

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



TRABAJO DE GRADUACIÓN:

**TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA (90 DÍAS) DEL EXTRACTO  
CLOROFÓRMICO DE *Calea urticifolia* (JUANISLAMA) EN RATONES DE  
LABORATORIO.**

PRESENTADO POR:

SILVIA ELIZABETH PÉREZ MARTÍNEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:

LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

CIUDAD UNIVERSITARIA, MAYO DE 2017.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

TRABAJO DE GRADUACIÓN:

**TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA (90 DÍAS) DEL EXTRACTO  
CLOROFÓRMICO DE *Calea urticifolia* (JUANISLAMA) EN RATONES DE  
LABORATORIO.**

PRESENTADO POR:  
SILVIA ELIZABETH PÉREZ MARTÍNEZ

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

ASESORES

M. Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERON

LIC. MIGUEL ÁNGEL MORENO

F. \_\_\_\_\_

F. \_\_\_\_\_

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA  
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

TRABAJO DE GRADUACIÓN:  
**TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTÍNUA (90 DÍAS) DEL EXTRACTO  
CLOROFÓRMICO DE *CALEA URTICIFOLIA* (JUANISLAMA) EN RATONES DE  
LABORATORIO.**

PARA OPTAR AL GRADO DE:  
LICENCIADA EN BIOLOGÍA.

**TRIBUNAL EVALUADOR:**

Lic. M.V.Z. Roberto Guillen Paredes

Lic. José Guillermo Mejía Valencia

F. \_\_\_\_\_

F. \_\_\_\_\_

M. Sc. Ana Martha Zetino Calderon

Lic. Miguel Ángel Moreno

F. \_\_\_\_\_

F. \_\_\_\_\_

CIUDAD UNIVERSITARIA, MAYO DE 2017.

**AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**RECTOR**

M.Sc. ROGER ARMANDO ARIAS

**VICERECTOR ACADÉMICO**

Dr. MANUEL DE JESÚS JOYA

**SECRETARIA GENERAL**

LIC. CRISTOBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

**FISCAL GENERAL INTERINO**

LIC. DINA ALHELY CASTELLÓN

**DECANO**

LIC. MAURICIO HERNAN LOVO CORDOVA

**DIRECTORA ESCUELA DE BIOLOGÍA**

M. Sc. ANA MARTHA ZETINO CALDERON

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios y a mis padres, pues gracias a ellos he logrado culminar esta etapa de formación, de la misma forma agradezco a mis asesores MSc. Martha Zetino y Lic. Miguel Moreno, al Lic. Noel Avalos, pues sin su ayuda y guía este trabajo no habría podido ser culminado con éxito, de igual forma al Lic. M.V.Z. Roberto Guillen y al Lic. José Mejía que formaron parte del tribunal evaluador. Fue un verdadero reto el desarrollar cada etapa de este trabajo y ver poco a poco como éste fue avanzando, gracias también a mis amigos Melany Murillo y Diego Herrera por estar siempre apoyándome, también a mis compañeros Amanda Bonilla, Rocío Guerra, Daniel Laínez, Marvin Wipfli y Denis Morales, pues cada uno, en diferentes momentos, fueron un ejemplo o me brindaron el apoyo y aliento que necesitaba para continuar.

Reitero la importancia de los miembros de mi familia: Mi madre Silvia, mi padre Manuel, mis hermanos Edwin, Patricia y Daniel, mi pareja Luis José Asencio y cada una de las personas antes mencionadas les doy las más sinceras gracias por formar parte de mi vida, bendiciones abundantes llenen cada uno de sus días.

*“En medio del invierno, descubrí que había, dentro de mí, un verano invencible. Y eso me hace feliz. Porque esto dice que no importa lo duro que el mundo empuja contra mí; dentro de mí hay algo más fuerte, algo mejor, empujando de vuelta” Albert Camus.*

## INDICE DE CONTENIDO

RESUMEN .....	- 1 -
I. INTRODUCCIÓN .....	- 2 -
II. OBJETIVOS .....	- 4 -
2.1 General. ....	- 4 -
2.2 Específicos. ....	- 4 -
III. MARCO TEÓRICO .....	- 5 -
3.1 Toxicología y conceptos generales. ....	- 5 -
3.1.1 Absorción de tóxicos por el tracto gastrointestinal (TGI).....	- 6 -
3.1.2 Excreción de tóxicos. ....	- 6 -
3.1.3 Transporte de los tóxicos por la sangre y la linfa. ....	- 8 -
3.2 Parámetros hematológicos de importancia en toxicidad. ....	- 9 -
3.3 Estudios de toxicidad en ratones de laboratorio .....	- 10 -
3.4 <i>Calea urticifolia</i> (Juanislama).....	- 11 -
3.5 Antecedentes de estudios de <i>Calea urticifolia</i> .....	- 14 -
IV. METODOLOGÍA.....	- 15 -
4.1 Generalidades del estudio.....	- 15 -
4.1.1 Ubicación del área de estudio .....	- 15 -
4.1.2 Preparación de la muestra vegetal.....	- 15 -
4.1.3 Obtención de extracto seco clorofórmico de <i>Calea urticifolia</i> .....	- 15 -
4.1.4 Animales de experimentación.....	- 15 -
4.1.5 Administración de sustancias .....	- 16 -
4.1.6 Observaciones Clínicas .....	- 16 -
4.2 Estudios de toxicidad.....	- 17 -
4.2.1 Pruebas preliminares .....	- 18 -
4.2.2 Estudio de toxicidad a dosis continua de 90 días. ....	- 18 -
4.3 Exámenes hematológicos y Bioquímica clínica .....	- 19 -
4.4 Sacrificio y necropsias. ....	- 20 -
4.5 Exámenes histopatológicos. ....	- 21 -
4.6 Análisis estadístico. ....	- 21 -
V. RESULTADOS .....	- 22 -
5.1 Observaciones clínicas.....	- 22 -
5.2 Peso corporal.....	- 22 -
5.3 Bioquímica sanguínea.....	- 23 -

