiltrado linfocítico adyacente a la pelvícula(nefritis intersticial).

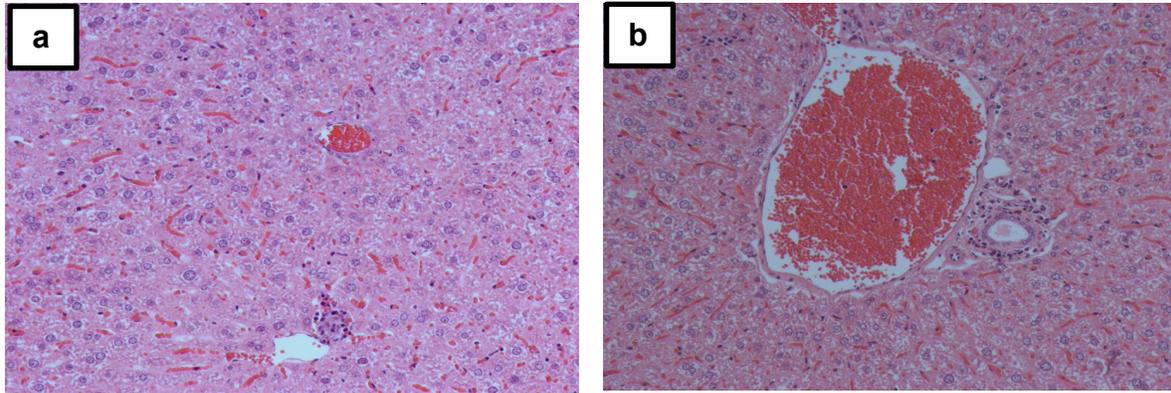


Fig. 14. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofilico; b) Hígado tratado con la dosis de 250 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X). Se observa un infiltrado linfoplasmocítico periportal.

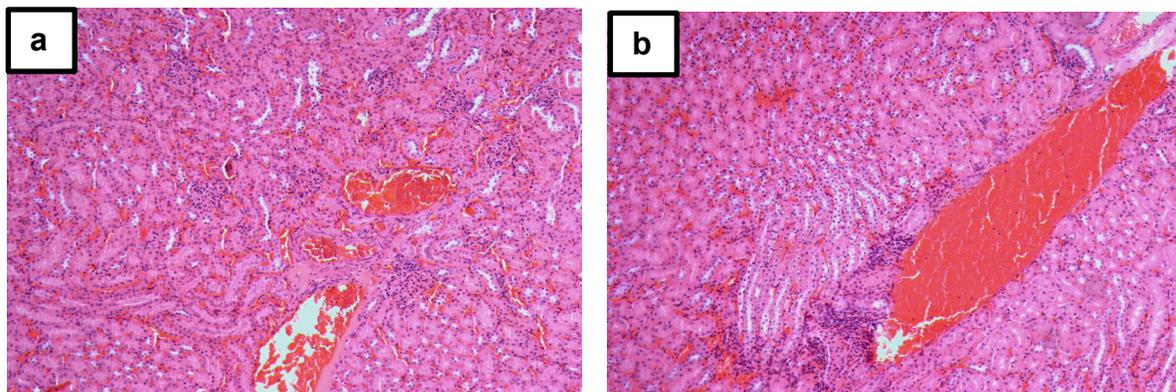


Fig. 15. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Riñón sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión) también se observó un foco de escaso infiltrado linfocítico y neutrofilico (nefritis intersticial); b) Riñón tratado con la dosis de 350 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Se aprecia un escaso infiltrado linfocítico multifocal.

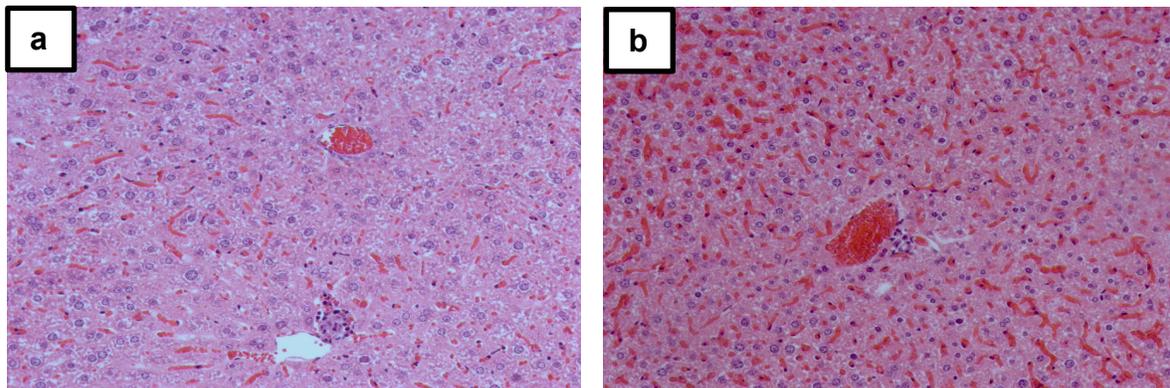


Fig. 16. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofilico; b) Hígado tratado con la dosis de 350 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 40X). Se observa un foco de infiltrado neutrofilico, linfocítico e histiocítico.

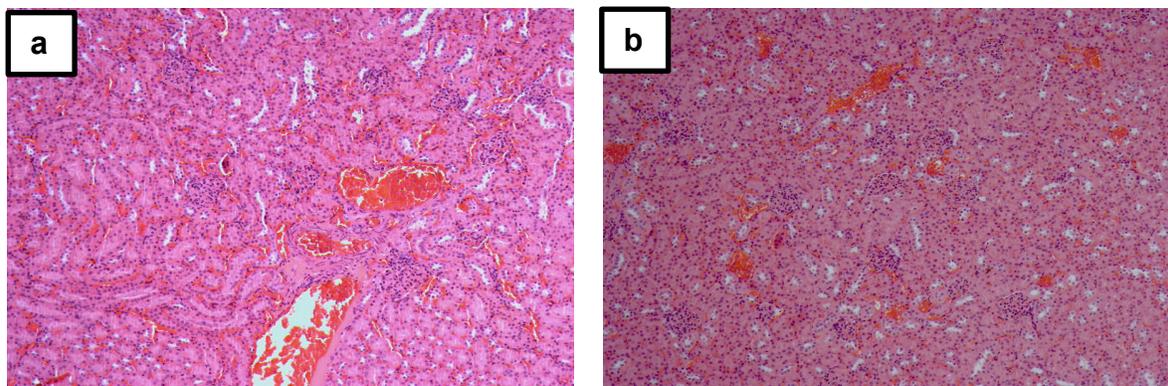


Fig. 17. Histopatología del riñón de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Riñón sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los vasos sanguíneos se encuentran dilatados por ligera cantidad de eritrocitos (congestión) también se observó un foco de escaso infiltrado linfocítico y neutrofilico (nefritis intersticial); b) Riñón tratado con la dosis de 500 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Presenta un escaso infiltrado linfoplasmocítico multifocal (nefritis intersticial).

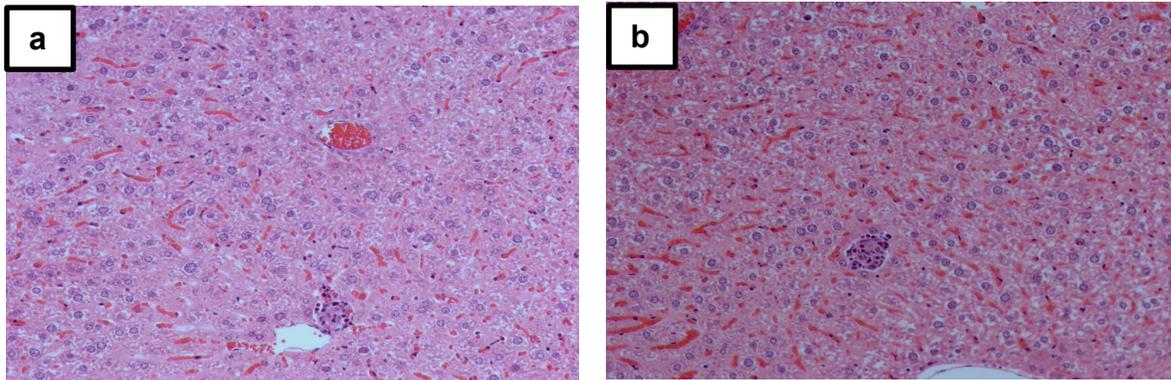
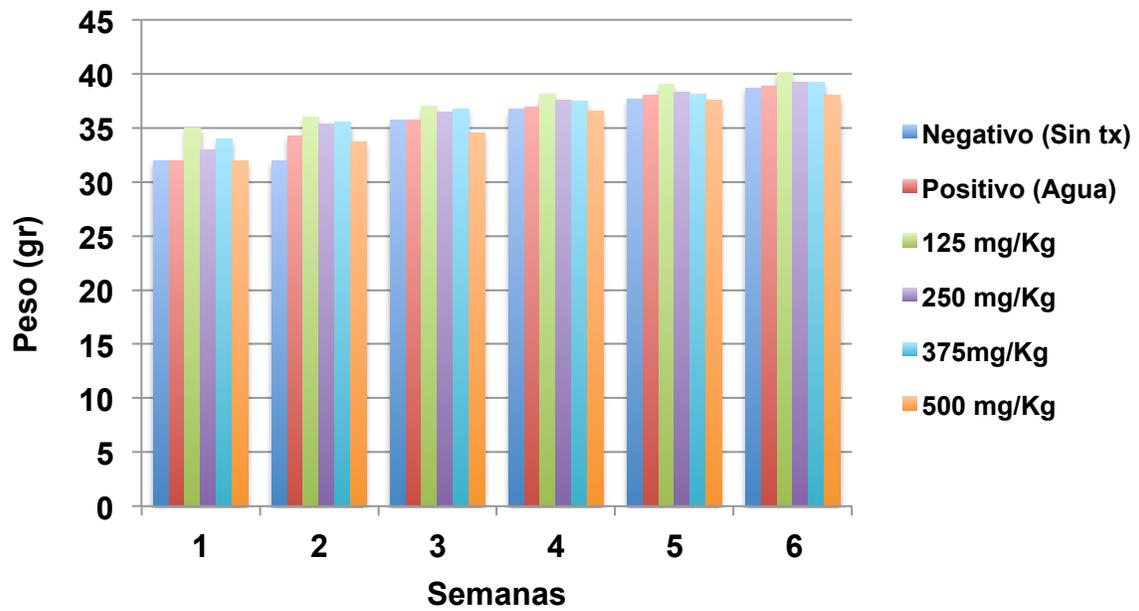


Fig. 18. Histopatología del hígado de la prueba de toxicidad subcrónica. a) Hígado sano del grupo testigo, sin tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X) los sinusoides hepáticos se observan distendidos por escasa cantidad de eritrocitos (congestión) además de un infiltrado linfoplasmocítico y neutrofilico; b) Hígado tratado con la dosis de 500 mg/Kg a los 42 días post-tratamiento (Tinción hematoxilina-eosina 10X). Se aprecian múltiples focos de infiltrado linfocítico y neutrofilico periportal.