5.4 Hematología sanguínea.....	- 25 -
5.4.1 Glóbulos rojos.....	- 25 -
5.4.2 Plaquetas.....	- 25 -
5.4.3 Glóbulos blancos. ....	- 25 -
5.5 Peso de órganos .....	- 27 -
5.6 Histopatología. ....	- 28 -
VI. DISCUSIÓN.....	- 31 -
VII. CONCLUSIONES .....	- 35 -
VIII. RECOMENDACIONES .....	- 36 -
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	- 37 -
X. ANEXOS.....	44

## INDICE DE TABLAS

Tabla N ° 1. Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación.....	17
Tabla N° 2. Peso corporal en gramos.....	23
Tabla N°3. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela con respecto al control a partir de los valores promedio de cada parámetro bioquímico.....	24
Tabla N° 4. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela con respecto al control a partir de los valores promedio de cada parámetro hematológico.....	26
Tabla N° 5. Peso de órganos en gramos.....	28



## INDICE DE FIGURAS

Fig.1 <i>Calea urticifolia</i> .....	11
Fig. 2 Ratón de laboratorio sano .....	16
Fig. 3 Canulación por vía intragástrica.....	16
Fig. 4 Esquema metodológico del estudio de toxicidad .....	19
Fig. 5 Toma de muestra de sangre seno retro-orbital .....	20
Figura 6. Comparación de cortes histológicos de hígado de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de <i>C. urticifolia</i> A. Hígado sin alteración. B. Hígado con dilatación y congestión vascular (1) e infiltrado inflamatorio crónico (2) en grupo hembra tratamiento.....	29
Figura 7. Comparación de cortes histológicos de estómago de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de <i>C. urticifolia</i> A. Estómago sin alteraciones. B. Estómago con acúmulos de linfocitos (1) en hembras tratamiento.....	29
Figura 8. Comparación de cortes histológicos de intestino de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de <i>C. urticifolia</i> . A. Intestino sin alteraciones. B. Intestino con acúmulos linfoides (1) en hembras.....	29
Figura 9. Comparación de cortes histológicos de riñón de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de <i>C. urticifolia</i> . A. Riñón sin alteraciones. B. Riñón con focos de infiltrado inflamatorio crónico en hembras tratamiento.....	30
Figura 10. Comparación de cortes histológicos de pulmón de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de <i>C. urticifolia</i> . A. Pulmón sin alteración. B. Pulmón con discreto infiltrado inflamatorio en ambos sexos tratados.....	30
Figura 11. Comparación de cortes histológicos de bazo de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de <i>C. urticifolia</i> . A. Bazo sin alteración. B. Bazo con dilatación de la pulpa blanca y congestión de pulpa roja en ambos sexos tratados.....	30

## RESUMEN

El estudio completo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Utilizando 30 ratones albinos suizos de la cepa NIH provenientes del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA), con peso entre 20-25g, mantenidos a una temperatura y humedad relativa controlada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y entre 50-60% respectivamente, con ciclo de luz - oscuridad de 12/12 horas, permaneciendo 5 animales por jaula.

El estudio de toxicidad se efectuó según lo establecido en las guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC 1998) y lo establecido en las guías 408 y 420 de la OECD (1998, 2001). Administrándose diariamente el extracto clorofórmico de *Calea urticifolia* a dosis de 300 mg/kg de peso corporal empleando una cánula intragástrica, observándose los signos de toxicidad durante las primeras 4 horas después de la canulación. Finalizando los días de administración, se tomaron muestras de sangre para los análisis de bioquímica clínica y exámenes hematológicos, luego se procedió a la extracción de órganos que fueron procesados por medio de la técnica histopatológica y coloreadas con hematoxilina-eosina.

Los grupos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* manifestaron deshidratación, piloerección, vasoconstricción periférica, disminución de la temperatura corporal y aumento de peso en algunos órganos (hígado, pulmones, bazo y riñón), del mismo modo se presentaron alteraciones en algunos de los parámetros bioquímicos como el colesterol, transaminasa oxalacética y transaminasa pirúvica; también los parámetros hematológicos como hematocrito, volumen corpuscular medio, concentración de hemoglobina corpuscular media, glóbulos blancos y linfocitos mostraron variaciones. En cuanto a la observación de los tejidos algunos de los animales tratados con el extracto mostraron congestión vascular, hiperemia vascular e infiltrado inflamatorio en algunos de los órganos evaluados (hígado, riñones, bazo, intestino y pulmones) por lo que se no se recomienda su utilización para el tratamiento de enfermedades. Siendo los grupos de hembras los que mostraron mayor susceptibilidad a la sustancia estudiada.