Cuadro 5. Promedio de la ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en machos CD-1.						
Semana	Grupos					
	Testigo negativo (Sin tx)	Testigo positivo (Agua)	125 mg/Kg	250 mg/Kg	375 mg/Kg	500 mg/Kg
1	32 ±0.45^a	32 ±0.44^a	35 ±0.55^a	33 ±0.53^a	34 ±0.50^a	32 ±0.49^a
2	34.2 ±0.44^a	34.3 ±0.47^a	36 ±0.47^a	35.4 ±0.50^a	35.5 ±0.46^a	33.7 ±0.45^a
3	35.7 ±0.44^a	35.7 ±0.53^a	37 ±0.45^a	36.5 ±0.43^a	36.7 ±0.48^a	34.5 ±0.50^a
4	36.7 ±0.49^a	36.9 ±0.55^a	38.1 ±0.^a	37.6 ±0.56^a	37.5 ±0.64^a	36.6 ±0.70^a
5	37.7 ±0.72^a	38 ±0.45^a	39 ±0.50^a	38.3 ±0.55^a	38.1 ±0.45^a	37.6 ±0.44^a
6	38.7 ±0.43^a	38.9 ±0.40^a	40.1 ±0.51^a	39.5 ±0.41^a	39.2 ±0.62^a	38 ±0.60^a

Se presentan los valores promedio del porcentaje total de la ganancia de peso ± la desviación estándar. Literales iguales no indican diferencias ($P > 0.05$); literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Gráfica 5. Ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en machos CD-1.

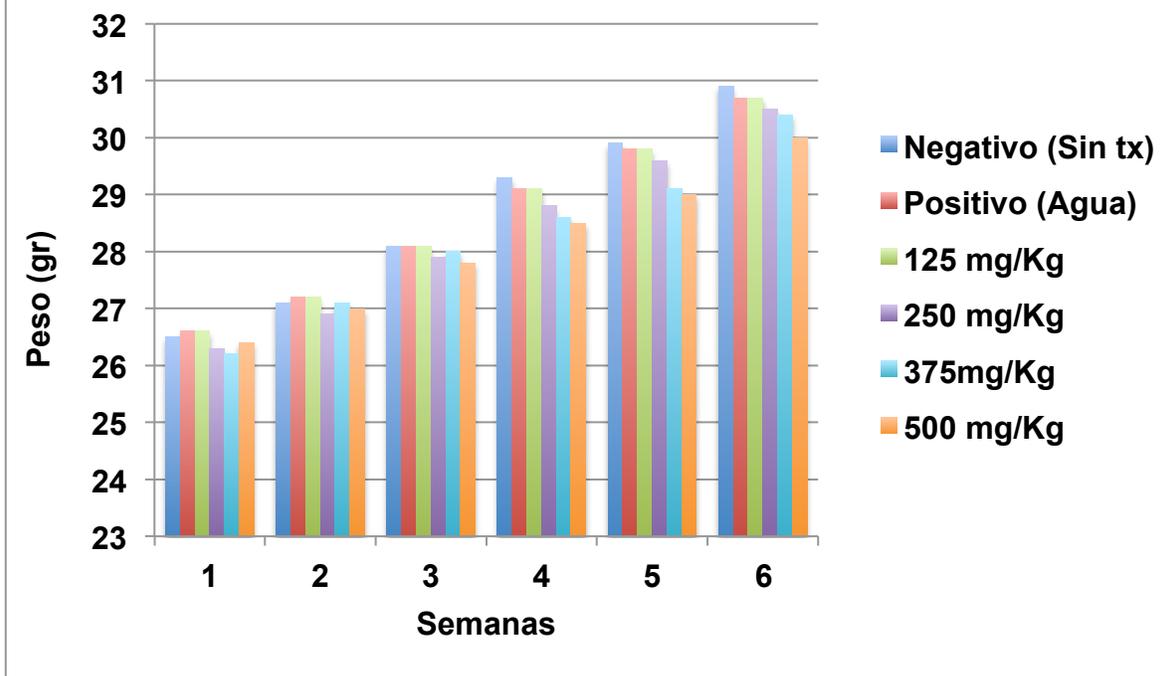


En los pesos promedio de los ratones hembra, no se encontró evidencia estadística suficiente para determinar diferencias entre las dosis de 125, 250, 375 y 500 mg/Kg ($P > 0.05$). Esto nos indica que el extracto no causo daño en ningún órgano, dado que al momento del sacrificio los ratones presentaban una buena condición corporal.

Cuadro 6. Promedio de la ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en hembra CD-1.					
Semana	Grupos				
	Testigo negativo (Sin tx)	Testigo positivo (Agua)	125 mg/Kg	250 mg/Kg	375 mg/Kg
1	26.5 ±0.41^a	26.6 ±0.65^a	26.3 ±0.45^a	26.2 ±0.39^a	26.4 ±0.41^a
2	27.1 ±0.55^a	27.2 ±0.40^a	26.9 ±0.55^a	27.1 ±0.60^a	27 ±0.52^a
3	28.1 ±0.53^a	28.1 ±0.45^a	27.9 ±0.50^a	28 ±0.45^a	27.8 ±0.60^a
4	29.3 ±0.40^a	29.1 ±0.46^a	28.8 ±0.65^a	28.6 ±0.57^a	28.5 ±0.40^a
5	29.9 ±0.51^a	29.8 ±0.49^a	29.6 ±0.45^a	29.1 ±0.43^a	29 ±0.44^a
6	30.9 ±0.50^a	30.7 ±0.57^a	30.5 ±0.55^a	30.4 ±0.49^a	30 ±0.40^a

Se presentan los valores promedio del porcentaje total de la ganancia de peso \pm la desviación estándar. Literales iguales no indican diferencias ($P > 0.05$); literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Gráfica 6. Ganancia de peso por semana durante la prueba de toxicidad sub crónica en hembras CD-1.

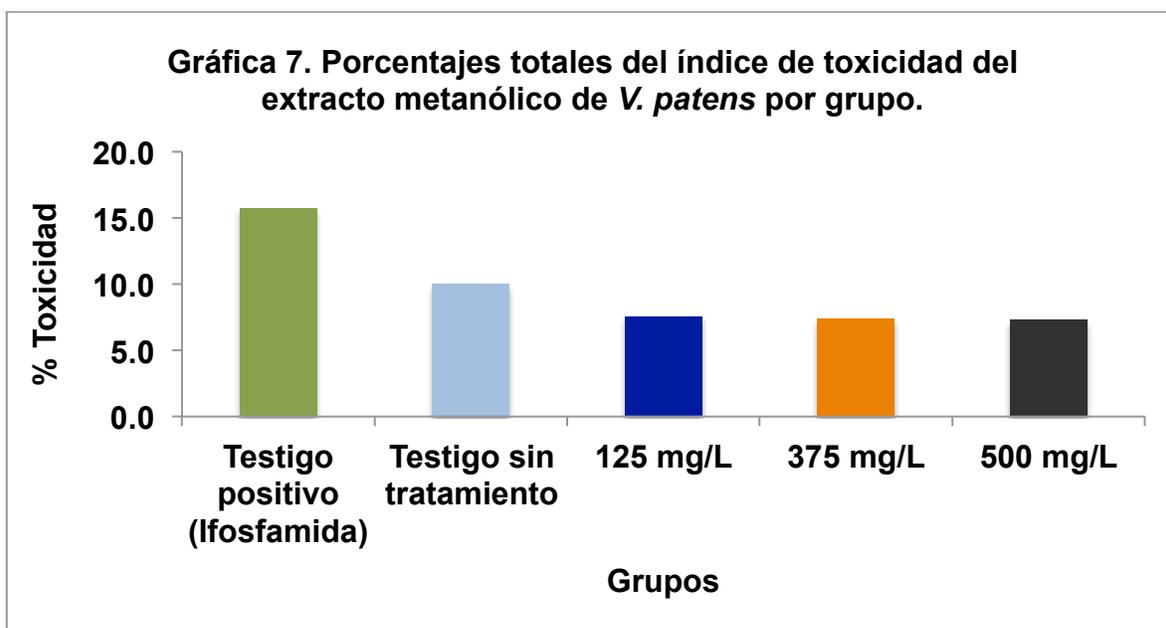


Al analizar los datos de la prueba de micronúcleos para determinar el posible efecto en el daño cromosómico tras la administración del extracto de *V. patens*, se identificaron diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo positivo (Ifosfamida) y el resto de los tratamientos ($P < 0.05$). El testigo positivo registro los valores más elevados, mientras que el efecto de los tratamientos de 125, 375 y 500 mg/L fueron similares entre ellos no encontrando diferencias estadísticamente significativas ($P > 0.05$) (Cuadro 7 y Gráfica 7).

Cuadro 7. Porcentajes totales del índice de toxicidad del extracto metanólico de *V. patens* por grupo y horas de análisis.

Horas	GRUPOS (%)				
	CONTROL		<i>V. patens</i> (mg/L)		
	Negativo Sin Tx.	Positivo Ifosfamida 60mg/kg	125	375	500
0	12.86±0.41 ^a	12.53±35 ^a	8.43±45 ^a	7.29±35 ^a	7.05±38 ^a
24	8.48±0.34 ^a	16.43±42 ^b	7.65±30 ^a	8.15±33 ^a	7.51±34 ^a
48	9.84±30 ^a	17.55±45 ^b	7.09±36 ^a	7.3±41 ^a	7.96±39 ^a
72	8.95±41 ^a	16.33±45 ^b	7.15±39 ^a	6.83±45 ^a	6.64±42 ^a
96	10.32±42 ^a	16.87±39 ^b	7.41±40 ^a	7.09±42 ^a	6.4±44 ^a

Se presentan los valores promedio del porcentaje total de toxicidad \pm la desviación estándar. Literales iguales no indican diferencias ($P > 0.05$); literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).



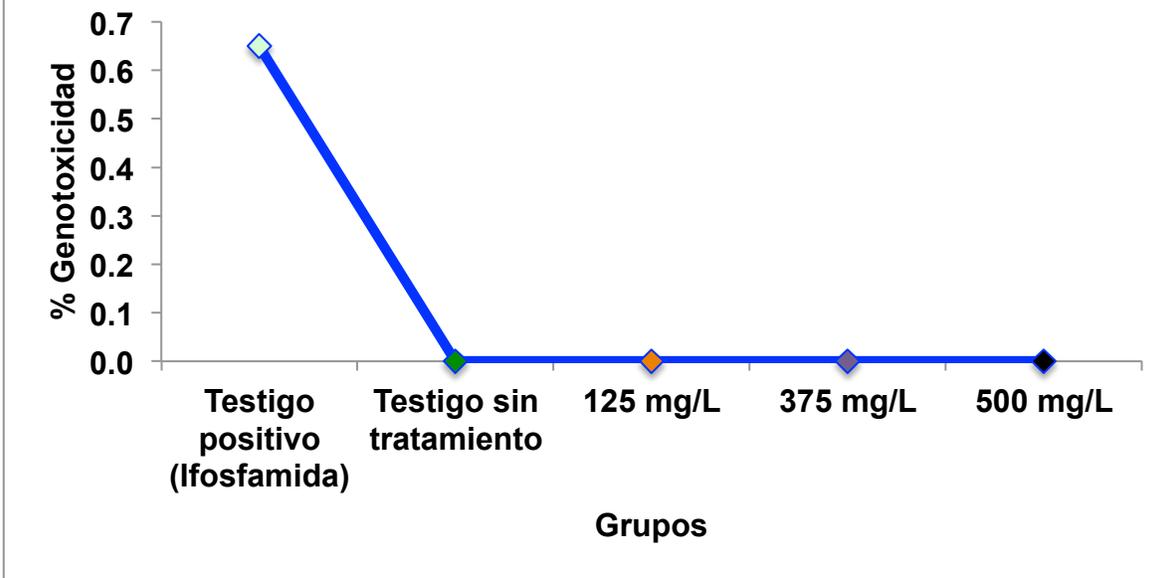
Al analizar los datos de la prueba de micronúcleos, se encontraron diferencias entre los porcentajes de genotoxicidad del testigo positivo (Ifosfamida) y las concentraciones evaluadas con el extracto de *V. patens* 125, 250 y 500 mg/L. ($P < 0.05$) (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentaje total de genotoxicidad del extracto metanólico de *V. patens*.

Horas	GRUPOS (%)				
	CONTROL		<i>V. patens</i> (mg/L)		
	Negativo Sin Tx.	Positivo Ifosfamida 60mg/kg	125	375	500
0	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a	0 ^a
24	0 ^a	0.97 \pm .2 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
48	0 ^a	0.73 \pm 1 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
72	0 ^a	0.75 \pm 1 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a
96	0 ^a	0.8 \pm 2 ^b	0 ^a	0 ^a	0 ^a

Se presentan los valores promedio del porcentaje total de micronúcleos \pm la desviación estándar. Literales iguales no indican diferencias ($P > 0.05$); literales diferentes indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Gráfica 8. Porcentajes total de micronúcleos del extracto metanólico de *V. patens* por grupo.



Los resultados de microscopía electrónica de barrido (MEB) del extracto de *V. patens* contra *F. hepatica* nos demuestra, que el extracto actúa sobre el tegumento del parásito, en comparación con el grupo testigo sin tratamiento (Fig. 19 y 20), donde se aprecian en la vista ventral estructuras anatómicas importantes como las espinas (E), la ventosa oral (VO), la ventosa ventral (VV) y el poro excretor (PE). Comparando esta información con la concentración de 125 mg/L a las 24 horas post-tratamiento, se logra apreciar la presencia de ampollas (A) (Fig. 21 y 22). Lo cual nos indica que el extracto está causando daños sobre el parásito.

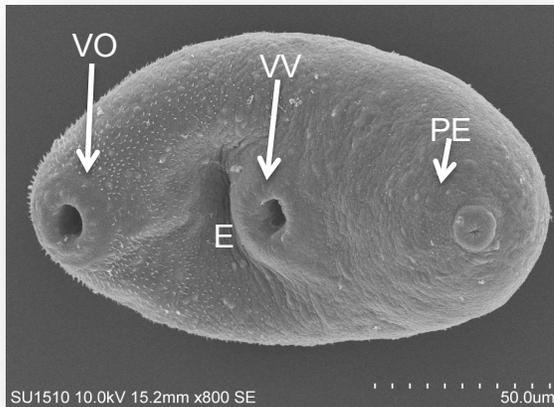


Fig. 19. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa oral (VO), la ventosa ventral (VV) y el poro excretor (PE).

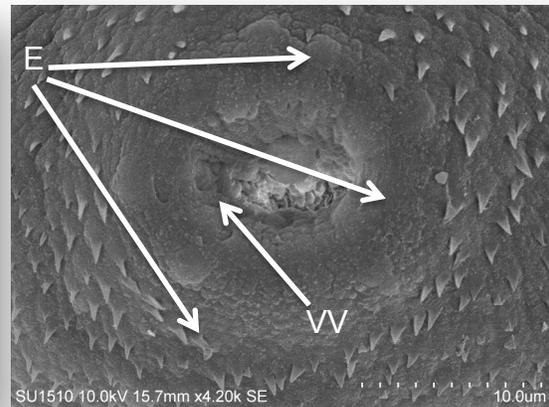


Fig. 20. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa ventral (VV).

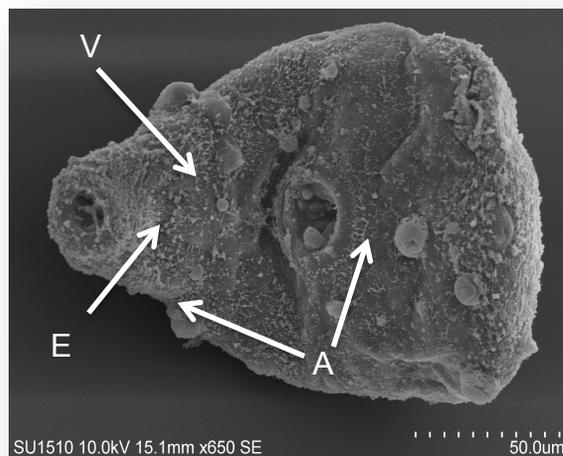


Fig. 21. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 125 mg/L del extracto de Tsapala. Se distinguen vesículas (V), las espinas (E) presentan daños y tenemos la presencia de ampollas (A).

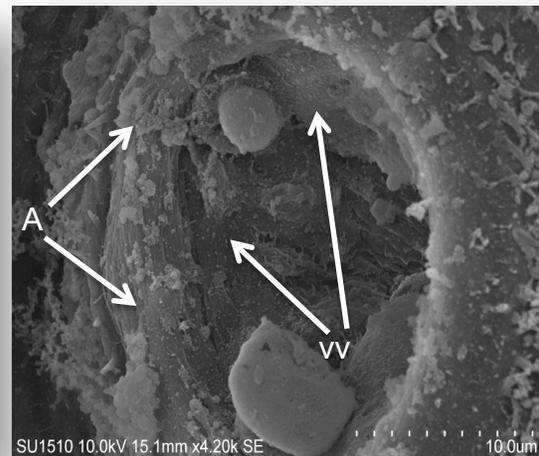


Fig. 24. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 125 mg/L del extracto de Tsapala. Se aprecia un daño en la ventosa ventral (VV) y tenemos la presencia de ampollas (A).

En la concentración de 250 mg/L, en comparación con el grupo testigo sin tratamiento (Fig. 23 y 24). Se presenta una ruptura sobre el tegumento y una discontinuidad en la formación de las espinas de *F. hepatica* (Fig. 25 y 26.)

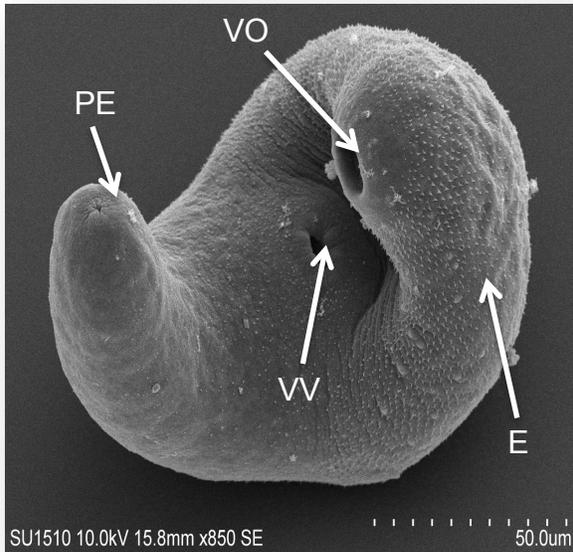


Fig. 23. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa oral (VO), la ventosa ventral (VV) y el poro excretor (PE).

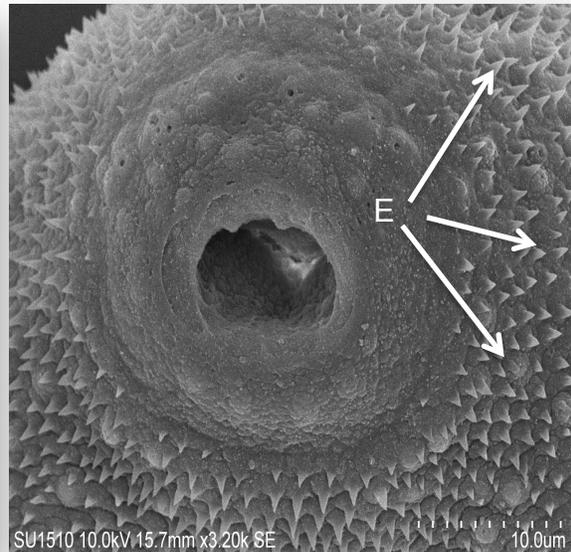


Fig. 24. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa ventral (VV).