## I. INTRODUCCIÓN

La toxicología es la ciencia que se ocupa de los efectos adversos que ejercen las sustancias químicas en organismos vivos, los estudios que se realizan en ésta área son esenciales para la elaboración de pruebas que permitan detectar riesgos, para facilitar la búsqueda de sustancias más inocuas, utilizándose para saber si una sustancia conlleva o no riesgos lo bastante bajos para justificar su utilización. Según Klaassen (s.a) el interés principal de este tipo de investigación es evaluar los efectos tóxicos acumulativos de la exposición duradera a bajas concentraciones de diversas sustancias químicas naturales.

Las plantas medicinales al ser fuentes muy importantes de sustancias con actividades biológicas, deben ser investigadas para poder ser utilizadas con seguridad y racionalmente. La utilización de sus extractos, aceites esenciales, infusiones, compresas, etc., sirven para enfermedades comunes, y en la mayoría de veces son utilizadas por automedicación. La población las utiliza de forma indiscriminada basándose en la creencia de que las plantas carecen de efectos adversos y que no se necesita una dosificación exacta.

*Calea urticifolia* es un planta de la flora salvadoreña utilizada en la medicina tradicional a la que se asocian propiedades para el tratamiento del dolor, artritis, fiebre, cáncer, diabetes, entre otros (González 2002). Otros autores han demostrado el efecto hipolipemiante, antiinflamatorio e hipoglucemiante por su actividad secretagoga de insulina en células  $\beta$  pancreática en ratas (Ortiz 2011). Han confirmado además que esta especie vegetal posee actividad anticancerígena contra leucemia, cáncer de colon y melanomas (Yamada *et al* 2004, Nakagawa *et al* 2005). *Calea urticifolia* es una especie profundamente estudiada desde el punto de vista químico (Borges del Castillo *et al* 1981, Leonor 1980, Matsuura *et al* 2005, Yamada *et al* 2004, Zenaide *et al* 1980), pero carece de un estudio de su extracto completo que determine sus efectos adversos sobre la salud de la población que la utiliza sin dosificación y por tiempo indefinido.

No menos importante, es el hecho que, en los países como el nuestro, que posee una rica flora y una valiosa tradición popular en la utilización de plantas medicinales, el uso de estas terapias sobrevive de una forma muy auténtica y por lo tanto asociada al empirismo en la mayoría de los casos; lo que sin lugar a dudas no deja de ser preocupante, en tanto que es una especie vegetal dotada químicamente de compuestos potencialmente tóxicos.

*C. urticifolia* debe sus propiedades farmacológicas principalmente a la presencia de sesquiterpenlactonas (Matsuura *et al* 2005), un grupo de sustancias químicas muy abundantes en la familia de las compuestas, aunque se han encontrado en otras pocas plantas de familias como magnoliáceas, umbelíferas y lauráceas (Martínez 2011), dichas sustancias han sido consideradas como las responsables de efectos tóxicos neurológicos y en músculo cardiaco (Robles *et al* 1995; Alastair *et al* 1994). Nos encontramos entonces, con el hecho que *C. urticifolia*, es una especie

químicamente dotada de compuestos que si bien, han sido ampliamente reportados por su actividad biológica en el tratamiento de múltiples trastornos, también han sido reportados como responsables químicos de efectos toxicológicos.

En el presente trabajo de investigación se evalúan las características tóxicas del extracto clorofórmico de *Calea urticifolia* por medio de ensayos de toxicidad subcrónica, para determinar su efecto toxicológico en ratones de laboratorio, ya que, ésta planta contiene una gran variedad de compuestos químicos que han sido estudiados previamente de forma separada, no obstante, no se encuentran estudios toxicológicos del extracto completo de esta planta.

El estudio de toxicidad se realizó según lo establecido en las guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC 1998) y lo establecido en las guías 408 y 420 de la OECD (1998, 2001). Administrando diariamente el extracto clorofórmico de *Calea urticifolia* a dosis de 300 mg/kg de peso corporal con una cánula intragástrica, se observaron los signos de toxicidad durante las primeras 4 horas después de la canulación. Al finalizar los días de administración se tomaron muestras de sangre con la que se hicieron los análisis de bioquímica clínica y exámenes hematológicos, también se realizó la técnica histopatológica en algunos de los órganos que permitieron observar la presencia o ausencia de lesiones en éstos como consecuencia de la administración del extracto de *C. urticifolia*.

## II. OBJETIVOS.

### 2.1 General.

Determinar el efecto toxicológico del extracto clorofórmico de *Calea urticifolia* en ratones de laboratorio.

### 2.2 Específicos.

- Evaluar las características tóxicas del extracto clorofórmico de *Calea urticifolia* por ensayos de toxicidad aguda.
- Determinar el efecto toxicológico del extracto clorofórmico de *Calea urticifolia* por medio de la prueba de toxicidad por administración continua (90 días) vía oral en ratones de laboratorio.

### III. MARCO TEÓRICO.

#### 3.1 Toxicología y conceptos generales.

La toxicología es el estudio de los venenos o, en una definición más precisa, la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición de agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones. La distribución de una sustancia dentro del organismo es un proceso dinámico que depende de las velocidades de absorción y eliminación, así como del flujo sanguíneo en los diferentes tejidos y de las afinidades de éstos por la sustancia. Las moléculas hidrosolubles pequeñas no cargadas, los cationes monovalentes y la mayoría de los aniones se difunden con facilidad y acaban por conseguir una distribución relativamente uniforme por todo el cuerpo (Silbergeld *et al s.a*).