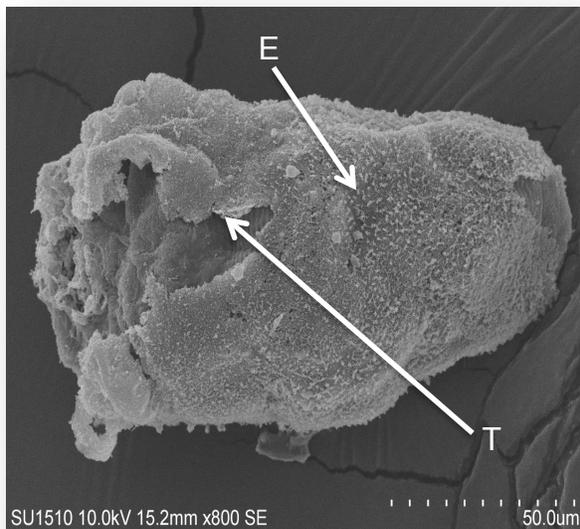


Fig. 25. Vista dorsal de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 250 mg/L del extracto de Tsapala. Se distinguen un daño en las espinas (E), y el sobre el tegumento (T).

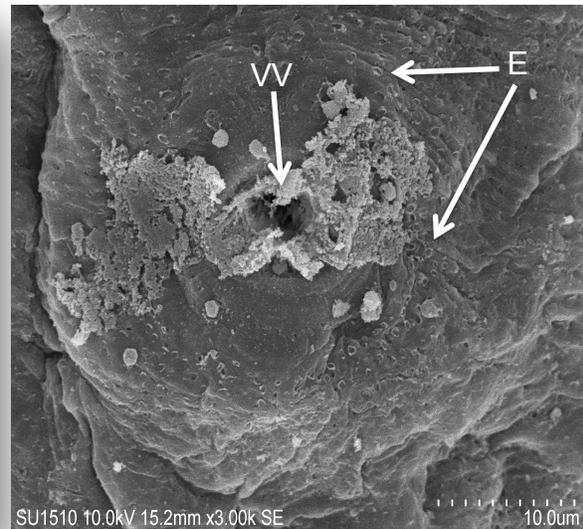


Fig. 26. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 250 mg/L del extracto de Tsapala. Se aprecia un daño en la ventosa ventral (VV) y las espinas (E).

En la concentración de 375 mg/L el efecto fasciolicida se potencializa en comparación con el grupo testigo sin tratamiento (Fig. 27 y 28) debido a que ya no tenemos la presencia de las espinas en las diferentes zonas del tejido. Además de observar una discontinuidad por parte del tegumento y una ruptura en la lamina basal (Fig. 29 y 30).

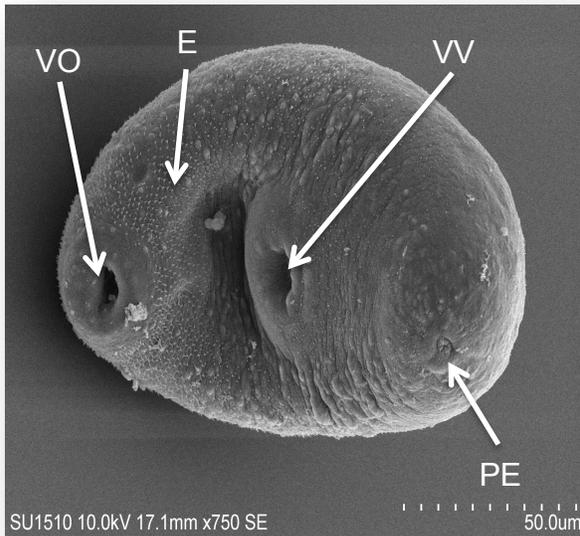


Fig. 27. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa oral (VO), la ventosa ventral (VV) y el poro excretor (PE).

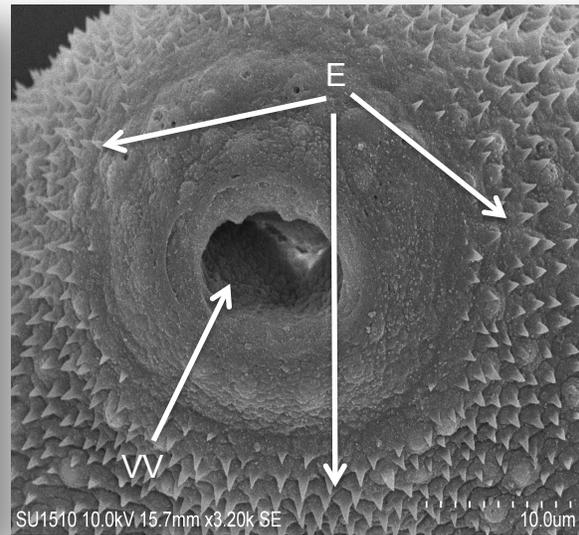


Fig. 28. Ventosa ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa ventral (VV).

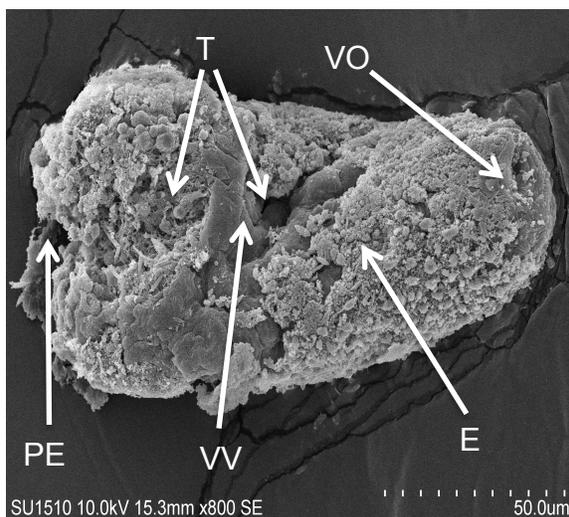


Fig. 29. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 375 mg/L del extracto de Tsapala. Se aprecian daños en el tegumento (T), las espinas (E), el poro excretor (PE), la ventosa oral (VO) y la ventral (VV).

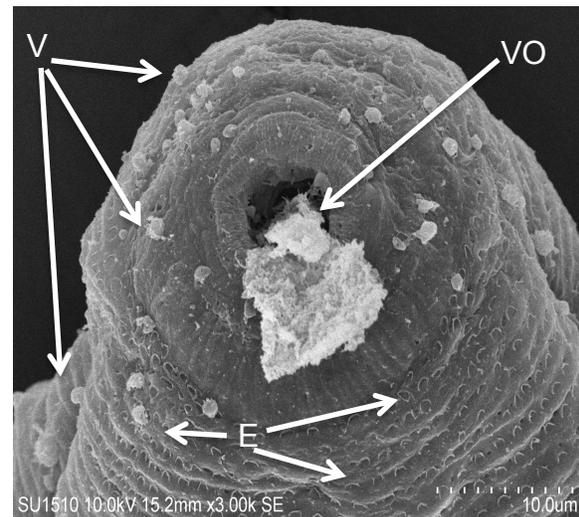


Fig. 30. Ventosa oral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 375 mg/L del extracto de Tsapala. Se aprecia un daño en la ventosa oral (VV) y las espinas (E) además tenemos la presencia de vesículas (V)

En la concentración de 500mg/L del extracto de Tsapala, se aprecian daños de mayor gravedad en comparación con el grupo testigo sin tratamiento (Fig. 31 y 32) debido a la pérdida total de las espinas y el tegumento(Fig. 33 y 34).

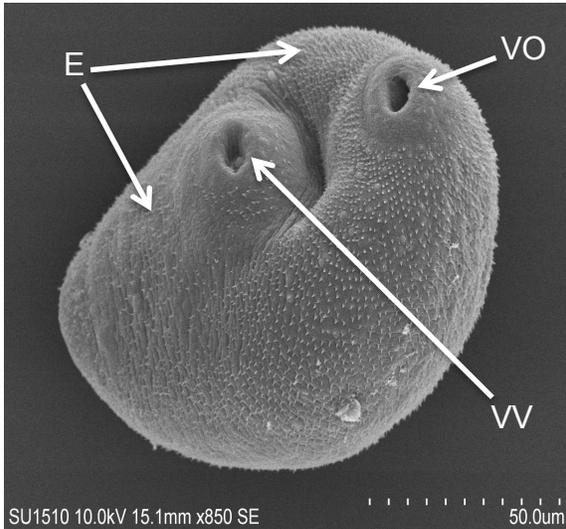


Fig. 31. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa oral (VO), la ventosa ventral (VV).

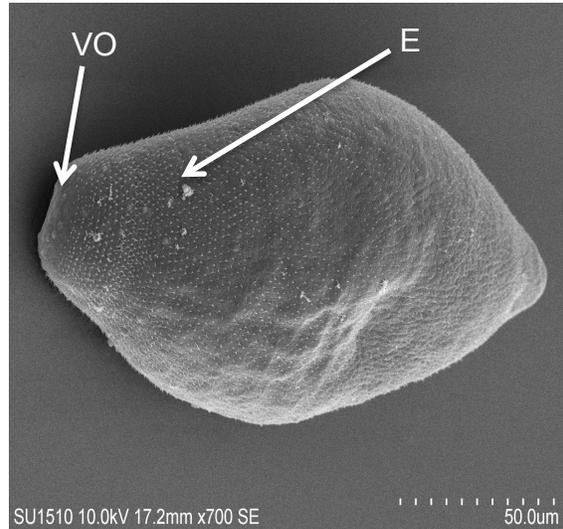


Fig. 32. Vista dorsal de *F. hepatica* recién desenquistada (24 hrs) sin tratamiento. Se aprecian las espinas (E), la ventosa oral (VO)

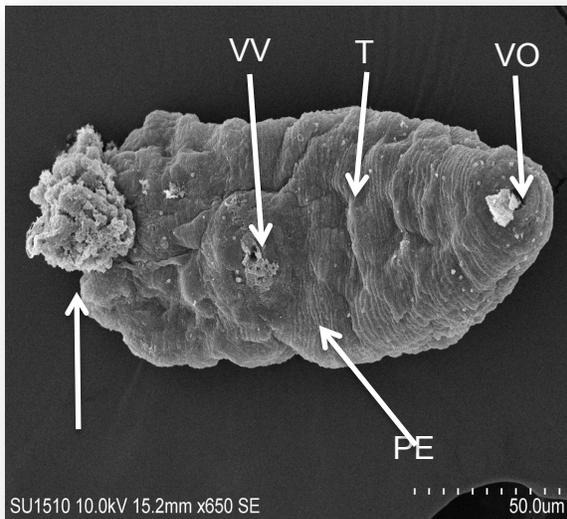


Fig. 33. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 500 mg/L del extracto de Tsapala. Se aprecia una pérdida total del tegumento (T), las espinas (E), el poro excretor (PE), y un daño en la ventosa oral (VO) y la ventral (VV).

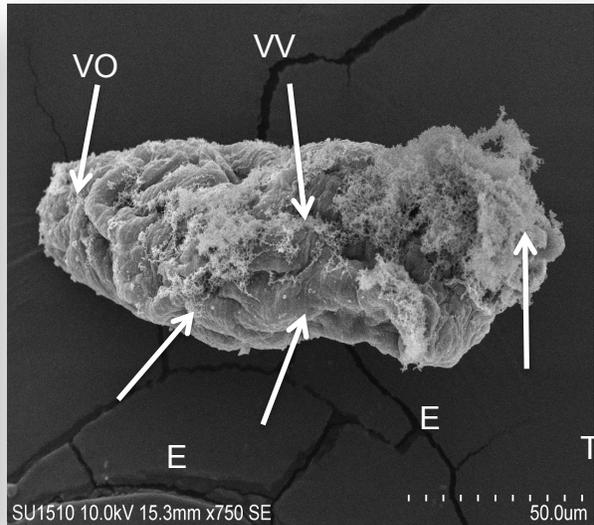


Fig. 34. Vista ventral de *F. hepatica* recién desenquistada a las 24 hrs. Tratada a una concentración de 500 mg/L del extracto de Tsapala. Se aprecia una pérdida total del tegumento (T), las espinas (E), el poro excretor (PE), la ventosa oral (VO) y la ventral (VV).

VIII. DISCUSIÓN

El uso de plantas medicinales, tal como lo define la Organización Mundial de la Salud, es la suma total de conocimientos, habilidades y prácticas basadas en la teorías, creencias y experiencias autóctonas de las diferentes culturas, ya sean explicables o no, algunos sistemas de medicina tradicional están respaldados por grandes volúmenes de literatura y habilidades prácticas, otros se mantienen de generación en generación a través de la enseñanza verbal. En algunas partes del mundo, la mayoría de la población sigue dependiendo de su propia medicina tradicional (Medicina complementaria y/o alternativa). Uno de los problemas de utilizar plantas medicinales es la seguridad, debido que algunas plantas han demostrado tener efectos tóxicos a corto o largo plazo, para confirmar su seguridad se deben de realizar estudios de toxicidad aguda y sub crónica para poder demostrar su verdadero potencial (Ayu et al., 2020 y Kpemissi et al., 2020).

Los resultados obtenidos en el estudio de toxicidad aguda con el extracto metanólico de *V. patens* se demostró que desde la dosis de 1250 a 5000 mg/Kg no se presentaban indicios de toxicidad debido a que no se presentó mortalidad ni pérdida de peso por parte de los ratones, además de que el comportamiento general de los ratones CD-1 no se vio afectado. Estos resultados concuerdan con la información obtenida por Ezeja et al., en el 2014, donde demostró que el extracto metanólico de *Gouania longipetala* a dosis de 5000 mg/Kg no presentaba indicios de toxicidad aguda en las ratas debido a que no se vio afectado el comportamiento general de los animales ni se presentó mortalidad. Por otra parte, un estudio de toxicidad aguda realizado por Oshiomame et al., en el 2018 reporta que el extracto acuoso de *Kedrostis africa* es inocuo a dosis de 5000 mg/Kg al no presentar mortalidad ni alteraciones en el comportamiento general de las ratas. En otro estudio de toxicidad aguda realizado por Yang et al., en el 2019 reporta que el extracto etanólico de *Epigynum auritum* es inocuo a dosis de 5000 mg/Kg debido a que no se presentaron alteraciones en el comportamiento general ni mortalidad por parte de los ratones durante los 14 días de evaluación.

Zheng et al., en el 2016 realizó estudios de toxicidad sub crónica en ratones con un extracto acuoso de *Maydis stigma* donde menciona que los cambios físicos, como la disminución de peso puede indicar un efecto tóxico en los animales tratados a dosis repetidas. Estas observaciones concuerdan con las obtenidas por Kabbaoui et al, en el 2017, en su estudio de toxicidad sub crónica con el extracto acuoso de *Cistus ladaniferus* de igual manera menciona que la mortalidad y el comportamiento general, además del crecimiento son indicadores de algún efecto tóxico a dosis repetidas. Yoshino et al., 2019 administro por 90 días el extracto hidroalcohólico de *Kaempferia parviflora*, reportando que no existe un efecto tóxico

debido a que no se encontraron diferencias en la ganancia de peso en comparación con el grupo testigo sin tratamiento, estos parámetros son de suma importancia debido a que durante el estudio de toxicidad sub crónica de *V. patens* no se presentó ninguna mortalidad ni anomalías en su crecimiento. Además de que no se observaron cambios en el comportamiento general de los ratones CD-1. Los machos se encontraban en excelentes condiciones al igual que las hembras.

En cuanto a la prueba de Micronúcleos realizada dentro de este estudio, no se encontraron datos que indiquen que el extracto de *V. patens* presenta algún tipo de genotoxicidad sobre los eritrocitos de sangre periférica de ratones CD-1. Estos resultados concuerdan con los parámetros establecidos por la directriz 487 Guideline for testing of chemical (2014) de la OCDE en donde establece que al no encontrar micronúcleos se determina que la droga administrada no presenta daño en la replicación celular.

Los estudios de microscopia electrónica son de suma importancia para determinar los efectos de compuestos sintéticos y naturales, sobre los parásitos. La mayoría de los fasciolidas comerciales actúan sobre el tegumento de *F. hepatica* alterando sus funciones de protección y osmorregulación (Rivera et al., 2004; Halton et al., 2004; Toner et al., 2009). Las lesiones observadas por microscopia electrónica en las fasciolas recuperadas, demuestran que el extracto crudo de *V. patens* produce un daño directo sobre el tegumento del parásito y sobre las dos ventosas (oral y ventral). Esto es de suma importante debido a que la ventosa oral y la ventral son determinantes en la supervivencia del parásito, ya que brindan el soporte adecuado y los movimientos migratorios necesarios dentro de los conductos biliares. El tegumento desempeña un papel muy importante en el parásito, debido a que confiere protección y la absorción de nutrientes (Dalton et al., 2004; McCusker et al., 2020).

Un estudio realizado por Ezeta et al en el 2020 demostró que el extracto crudo de *Artemisia ludoviciana* Nutt. *Mexicana* tiene un efecto directo sobre el tegumento de fasciolas juveniles, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el presente estudio con el extracto de *V. patens*, debido al daño en el tegumento del parásito. En el 2019 Martínez reporta la presencia de flavonoides y triterpenos como los metabolitos de mayor abundancia en *V. patens*. Este reporte es de suma importancia ya que Górnjak et al., en el 2019, menciona que algunos flavonoides tienden a inhibir la formación de ATP y ADP, provocando la muerte del parásito. Por otra parte, Ahuir et al. en el 2021 reporta que los triterpenos interactúan con las funciones mitocondriales y con las glicoproteínas presentes en el tegumento de *F. hepatica* ocasionando el desprendimiento del tegumento.

IX. CONCLUSIONES

Los estudios de toxicidad aguda, sub crónica y de genotoxicidad del extracto metanólico de *Vernonanthura patens*, mostraron que el extracto es inocuo desde la concentración de 125 mg/Kg hasta 5000 mg/Kg.

El extracto crudo metanólico de *V. patens* tiene un efecto sobre el tegumento de *Fasciola hepatica*, demostrado por microscopía electrónica de barrido.

X. REFERENCIAS

1. 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*. *Veterinary Parasitology*. 266:1-6.
2. Ahuir, B. A. E., Cibot, F., Llobat, L., Garijo, M. M. 2021. Anthelmintic resistance: is a solution possible?. *Experimental Parasitology*. 230:108-169.
3. Akindele, A. J., Adeneye, A. A., Salu, O. S., Sofidiya, M. O., Benebo, S. A. 2014. Dose and time-dependent sub-chronic toxicity study of hydroethanolic leaf extract of *Flabellaria paniculata* Cav. (*Malpigiaceae*) in rodents. *Frontiers in pharmacology*. 5:78.
4. Alonso, C. A. J., Domínguez, F., Maldonado, M. J. J., Castillo, P. J., Carranza, A. C., Solano, E., Isiordia, E. M. A., Juárez, V. M. C., Zapata, M. J. R., Argueta, M. A. F., Ruiz, P. F. A. Solorio, A. C. R., Rangel, J. E., Ortiz, A. R., González, S. I., Cruz, J. G., Orozco, C. M. 2017. Use of medicinal plants by health professionals in México. *Journal of Ethnopharmacology*. 198:81-86.
5. Alonso, D. M. A., Torres, A. J. F. J., Sandoval, C. C. A., Capetillo, L. C., Brunet, S., Hoste, H. 2008. In vitro larval migration and kinetics of axsheathment of *Haemonchus contortus* larvae exposed to four tropical tanniniferous plant extracts. *Veterinary Parasitology*. 53:313-319.
6. Álvarez, S. M. A., M. J. R. C., Pérez, G. J., Rojo, V. F.A., 2006. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole and albendazole in sheep in Spain. *Veterinary research*. 159:424-425.
7. Álvarez, J. M., Ibarra, F., Alonso, M. A., Vera, Y., Ávila, J. G., Garcia, A. M. 2015. In vitro antihelmintic effect of fifteen tropical plant extracts on excysted flukes of *Fasciola hepatica*. *BMC Veterinary research*. 11:45.
8. Álvarez, M. 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.