Según el autor antes citado, la absorción se define como la cantidad y velocidad con la que una sustancia pasa al compartimento intravascular. La vía de administración de la sustancia (oral, intravenosa, cutánea, subcutánea, intramuscular, rectal, etc.) es el principal determinante de la fracción de sustancia que alcanza la circulación sistémica y de la velocidad de absorción (Silbergeld *et al s.a*).

La biotransformación es un proceso que lleva a una conversión metabólica de los compuestos xenobióticos (Sustancias extrañas al organismo: fármacos, sustancias químicas industriales, venenos presentes en la naturaleza y los contaminantes del medio ambiente) presentes en el organismo. Suele denominarse también metabolismo de xenobióticos. Por regla general, el metabolismo convierte los xenobióticos liposolubles en grandes metabolitos hidrosolubles que pueden excretarse con facilidad, ésta biotransformación se realiza principalmente en el hígado. Todos los xenobióticos captados en el intestino son transportados al hígado por un único vaso sanguíneo (la vena porta). Cuando se capta en pequeñas cantidades, una sustancia extraña puede metabolizarse completamente en el hígado antes de llegar a la circulación general y a otros órganos (Silbergeld *et al s.a*).

Entre biotransformación y toxicidad hay una relación compleja. Puede entenderse la biotransformación como un proceso necesario para la supervivencia. Protege al organismo de la toxicidad impidiendo que se acumulen en él sustancias nocivas. Sin embargo, en ese proceso pueden formarse, como productos intermedios, metabolitos reactivos que son potencialmente nocivos. Este fenómeno se denomina activación metabólica. De esta manera, la biotransformación puede también inducir toxicidad. Metabolitos intermedios oxidados que no se conjugan pueden unirse a estructuras celulares y dañarlas (Silbergeld *et al s.a*).

Las familias más comunes de las enzimas involucradas en el metabolismo de los fármacos son las enzimas citocromo P450 (CYP), uridina difosfato glucuronosiltransferasa (UGT) y N-acetiltransferasa (NAT). La función primaria de las enzimas hepáticas es doble: el metabolismo

de los compuestos endógenos, como los esteroides, y la desintoxicación de compuestos exógenos, como los fármacos. Los CYP son una superfamilia multigénica de enzimas que se encuentran principalmente en el hígado, pero que también se encuentran en el tracto gastrointestinal, pulmones y riñones en menor grado. Las isoenzimas individuales se componen de tres familias principales (CYP1, CYP2 y CYP3), con isoenzimas específicas implicadas en el metabolismo hepático de la mayoría de los fármacos: CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 y CYP3A4 (Wrighton 1992).

### **3.1.1 Absorción de tóxicos por el tracto gastrointestinal (TGI).**

Son muchos los factores que influyen en la velocidad de absorción de tóxicos en las diversas partes del TGI (Silbergeld *et al* s.a):

- Las propiedades fisicoquímicas de los tóxicos, especialmente el coeficiente de partición de Nernst y la constante de disociación; en el caso de las partículas es importante su tamaño —a menor tamaño, mayor solubilidad.
- La cantidad de alimentos presente en el TGI (efecto de dilución).
- El tiempo de permanencia en cada parte del TGI (desde unos minutos en la boca hasta una hora en el estómago y muchas horas en el intestino).
- La superficie de absorción y la capacidad de absorción del epitelio.
- El pH local, que rige la absorción de tóxicos disociados; en el pH ácido del estómago se absorben con más rapidez los compuestos ácidos no disociados.
- El peristaltismo (movimiento intestinal por acción de los músculos) y el flujo sanguíneo local.
- Las secreciones gástricas e intestinales, que transforman los tóxicos en productos más o menos solubles; la bilis es un agente emulsionante que produce complejos más solubles (hidrotropía).
- La exposición combinada a otros tóxicos, que puede producir efectos de sinergia o de antagonismo en los procesos de absorción.
- La presencia de agentes complejantes/quelantes.
- La acción de la microflora del TGI (alrededor de 1,5 kg), unas 60 especies distintas de bacterias que pueden biotransformar los tóxicos.

### **3.1.2 Excreción de tóxicos.**

El principal órgano excretor es el riñón, la excreción es la salida del organismo de una sustancia y de sus productos de biotransformación. Algunas sustancias, especialmente los ácidos de alto peso molecular, se excretan con la bilis. Una fracción de las sustancias biliares excretadas puede reabsorberse en el intestino. Este proceso, denominado circulación enterohepática, es habitual en las sustancias conjugadas tras la hidrólisis intestinal del conjugado (Silbergeld *et al* s.a).

Los efectos sobre la función renal de los fármacos nefrotóxicos pueden explicarse por sus efectos funcionales y estructurales en los glomérulos, los vasos renales y/o células epiteliales tubulares, así como por la reducción del flujo sanguíneo renal y la inducción de inflamación (López-Novoa 2013).