9. Alvarez, R. C. A., Jex, A. R., Gasser, R. B., Scheerlinck, J. P. Y. 2014. Chapter Two – Techniques for the Diagnosis of *Fasciola* Infections in Animals: Room for Improvement. *Advances in Parasitology*. 85:65-107.
10. Arifin, M. I., Hoglund, J., Novobilsky, A. 2016. Comparison of molecular and conventional methods for diagnosis of *Fasciola hepatica* infection in the field. *Veterinary Parasitology*. 232:8-11.
11. Ayu, S. V., Melyani, P. I., Anggraeni, N., Adipurna, S. M. R. 2020. The hematologic profile in the acute toxicity of cogon Grass roots ethanol extract in wistar rats. *International journal of applied pharmaceutics*. 12:12-3.
12. Barbosa, E., Calzada, F., Campos, R. 2007. *In vivo* anti-giardial activity of three flavonoids isolated of some medicinal plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*. 109:552-554.
13. Beesley, N. J., Caminade, C., Charlier, J., Flynn, R. J., Hodgkinson, J. E., Martinez, M. A., Martinez, V. M., Perez, J., Rinaldi, L., Williams, D. J. L. 2017. *Fasciola* and fasciolosis in ruminants in Europe: Identifying research needs. *Transboundary and Emerging Diseases*. 1:199-216.
14. Borgsteede, F. H. M., Moll, L., Vellema, P., Gaasenbeek, C. P. H., 2005. Lack of reversion in triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica*. *Veterinary research*. 156:350-351.
15. Brockwell, Y. M., Elliott, T. P., Anderson, G. R., Stanton, R., Spithill, T. W., Sangster, N. C. 2014. Confirmation of *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in naturally infected Australian beef and dairy cattle. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist*. 4:48-54.
16. Busari, I. O., Soetan, K. O., Aiyelaagbe, O. O., Babayemi, O. J. 2021. Phytochemical screening and in vitro anthelmintic activity of methanolic extract of *Terminalia gloucescens* leaf on *Haemonchus contortus* eggs. *Acta tropica*. 223:106091.
17. Campos, A. D. C., Bressan, W. S., Giordini, C., Carra, P. S., Almeida, C. G., Berne, N., Leites, S. A., Antonio, F. R., Brum, C. M. 2021. Ovicidal activity of the hydroalcoholic extract of Brazilian peppertree (*Schinus terebinthifolia Raddi*) against *Ancylostoma* spp. From a naturally parasitized dogs. *Natural Product Research*. 36:5899-5903.

18. Carnevale, S., Malandrini, J. B., Pantano, M. L., Sawicki, M., Kamenetzky, L., Soria, C. C., Velásquez, J. N. 2021. Use of the PCR in a combined methodological approach for the study of human fascioliasis in an endemic área. *Acta parasitológica*. 66:455-460.
19. 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*. *Veterinary Parasitology*. 271:7-12.
20. Chávez, A., Sánchez, L., Arana, C., Suárez, F. 2012. Resistance to anthelmintics and prevalence of bovine fasciolosis in dairy farms in Juaja, Peru. *Rev. Inv. Vet. Peru*. 23:90-97.
21. Chóez, G. I., García, J., Sánchez, C., Pesantes, C., Flores, J., Manzano, P. 2021. Identification of lupeol produced by *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Leaf callus culture. *Natural Product Research*. 35:503-507.
22. Cruz, M. I. 2001. Identificación, ciclo de vida, dinámica poblacional, grado de caracoles y transmisión de fasciolosis bovina bajo condiciones de campo y de laboratorio (Tesis Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM.
23. Cwiklinski, K., de la Torre-Escudero, E., Trelis, M., Bernal, D., Dufresne, P. J., Brennan, P. G., O'Neill, S., Tort, J., Paterson, S., Marcilla, A., Dalton, P. J., Robinson, M.W. 2015. The Extracellular Vesicles of the Helminth Pathogen, *Fasciola hepatica*: Biogenesis Pathways and Cargo Moles Involved in Parasite Pathogenesis. *Molecular Cellular Proteomics*. 14:3258-3273.
24. Dalton, J. P., Robinson, M. W., Mulcahy, G., O'Neill, S. M., Donnelly, S. 2013. Immunomodulatory molecules of *Fasciola hepatica*: Candidates for both vaccine and immunotherapeutic development. *Veterinary Parasitology*. 195:272-285.
25. Dalton, J. P., Skelly, P., Halton, D. W. 2004. Role of the tegument and gut in nutrient uptake by parasitic plathyhelminths. *Canadian Journal of Zoology*. 82:211–232.
26. Daniel, R., Van Dijk, J., Jenkins, T., Akca, A., Mearns, R., Williams, D.J., 2012. Composite faecal egg count reduction test to detect resistance to triclabendazole in *Fasciola hepatica*. *Veterinary research*. 171:153-157.
27. Dashti, A., Shokrzadeh, M., Kamari, M., Habibi, E. 2022. Phytochemical identification, acute and subchronic oral toxicity assessments of hydroalcoholic

extract of *Acroptilon repens* in BALB/ c mice: A toxicological and mechanistic study. *Heliyon*. 8:1-12.

28. David, M. M., Roberto, A. F., Myrna, M. C. 2006. Plantas Medicinales de cuatro mercados del estado de Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 79:79-87.

29. Davies, C. N. E., Slapeta, J. 2021. *Fasciola* species introgression: Just a fluke or something more?. *Trends in Parasitology*. 1:25-34.

30. Diallo, A., Eklou, G. K., Amegbor, K., Agbonon, A., Aklikokou, K., Creppy, E., Gbeassor, M. 2014. *In vivo* and *in vitro* toxicological evaluation of the hydroalcoholic leaf extract of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 2:1214-1218.

31. Dos Santos S. T. G., Marques D. M., Souza F. G., De Melo A. L. F., Da Silva M. A., De Oliveira A. M., De Oliveira F. A. J. C. R., Do Amaral F. N. D. M., Amanajás de A. J. F. C., Da Silva M. V., Aparecido C. C. 2021. Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity and genotoxicity studies. *J. Ethnopharmacol*. 272:113941.

32. Doxon, O. 2016. Abattoir post-mortem conditions guide. Agriculture and Horticulture Development Board. 1:1-32.

33. Elitok, B., Elitok, O.M., Kabu, M. 2006. Field trial on comparative efficacy of four fasciolicides against natural liver fluke infection in cattle. *Veterinary Parasitology*. 135:279–285.

34. Elliott, T.P., Kelley, J.M., Rawlin, G., Spithill, T.W. 2015. High prevalence of fasciolosis and evaluation of drug efficacy against *Fasciola hepatica* in dairy cattle in the Maffra and Bairnsdale districts of Gippland, Victoria, Australia. *Veterinary Parasitology*. 209:117-124.

35. Evans, S. R., Hofmann, A. 2012. Plantas de los dioses. Orígenes del uso de los alucinógenos. 5ª. Reimpresión. Ed. Fondo de cultura económica. México. p. 182-190.

36. Ezeja, M. I., Anaga, A. O., Asuzu, I. U. 2014. Acute and sub-chronic toxicity profile of metanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 151:1155-1156.

37. Ezeta, M. A. 2016. Determinación de los metabolitos secundarios de estafiate (*Artemisia ludoviciana* Nutt. Spp. *mexicana*) con actividad fasciolicida y su evaluación biológica *in vitro*. (Tesis de Maestría). Ciudad de México, México. UNAM.
38. Ezeta, M. A. 2021. Estudios toxicológicos y de microscopía electrónica para conocer la seguridad y modo de acción contra *Fasciola hepatica* del extracto de *Artemisia ludoviciana* Nutt. spp *Mexicana*. (Tesis de Doctorado). Ciudad de México, México. UNAM.
39. Ezeta, M. A., Vera, M. Y., Ávila, A. J. G., García, B. A. M., Estrella, P. E. A., Francisco, M. G., Ibarra, V. F. 2020. Efficacy of purified fractions of *Artemisia ludoviciana* Nutt. *Mexicana* and ultrastructural damage to newly excysted juveniles of *Fasciola hepatica in vitro*. *Veterinary Parasitology*. 285:109184.
40. Fantatto, R. R., Souza, A. C., Gainza, Y. A., Sanches, P. F. A., Sousa, M. L. M., Vilegas, W., Ribeiro, B. H., Montanari, J. I., Rodrigues, P. R. C. L. 2022. Acaricidal and anthelmintic action of ethanolic extract and essential oil of *Achyrocline satureioides*. *Experimental Parasitology*. 236:108252.
41. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), 2001. Secretaría de Salud, México, D.F.177 p.
42. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM), 2013. Secretaría de Salud, México, D.F., 2th edition.371 p.
43. Feistel, B., Wegener, T., Rzymki, P., Pischel, I. 2018. Assessment of the acute and subchronic toxicity and mutagenicity of *Sideritis scardica* griseb. Extracts. *Toxins*. 10:258.
44. Flanagan, A. M., 2010. Development of Diagnostic Tests for the Detection of Resistance to Triclabendazole in *Fasciola Hepatica*. Ph.D. Thesis. The Queen's University of Belfast.
45. 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.
46. Francisco M.G. (2015). Actividad fasciolicida *in vitro* de extractos de plantas provenientes de Amixtlán, Puebla (Tesis de Licenciatura). Universidad Interserrana del Estado de Puebla-Ahuacatlán.

47. Gad, S. C. 1990. Model selection in toxicology: Principles and practice. *Journal of the American College of Toxicology*. 9:291-302.
48. Gordon, D., Zadoks, R., Skuce, P., Sargison, N. 2012^a. Confirmation of triclabendazole resistance in liver fluke in the UK. *Veterinary research*. 171:159.
49. Gordon, D.K., Zadoks, R.N., Stevenson, H., Sargison, N.D., Skuce, P.J. 2012^b. On farm evaluation of the coproantigen ELISA and coproantigen reduction test in Scottish sheep naturally infected with *Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*. 187:436–444.
50. Górniak, I., Bartoszewski, R., Króliczewski, J. 2019. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochem Rev*.18:241-272.
51. Guerrero, E. A., Bernad, A. A. 2020. Incidencia y distribución geográfica de pacientes hospitalizados con fascioliasis en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 6:257-262.
52. Halton, D. W. 2004. Microscopy and the helminth parasite. *Micron*. 35:361-390.
53. Hanna, R.E.B., McMahon, 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 clo- santel on selected upland and lowland sheep farms in Northern Ireland using faecal egg counting, coproantigen ELISA testing and fluke histology. *Veterinary Parasitology*. 207:34–43.
54. Harba, N. M., Khair, N. S., Azzaz, M. F. 2019. Anti-giardial activity of the aqueous extracts of *Cymbopogon citratus* leaves(Lemongrass) and *Pulicaria undulate* herb in coparison with Metronidazole, *in vitro* and *in vivo*. *Egyptian Journal of Medical Microbiology*. 28:1-12.
55. Harnborne, J. B. 1970. Phytochemical phylogeny, *Proceedings of the Phytochemical Society Symposium*. London: Academic. London.
56. Hernández, S. A. P. 2009. Plantas medicinales y su efecto antimicrobiano: un servicio ecosistémico de la cuenca del rio magdalena, D.F. (Tesis de licenciatura). UNAM. 6-17 pp.