El resultado final de los tres procesos renales (filtración glomerular, reabsorción y secreción tubular) es la formación de orina. Así, los riñones a través de la regulación de estos procesos varían las características físico químicas de la orina que se excreta con el objetivo de mantener la homeostasis del organismo. El mantenimiento de una función renal normal asegura la eliminación de sustancias potencialmente tóxicas para el organismo. Así, la afección de la función renal puede resultar en incrementos en sangre de desechos que deben ser eliminados por el riñón como la urea y la creatinina (síndrome urémico). Asimismo, la normalidad de la función renal asegura el mantenimiento de la calidad y cantidad de los líquidos corporales (Cavilla 2016).

Funciones del sistema urinario (Cubillos y Paredes 2006):

- a) Mantener constante la composición de la sangre, mediante la depuración del medio interno y la mantención del equilibrio hidrosalino.
- b) Eliminar cantidades excesivas de agua provenientes de la sangre.
- c) Excreción de desechos nitrogenados: urea, ácido úrico, alantoína, amoníaco, ácido hipúrico.
- d) Eliminación de sales inorgánicas que derivan en su mayoría de los alimentos.
- e) Recuperación del bicarbonato sódico actuando sobre el equilibrio ácido-base.
- f) Balance hidrosalino (eliminando o reteniendo agua y electrolitos como  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ ).
- g) Producir un factor esencial para la eritropoyesis y la renina responsable de la hipertensión.

La funcionalidad renal es evaluada rutinariamente en la clínica de pequeños animales a través del análisis de orina. Se trata de una maniobra sencilla que permite iniciar la evaluación de la funcionalidad renal y el medio interno. Para la evaluación de la función renal, los resultados del análisis de orina son complementados inicialmente con las determinaciones de las concentraciones de desechos metabólicos en sangre (urea y creatinina) y con la clínica del paciente, entre otros (Cavilla 2016).

De la misma forma el hígado, al participar en la metabolización de sustancias, es susceptible al daño que pueden producir las hierbas medicinales, algunas de las cuales reportando daño hepatocelular, hepatitis autoinmune, hepatitis fulminante, hepatitis crónica y cirrosis (Jorge y Jorge 2005). El hígado metaboliza estas sustancias a través del citocromo P450. En la biotransformación se producen metabolitos que reaccionan con macromoléculas y dañan células hepáticas, o generan neoantígenos que desencadenan daño inmunológico (Watson 2003).



Las células hepáticas contienen diversas enzimas que oxidan los xenobióticos. Por lo general, esa oxidación activa el compuesto y lo hace más reactivo que la molécula precursora. En la mayoría de los casos, el metabolito oxidado vuelve a ser metabolizado por otras enzimas en una segunda fase. Esas enzimas conjugan el metabolito con un sustrato endógeno, de manera que la molécula se hace más grande y más polar, lo cual facilita la excreción. También en otros órganos como el pulmón y el(los) riñón(es) hay enzimas que metabolizan los xenobióticos. En esos órganos pueden desempeñar funciones específicas y cualitativamente importantes en el metabolismo de determinados xenobióticos. A veces metabolitos formados en un órgano se metabolizan aún más en otro. También pueden participar en la biotransformación las bacterias intestinales (Silbergeld *et al* s.a).

### **3.1.3 Transporte de los tóxicos por la sangre y la linfa.**

Los tóxicos llegan a la sangre, la linfa u otros fluidos corporales. La sangre es el principal vehículo de transporte de los tóxicos y sus metabolitos. La sangre es un órgano líquido en circulación que lleva a las células el oxígeno y las sustancias vitales que necesitan y extrae de ellas los productos de desecho del metabolismo. Contiene asimismo componentes celulares, hormonas y otras moléculas que intervienen en muchas funciones fisiológicas (Silbergeld *et al* s.a).

La sangre es una mezcla de una fase líquida (plasma, 55%) y células sólidas (45%). El plasma contiene proteínas (albúminas, globulinas, fibrinógeno), ácidos orgánicos (láctico, glutámico, cítrico) y muchas otras sustancias (lípidos, lipoproteínas, glicoproteínas, enzimas, sales, xenobióticos, etc.). Los componentes celulares de la sangre son los eritrocitos (Er), los leucocitos y las plaquetas (Silbergeld *et al* s.a).

Para la formación de eritrocitos se necesita la mayoría de las hormonas, sobre todo la eritropoyetina (que se produce en el riñón), la testosterona (esta es la razón por la que, los varones tienen más eritrocitos que las mujeres), y las hormonas tiroideas. Por lo anterior, aquellos con insuficiencia renal, endocrina, o ambas, como hipotiroidismo o insuficiencia suprarrenal, presentan anemia (Pérez y Gómez 2009).

Los tóxicos se absorben en forma de moléculas y de iones. En el pH de la sangre, algunos tóxicos forman partículas coloidales, que sería la tercera forma presente en el líquido. Las moléculas, los iones y los coloides de tóxicos se pueden transportar por la sangre de diversas maneras (Silbergeld *et al* s.a):

- Uniéndose física o químicamente a los componentes de la sangre, sobre todo a los Er.
- Disolviéndose físicamente en el plasma en estado libre.
- Uniéndose a uno o varios tipos de proteínas plasmáticas, formando compuestos con los ácidos orgánicos o enlazándose con otras fracciones del plasma.