57. Hossain, E., Chandra, G., Nandy, A. P., Mandal, S. C., Gupta, J. K. 2012. Anthelmintic effect of a metanol extract of leaves of *Dregea volubilis* on *Paramphistomun explanatum*. Parasitology Research.110:809-814.
58. Hsu, P. K., Tsai, Y. T., Ling, Y. C., Kuan, C. M. 2022. Assessment of the acute and sub-acute toxicity of the ethanolic extract of the aerial parts of *Crassocephalum rabens* (Asteraceae) in rats. Toxicology reports. 9:58-63.
59. Hyun, S. W., Lee, T. G., Song, S. J., Kim, C. S. 2021. Evaluation of oral toxicity and genotoxicity of *Achyranthis radix* extract. Journal of Ethnopharmacology. 274:113944.
60. Ipohorski, M., Bozzano, P. B. 2013. Microscopía electrónica de barrido en la caracterización de materiales. Ciencia e investigación. 63:45-63.
61. Kabbaoui, M. E., Chda, A., Akhal, J., Azdad, O., Mejrhit, N., Aarab, L., Bencheikh, R., Tazi, A. 2017. Acute and-chronic toxicity studies of the aqueous extract from leaves of *Cistus ladaniferus* L. in mice and rats. Journal of Ethnopharmacology. 209:147-149.
62. 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. Veterinary Parasitology.184:502–507.
63. Kasterova, E., Zibareva. L., Revushkin, A. 2019. Secondary metabolites of some siberian species of plants tribe *Cynareae* (Asteraceae). South African Journal of Botany. 125:24-29.
64. Keyyu, J.D., Kassuku, A.A., Kyvsgaard, N.C., Monrad, J. 2008. Comparative efficacy of anthelmintics against *Fasciola gigantica* and amphistomes in naturally infected cattle in Kilolo District, Tanzania. Tanzania Veterinary Journal. 25:40–47.
65. Kotni, M. 2019. Regulating Traditional Mexican Midwifery: Practices of Control, Strategies of Resistance, Medicinal Anthropology. 38:137-151.
66. Koumba, M. N. O., Traore, A., Souza, A., Boukandou, M. M. M., Aworet, S. R. R., Quedrago, S., Sababenedyo, T. A. 2016. Preliminary studies of acute and sub-chronic toxicity of the aqueous extract of *Guibourtia tessmannii* (Harms)J. Leonard stem barks (Caesalpinaceae) in mice and rats. Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine. 6:506-510.

67. Kpemissi, M., Metowogo, K., Melila, M., Veerapur, V. P., Negru, M., Taulescu, M., Potarniche, A. V., Subas, D. S., Puneeth, T. A., Vijayakumar, A., Gadegbeku, K. E., Aklikokou, K. 2020. Acute and subchronic oral toxicity assessments of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in wistar rats. *Toxicology Reports*. 18: 162-168.
68. Krishna, G., Hayashi, M. 2000. *In vivo* rodent micronucleus assay: Protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*. 455:155-166.
69. Landeros, M. M. A. 2016. Efecto fasciolicida *in vitro* de los metabolitos secundarios de *Bocconia frutescens* mediante cromatografía de columna y cromatografía de capa fina. (Tesis de Licenciatura) Ciudad de México, México. UNAM.
70. Maimaiti, A., Jing, J. L., Shi, L. 2021. Investigating the acute and sub-acute toxicity of medicinal *Cuscuta chinensis* Lam Planta. *Journal of Ethnopharmacology*. 273:114005.
71. Mamani, W., Condori, R. 2009. Anthelmintic resistance (*Fasciola hepatica*) in sheep against albendazole and triclabendazole, La Paz-Bolivia. *Rev. Inv. Vet. Peru*. 20:254–262.
72. Manzano S. P., Miranda M, Quijano M. F., Monzote L. 2015. Advances in studies of *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. Growing in Ecuador. *Phytochemicals – Isolation, Characterisation and Role in Human Heal*. 3:81–97.
73. Manzano, S. P., Miranda, M. G., Fabian, P. C., Abreu, P.J. 2012. Aislamiento y caracterización de la fracción hexánico de las hojas de *Vernonanthura patens* (Kunth) H. Rob. con actividad antifúngica. *Revista Cubana de Farmacia*. 46: 352-358.
74. Manzano, S. P., Miranda, M., Payrol, J. U., Silva, M., Sterner, O., Peralta, E. L. 2013. Pentacyclic triterpenoids with antimicrobial activity from the leaves of *Vernonanthura patens* (Asteraceae). *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 25:539-543.^b
75. Manzano, S. P., Orellana, L.T., Miranda, M.M., Abreu, P.J., Ruíz, O., Peralta, G.L. 2013. Algunos parámetros farmacognósticos de *Vernonanthura patens* (Kunth) H.Rob. (Asteraceae) de Ecuador. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 18:131-139.^a

76. Martínez-Valladares, M., Cordero-Pérez, C., Rojo-Vázquez, F.A. 2014. Efficacy of an anthelmintic combination in sheep infected with *Fasciola hepatica* resistant to albendazole and clorsulon. *Experimental Parasitology*. 136:59–62.
77. Martínez-Valladares, M., Famularo, M.D.R., Fernández-Pato, N., Castañón-Ordóñez, L., Cordero-Pérez, C., Rojo-Vázquez, F.A. 2010. Efficacy of nitroxynil against *Fasciola hepatica* resistant to triclabendazole in a naturally infected sheep flock. *Parasitology research*. 107:1205–1211.
78. Martínez, G. D. M. 2018. Aislamiento de fracciones y/o compuestos de *Vernonanthura patens*, con actividad fasciolicida. V encuentro internacional sobre biotecnología en la UATX.1-1p.
79. Martínez, P. N., Ortiz, J. E., Cortes, S. N., Jesus, P. M., Gascon, J., Tapia, A., Roitman, G., Bastida, J., Feresin, G. E., Alonso, P. J. 2022. Anti-Trypanosoma cruzi activity of alkaloids isolated from Habranthus brachyandrus (Amaryllidaceae) from Argentina. *Phytomedicine*. 101:154126.
80. Mas-Coma, S., Bargues, D. M., Valero, M. A. 2005. Fascioliasis and other plant-borne trematode zoonoses. *International Journal for Parasitology*. 35:1255-1278.
81. Mas-Coma, S., Valero, M. A., Bargues, D. M. 2022. Fascioliasis in Humans and Animals. *Encyclopedia of Infection and Immunity*. 2:513-531.
82. McCuster, P., Toet, H., Rathinasamy, V., Young, N., Beddoe, T., Anderson, A., Dempster, R., McVeigh, P., McCammick, E., Wells, D., Mousley, A., Maule, A. G., Spithill, W. T. 2020, *Molecular characterisation and vaccine efficacy of two novel developmentally regulated surface tegument proteins of Fasciola hepatica*. *Veterinary Parasitology*. 286:109244.
83. Mitchell, G. B. B., Maris, L., Bonniwell, M.A. 1998. Triclabendazole-resistant liver fluke in Scottish sheep. *Veterinary research*. 143:399.
84. 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. *Veterinary Parasitology*. 9:153-158.
85. Monroy O. C., Castillo, E. P. 2007. Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. CONABIO. México.

86. Monroy, O. C., García, M. E., Romero, M. A., Sánchez, Q. C., Cavazos, M. L., Uscanga, M. E., Flores, G. J. S., Gonzáles, R. V. 2017. Plants of local for medicinal and conservation purposes in Morelos, México. *Estudies on Ethno-Medicine*. 7:13-26.
87. Mooney, L., Good, B., Hanrahan, J.P., Mulcahy, G., De Waal, T. 2009. The comparative efficacy of four anthelmintics against a natural acquired *Fasciola hepatica* infection in hill sheep flock in the west of Ireland. *Veterinary Parasitology*. 164:201–205.
88. Novobilský, A., Averpil, H.B., Höglund, J. 2012. The field evaluation of albendazole and triclabendazole efficacy against *Fasciola hepatica* by coproantigen ELISA in naturally infected sheep. *Veterinary Parasitology*. 190: 272–276.
89. Novobilský, A., Höglund, J. 2015. First report of closantel treatment failure against *Fasciola hepatica* in cattle. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist*. 5:172–177.
90. Novobilský, 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.
91. Nzalawahe, J., Hannah, R., Kassuku, A.A., Stothard, J.R., Coles, G., Eisler, M.C. 2018. Evaluating the effectiveness of trematocides against *Fasciola gigantica* and amphis- tomes infections in cattle, using faecal egg count reduction tests in Iringa Rural and Arumeru Districts, Tanzania. *Parasitology vector*. 11:384.
92. Olaechea, F., Lovera, V., Larroza, M., Raffo, F., Cabrera, R. 2011. Resistance of *Fasciola hepatica* against triclabendazole in cattle in Patagonia (Argentina). *Veterinary Parasitology*. 178:364–366.
93. Oliveira, D. R., Ferreira, D. M., Stival, C. C., Romero, F., Cavagnoli, F., Kloss, A., Araújo, F. B., Molento, M. B. 2008. Triclabendazole resistance involving *Fasciola hepatica* in sheep and goats during an outbreak in Almirante Tamandare, Paraná, Brazil. *Brazil J. Veterinary Parasitology*. 17:149–153.
94. Ollivier, C. L., Eldin, C., Lambourg, E., Brouqui, P., Lagier, J. C. 2020. Case report: First diagnosis of liver abscesses due to *Fasciola hepatica* acute infection imported from Vietnam. *American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 102:106-109.

95. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD) (2015). Genetic Toxicology Guidance Document 2015. 31 August.
96. Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD) (2001). Guideline for testing of chemical 420. Acute Oral Toxicity-Up and Down Procedure. 17 December.
97. Organización para la cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD) (2008). Guideline for testing of chemical 425. Acute Oral Toxicity-Up and Down Procedure (UDP). 3 October.
98. Organización para la cooperación y el Desarrollo económico (OCDE/OECD) (2017). Guideline for testing of chemical 408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents.
99. Organización para la cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD(1997). Guideline for testing of chemical 473. *In Vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test. 21 st July.
100. Organización para la cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE/OECD) (2014). Guideline for testing of chemical 487. *In vitro* Mammalian Cell Micronucleus test. 26 September.
101. 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 (Peru): a clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 195:118–121.
102. 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 (Peru): a clinical trial and an *in vivo* efficacy test in sheep. *Veterinary Parasitology*. 195:118–121.
103. Oshiomame, U. J., Aderonke, O. G., Jide, A. A. 2018. Acute and sub- acute toxicity of aqueous extract of the tuber of *Kedrostis africa* (L) Cogn in wistar rats. *Journal of complementary and integrative medicine*. 15:20170139.
104. Oshiomame, U. J., Aderonke, O. G., Jide, A. A. 2018. Evaluation of acute and sub- acute toxicity of whole-plant aqueous extract of *Vernonia mespilifolia* Less. in Wistar rats. *Journal of Integrative Medicine*. 16:335- 341.

105. Overend, D. J., Bowen, F. I. 1995. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole. Australian Veterinary Journal. 72:275–276.
106. Parvan, E., Damazo, A. S., Lemos, L. M. S., Adzu, B., Balogun, S. O., Arunachalam, K., Martis, D. T. O. M. 2018. Evaluation of genotoxicity and subchronic toxicity of the standardized leaves infusion extract of *Copaifera malmei* Harms in experimental models. Journal of Ethnopharmacology. 211:70-71.
107. Ramakrishna, A., Aswathanarana, G. 2011. Influence of biotic stress signals on secondary metabolites in plants. Plants Signaling & Behavior. 6:1720-1731.
108. Remigio M. A. C., Ferrer J. P., Hurtado Y. V., Ferrala C. R., Carballo C. 2007. Evaluación genotóxica del extracto hidroalcohólico de *Tamarindus indica* L. Empleando el ensayo de micronúcleos en medula ósea de ratón. Revista Cubana de Plantas Medicinales. 12:12-20.
109. Rivera, N., Ibarra, F., Zepeda, A., Fortoul, T., Hernandez, 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 Research. 93:283-286.
110. Robles-Pérez, D., Martínez-Pérez, J.M., Rojo-Vázquez, F.A., Martínez-Valladares, M. 2013. The diagnosis of fasciolosis in faeces of sheep by means of a PCR and its application in the detection of anthelmintic resistance in sheep flocks naturally infected. Veterinary Parasitology. 197:277–282.
111. Rodríguez-Vivas. R. I., Grisi, L., Pérez de León, A. A., Silva, V. H., Torres-Acosta, J. F., Fragoso, Sánchez, F. H., Romero, S. D., Rosario, C. R., Saldierna, F., Garcia, C. D. 2017. Evaluación del impacto económico potencial de los parásitos del ganado bovino en México. Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 8:61-74.
112. Rojas, J. 2012. Resistance of *Fasciola hepatica* to triclabendazole in cattle of the Cajamarca countryside. Revista Veterinaria Argentina. 7:71–76.
113. Romero, J., Villaguala, C., Quiroz, F., Laudaeta-Aqueveque, C., Alfaro, G., Pérez, R. 2019. Flukicide efficacy against *Fasciola hepatica* of triclabendazole and nitroxynil in cattle of the central valley of Chile. Brazilian Journal of Veterinary Parasitology. 28:164–167.
114. Sanabria, R., Ceballos, L., Moreno, L., Romero, J., Lanusse, C., Alvarez, L. 2013. Identification of a field isolate of *Fasciola hepatica* resistant to albendazole

and susceptible to triclabendazole. *Veterinary Parasitology*. 193:105–110.

115. Sánchez, P. C. K. 2015. Evaluación de la eficacia fasciolicida *in vitro* de 14 extractos de plantas mexicanas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UNAM. 28-30 pp.

116. Sargison, N. R., Scott, P. R. 2011. Diagnosis and economic consequences of triclabendazole resistance in *Fasciola hepatica* in a sheep flock in south-east Scotland. *Veterinary research*.168:159–164.

117. Secretaria 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. Diario Oficial de la Federación. México.

118. Siles-Lucas, M., Becerro-Recio, D., Serrat, J., González, M. 2021. Fascioliasis and fasciolopsiasis: Current knowledge and future trends. *Research in Veterinary Science*. 134:27-35.

119. Shakya, A., Kumar, C. S., Raj, B. H., Kumarm, G. S. 2020. Acute and sub. Chronic toxicity studies of *Benincasa hispida* (Thunb.) *cogniaux* fruit extract in rodents. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 118:104785.

120. Shayne, C. 2007. *Animal Models in Toxicology*. Ed. London New York, Second Edition. 48-49 pp.

121. Shin, S., Yi, J. M., Kim, N. S., Park, C. S., Kim, S. I., Bang, O. S. 2019. Aqueous extract of *Forsythia viridissima* fruits: Acute oral toxicity and genotoxicity studies. *Journal of Ethnopharmacology*. 249:112381.

122. Shokier, K. M., Aboelhadid, S. M., Waleed, M. A. 2013. Efficacy of five anthelmintics against a natural *Fasciola* species infection in cattle. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci*. 2:41–45.

123. Shoriki, T., Seki, M. I., Suganuma, K., Naito, I., Hayashi, K., Nakao, M., Aita, J., Mohanta, U.K., Inoue, N., Murakami, K., Itagaki, T. 2016. Novel methods for the molecular discrimination of *Fasciola* spp. on the basis of nuclear protein-coding genes. *Parasitology International*. 3:180-183.

124. Siles, L. M., Becerro, R. D., Serrat, J., Gonzales, M. J. 2021. Fascioliasis and fasciolopsiasis: Current Knowledge and future trends. *Research in Veterinary Science*. 134:27-35.
125. Sundaram, V., Mohammed, S., Srinivasan, M. R., Johnson, J., Suepaul, R., Pargas, I., John, C., Ramdhanie, D., Shiann, L., Daniel, E. Gilkes, L. 2021. Acute and subacute toxicity evaluation of hydroalcoholic extract from the stem bark of Bois Bande (*Parinari campestris* Aubl.1772) in rats. *BMC Pharmacology and Toxicology*. 22:22-51.
126. Taylor M. A., Copp, R. L., Wall, R. L. (4^aEd.) 2015. *Veterinary Parasitology*. Wiley Blackwell, UK. 1007 pp.
127. Thomas, I., Coles, G.C., Duffus, K. 2000. Triclabendazole-resistant *Fasciola hepatica* in South-west Wales. *Veterinary research*. 146:200.
128. Toner, E., Mc Convery, F., Frennan, G. P., Meaney, M., Fairweather, I. 2009. A scanning electron microscope study on the route of entry of triclabendazole into the liver fluke, *Fasciola hepatica*. *Parasitology*. 136:523-535.
129. Trease, G. E, 1987. *Tratado de farmacognosis*. Ed. Interamericana, México.
130. Váradyová, Z., Pisarcíková. J., Babják, M., Hodges, A., Mravcáková, D., Kisidayová, S., Konigová, A., Vadlejch, J., Várady, M. 2018. Ovicidal and larval activity of extracts from medicinal-plants against *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology*. 195:71-77.
131. Vélez, T. M., Campos, G. R., Sánchez, G. H. 2011. Uso de metabolitos secundarios de las plantas para reducir la metanogénesis ruminal. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 3:489-499.
132. Venturina, V. M., Alejandro, M. A. F., Baltazar, C. P., Abes, N. S., Mingala, C. N. 2015. Evidence of *Fasciola* spp. resistance to albendazole, triclabendazole and bromofenofos in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). *Annals of Parasitology*. 61:283–289.
133. Vera, M. Y. (2011). FASCIOLOSIS. En: *Parasitología Veterinaria*, Vol. II. Helmintos. EDS: Ibarra V.F.; Figueroa C.J.A. y Quiroz R.H. 1^a. Edición. Ed. Color. México, D.F.

134. Vera, M. 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.
135. Vera, M. Y., Ibarra, V. F., Ramírez, A. G., Murguía, X. J. 2008. *In vitro* Fasciolicide Activity of Some Plant Extracts against New Excysted Flukes. *Animal Biodiversity and Emerging Diseases: Annals of the New York Academy of Sciences*.1149:180-182.
136. Wang, L., Li, Z., Li, L., Li, L. Y., Yu, M., Zhou, Y., Lu, X., Arai, H., Xu, X. 2014. Acute and sub-chronic oral toxicity profile of the aqueous extract of *Cortex Dictamni* in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 158:207-215.
137. Wilson, C. C., Jenkins, D. J., Barnes, T. S., Brookes, V. J. 2019. Evaluation of the diagnostic sensitivity and specificity of meat inspection for hepatic hydatid disease in beef cattle in an Australian abattoir. *Preventive Veterinary Medicine*. 167:9-15.
138. Yang, M., Wu, Z., Wang, Y., Kai, G., Njateng, G. S. S., Cai, S., Cao, J., Cheng, G. 2019. Acute and subacute toxicity evaluation of ethanol extract from aerial parts of *Epigynum auritum* in mice. *Food and Chemical Toxicology*. 131:110534.
139. Yoshino, S., Awa, R., Ohto, N., Miyake, Y., Kuwahara, H. 2019. Toxicological evaluation of standardized *Kaempferia parviflora* extract: sub-chronic and mutagenicity studies. *Toxicology reports*. 6:544-549.
140. Zeng, P. K., Yan, Z. S., Li, Z. H. 2016. Toxicological evaluation of the flavonoid-rich extract from *Maydis stigma*: subchronic toxicity and genotoxicity studies in mice. *Journal of Ethnopharmacology*.192: 161.169.