La desintoxicación de los xenobióticos y el metabolismo de los fármacos se producen principalmente en el hígado y consta de dos fases. La Fase I se lleva a cabo por cientos de enzimas del citocromo P450 (CYP450s) y otras que contienen flavina-monooxigenasas (MOM) que añaden o exponen a un grupo funcional polar para compuestos lipofílicos. La Fase II, que consiste en las reacciones de conjugación que ayudan a eliminar los productos de la Fase I del cuerpo, se lleva a cabo por glutatión-S-transferasa (GST), UDP-glucuronosyltransferase (UGT) y los esteroides y ácidos biliares-sulfotransferasas. Además de actuar en compuestos exógenos, en la Fase I y Fase II las enzimas también actúan sobre compuestos endógenos, tales como esteroides, ácidos biliares y ácidos grasos, así como las drogas (Hwang-Verslues y Sladek 2010).

Las hormonas desempeñan un papel decisivo en la actividad de los principales sistemas fisiológicos del organismo. Son de especial importancia en la regulación del crecimiento, desarrollo, metabolismo, mantenimiento de un medio interno estable y los procesos reproductores. El colesterol es el punto de partida de la biosíntesis de esteroides, la biosíntesis de esteroides en la corteza suprarrenal por modificación del colesterol generando hormonas corticales. La mayor parte de reacciones que implican al colesterol en la activación de hormonas se relacionan con enzimas del citocromo P-450, que se encuentran situadas en las crestas mitocondriales y el retículo endoplasmático (Pocock y Richards 2005).

### **3.2 Parámetros hematológicos de importancia en toxicidad.**

Los eritrocitos, al igual que el resto de las células de la sangre, proceden de una célula indiferenciada (célula madre o primitiva pluripotencial). El progenitor eritroide más primitivo que se ha cultivado es el denominado unidad formadora de colonias tempranas eritroides (UFCTe). Tras ella se produce la unidad formadora de colonias eritroides (UFCe). Ambas son sensibles a la eritropoyetina y a otros factores de crecimiento. Luego se diferencian en proeritroblastos, normoblastos, reticulocitos (tras eliminar el núcleo) y eritrocitos. Este proceso ocurre en el adulto en la médula ósea. En el feto se produce en el hígado, bazo y la médula ósea a partir del cuarto mes (Obeso *et al* 2014).

Para cumplir su función transportadora de oxígeno, los eritrocitos necesitan incorporar hemoglobina a su citoplasma. Para ello van acumulando cadenas de globina progresivamente desde el estado de proeritroblasto. Además, necesitan sintetizar el grupo hem, donde está incorporado el hierro (cada hemoglobina tiene 4 grupos hem y cuatro cadenas de globina). En los hematíes normales del adulto, la hemoglobina A (alfa<sub>2</sub>-beta<sub>2</sub>) constituye el 97%, casi un 3% de hemoglobina A<sub>2</sub> (alfa<sub>2</sub>-delta<sub>2</sub>) y menos de un 1% de hemoglobina fetal o F (alfa<sub>2</sub>-gamma<sub>2</sub>) (Obeso *et al* 2014).

El hematocrito informa el volumen que ocupan los glóbulos rojos como porcentaje del total de la sangre y se mide centrifugando un pequeño volumen de sangre en un tubo cilíndrico y midiendo

la relación entre la altura de la columna de hematíes con respecto a altura total de la columna (Bioquímica Clínica Sangre y orina s.a).

Los índices hematimétricos son parámetros calculados que relacionan el número total de eritrocitos, el hematocrito y la concentración de hemoglobina. Son útiles para clasificar los diferentes tipos de anemias (Bioquímica Clínica Sangre y orina s.a):

- El volumen corpuscular medio (MCV) = hematocrito/nº hematíes. Evalúa el volumen medio de los glóbulos rojos. Pueden presentarse alteraciones hematológicas con eritrocitos de menor volumen (microcíticas) o de mayor volumen (macrocíticas).
- La hemoglobina corpuscular media (CMH) = concentración de hemoglobina/nº hematíes. Evalúa la hemoglobina contenida en cada glóbulo rojo.
- La concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) = conc. hemoglobina/hematocrito. Evalúa la hemoglobina contenida en todos los eritrocitos.

### 3.3 Estudios de toxicidad en ratones de laboratorio

Todos los productos químicos, drogas y sustancias naturales tienen el potencial de ser tóxicos si la dosis es lo suficientemente alta. Un principio de la toxicología es que los efectos producidos por un compuesto en animales de laboratorio, si son evaluados de manera apropiada, son aplicables a seres humanos con base en dosis por unidad de superficie corporal, los efectos tóxicos en seres humanos se encuentran dentro del mismo límite de los que se observan en animales de laboratorio. La exposición de animales de experimentación a agentes tóxicos en dosis altas es un método válido para descubrir posibles peligros en seres humanos, creando sistemas de modelos experimentales, éstas pruebas de toxicidad evalúan indirectamente los procesos de absorción, metabolismo y excreción. Éstos estudios se realizan con estándares éticos, de calidad y de investigación y están diseñados para caracterizar los efectos tóxicos que una sustancia puede causar en diversos órganos blanco (Klaseen y Watkins 2001).

Lagarto *et al* (2005) evaluaron el potencial tóxico de un extracto acuoso de *Ocimum tenuiflorum* mediante un ensayo agudo y un examen subcrónico por vía oral en ratas, sin obtener signos tóxicos ni mortalidad como consecuencia de la administración del extracto de prueba, lo que certifica la seguridad para obtener una formulación hipoglucemiante a partir de esta planta, que fue la razón por la que evaluaron su toxicidad en primer lugar.

En una evaluación de la toxicidad aguda y subcrónica del extracto hidroetanólico de semillas de *Parinari curatellifolia* (Chrysobalanaceae) en ratas se mostró la actividad hipoglucémica y alta capacidad para reducir factores de riesgo cardiovascular. El extracto en dosis bajas y moderadas no provocó efectos tóxicos en los tejidos de los animales. Pero las dosis más altas podrían causar daño a los riñones, llevando a una insuficiencia renal y efectos tóxicos en el corazón durante el tratamiento a largo plazo. Por lo tanto, las funciones del corazón y los riñones deben ser

controlados en el tratamiento a largo plazo de las enfermedades con altas dosis de *P. curatellifolia* (Ogbonnia *et al* 2009).

*Smallanthus sonchifolius* es una especie tradicionalmente utilizada como antidiabético en varios países del mundo, incluyendo Brasil. Su acción hipoglucemiante recientemente se ha demostrado en ratas normales y diabéticas. Sin embargo, se carecía de estudios sobre la seguridad de consumo oral prolongado de extractos de sus hojas. Por lo tanto, Barbosa de Oliveira *et al* (2011) evaluaron la toxicidad de dosis repetidas de tres extractos de sus hojas: extracto acuoso como una infusión de té; el extracto de hojas de enjuague, el cual es rico en sesquiterpenolactonas; y un extracto polar a partir de hojas sin tricomas, que carece de los sesquiterpenolactonas, pero es rico en ácidos clorogénicos. La toxicidad de cada extracto se evaluó en un estudio de toxicidad de dosis repetidas en ratas Wistar durante 90 días. Resultando con daño renal asociado a un aumento de los niveles de glucosa en sangre después de la administración oral prolongada del extracto acuoso. Esto sugiere que el efecto hipoglucemiante observado después del tratamiento durante 30 días en un estudio anterior es reversible y fue probablemente el resultado de una lesión renal causada por la toxicidad de *S. sonchifolius*. Debido a que se detectaron las sesquiterpenolactonas en dos extractos, existe una fuerte evidencia de que estos son los principales compuestos tóxicos. Con base a los resultados, no se recomienda el uso oral de *S. sonchifolius* para tratar la diabetes.

### 3.4 *Calea urticifolia* (Juanislama)

Se reportan 262 especies de *Calea* (Fig. 1), plantas muy distribuidas en el mundo, crecen en zonas tropicales del continente americano desde México hasta el Brasil, países que han avanzado en la investigación de estas especies, consideradas como promisorias y de variados usos por las diferentes actividades farmacológicas que se les atribuyen como: antiinflamatorias, antimicrobianas (Borges del Castillo *et al* 1981), antiulcerantes, tratamiento terapéutico del hígado (Steinbeck *et al* 1997) antitripanosómicas, antiamebianas (Zenaide *et al* 1980), etc.



Fig.1 *Calea urticifolia*

(Fuente: Comisión Nacional para el Desarrollo de los Pueblos Indígenas).

## **Distribución**

Está ampliamente distribuida, podemos encontrarla desde Panamá hasta el norte de México (Rzedowski & Calderón, 2008). Es una planta de clima cálido y semicálido, asociada a ecosistemas de selva baja caducifolia, bosques tropicales subcaducifolio, subperenifolio, perenifolio y bosques de encino y pino. Normalmente se encuentra en terrenos abiertos y a orillas de caminos (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana 2009). Es una planta muy común en diferentes zonas del país, tanto en lugares cálidos como en los templados, crece en forma silvestre (Toledo 2002).

## **Descripción Botánica**

Es un arbusto o planta perenne que llega a medir hasta 3.5 m de alto, posee tallos cortamente pilosos o hirsutos, hojas opuestas, peciolo hasta de 8 mm de largo, lamina ovada o deltoide a veces lanceolada de 3 (5)mm a 11 (14)mm de largo de 1(2) a 5(7) mm de ancho, aguda en el ápice, redondeada a truncada y algunas veces abruptamente cuneada en la base, margen cerrado o en ocasiones crenado o sub entero, de textura membranácea a cartácea, verde oscura, por lo general rasposa y rugosa en el haz, retículo-nervada y cortamente pilosa o vilosa en el envés, cabezuelas a menudo muy numerosas, sus hojas son lanceoladas de 3 a 8 mm de largo, amarillentas, elípticas o lanceolado-ovadas, flores de liguladas de 3 a 8, fértiles, sus laminas oblanceoladas a obovadas, amarillas, a veces de color crema (Rzedowski & Calderón 2008).

## **Actividad Biológica**

Los extractos acuosos y etanólicos de la planta entera, demuestran actividad contra *E. coli*, el extracto acuoso de las hojas contra *S. aureus*. El extracto acuoso y el etanólico de las hojas fueron tóxicos para peces y dependiendo de la concentración del mismo, así será su toxicidad (Toledo 2002).

El extracto etanólico de *Calea urticifolia*, mostró tener un efecto hipoglucemiante e hipolipemiante, así como antiinflamatorio en un proceso derivado del tejido adiposo, a través de la inhibición de la secreción de TNF- $\alpha$  y finalmente presentó la capacidad de incrementar los niveles de insulina circulante en ratas (Ortiz 2011).

## **Usos Atribuidos por la Población**

Es utilizada para cólicos, dolores de estómago, ulceraciones, heridas infectadas, hiperacidez, cáncer, diabetes, artritis, enfermedades hepáticas, de los riñones, diarreas, anginas, bronquitis, empachos, para cicatrizar heridas, colitis, úlceras gastritis, como digestivo, preventivo del cáncer, para hemorroides, tiene propiedades antibacterianas, algunas personas la toman para bajar de peso, pero esto es parte de su toxicidad, ya que puede destruir los glóbulos rojos (Toledo 2002).

## **Composición Química**

Las hojas y el tallo contienen: alcaloides, taninos, lactonas y sesquiterpénicas; al tallo contiene además flavonoides. Se han reportado derivados sesquiterpénicos de atripliciólido, 6-metoxiisoeugenol, timol, compuestos alquénicos, 4-6-dimetoxi-2-isobutiroxifenol. Se han reportado derivados sesquiterpénicos de atripliciólido, sesquiterpenos 2F, 2 G, 2H, 4<sup>a</sup>,4B, 4C, 4D y 4E, caleina A y D, caleaurticólido, germacreno C y D; timolisobutirato, g-metoxiisoeugenol timol, 4,6-dimetoxi – 2 - isobutiroxifenol y compuestos alquénicos (Toledo 2002).

### **Sesquiterpenlactonas**

Existen estudios experimentales que validan la eficacia de compuestos químicos provenientes de extractos naturales, un grupo de estos compuestos son las sesquiterpenlactonas, que son alrededor de 3000 sustancias con estructuras conocidas, caracterizadas por presentar sabores amargos al paladar. Estas sustancias se encuentran en hongos, briofitos; pero mayoritariamente en especies de la Familia Asteraceae, donde se localizan frecuentemente en pelos secretores situados alrededor de la hoja, tallo y brácteas de la inflorescencia a menudo en los aquenios (Lock 1994, Martínez 2011).

Existen reportes sobre el envenenamiento del ganado por el forraje que contiene plantas amargas de la familia de Asteraceae, además de sus efectos deletéreos sobre animales domésticos, se generaliza que muchas plantas de esta familia que contienen sesquiterpenlactonas son también tóxicas para los animales salvajes (Cornell University, 2005).

Las sesquiterpenlactonas son derivadas biogenéticamente de los sesquiterpenos, predominantes en la familia Asteraceae. Son sustancias amargas que se encuentran en todas las partes de las plantas en concentraciones que varían entre 0.01 y 8% del peso seco, siendo las concentraciones mayores generalmente en las hojas, son bastante solubles en cloroformo y en éter etílico. Presentan gran importancia por la variada acción biológica que han demostrado: acción citotóxica, antitumoral, analgésica, inhibidoras del crecimiento de bacterias, etc. (Scherriber k. 1963).

Las sesquiterpenlactonas se clasifican comúnmente de acuerdo con el tipo de núcleo que posean y con la terminación ólido, que indica la existencia de un grupo funcional lactónico; por ejemplo las que tienen el núcleo tipo Germacrano se las llama Germacranólidos; las que tienen el núcleo tipo Eremofilano son Eremofilanólidos, las que contengan núcleo tipo Eudesmano son Eudesmanólidos, Heliangólidos, Michampanólidos, etc. (Martínez 2011).

### 3.5 Antecedentes de estudios de *Calea urticifolia*.

En 2004 se aislaron del extracto acetónico de las hojas *C. urticifolia* siete sesquiterpenlactonas denominadas como: Calealactona A-C, 2,3-epoxi-calealactona A, Caleina D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina, evaluándose frente a células U937 (células humanas con leucemia) por medio del método del MTT, obteniendo resultados que confirman su potente actividad citotóxica sobre las células tratadas principalmente de la sesquiterpenlactonas 2,3-epoxijuanislamina (Yamada *et al* 2004).

En otro estudio del extracto acetónico de las partes aéreas de *C. urticifolia* se obtuvieron seis sesquiterpenlactonas: Arucanólido, Calealactona A, 2,3-epoxi-calealactona A, Calealactona B, 2,3-epoxi-juanislamina y Partenolida, las cuales fueron evaluadas frente a dos líneas celulares SW480 (células de adenocarcinoma de colon) y HL60 (células de leucemia promielocítica), donde el Arucanólido tuvo un efecto citotóxico marcado a menos de 10  $\mu$ M frente a ambas líneas celulares y su actividad citotóxica fue mayor que la partenolida utilizada como control positivo, además se demostró una potente actividad inductora de apoptosis de todas las sesquiterpenlactonas aisladas teniendo un rol crucial en el factor inductor de apoptosis (factor nuclear-kB) en las dos líneas celulares tumorales humanas utilizadas (SW480 y HL) (Nakagawa *et al* 2005).

Matsuura *et al* (2005) aislaron siete sesquiterpenlactonas de las partes aéreas de *C. urticifolia* (Calealactona A, Calealactona B, Calealactona C, 2,3-epoxicalcalactona A, Caleina D, Juanislamina y 2,3-epoxijuanislamina) las cuales fueron evaluadas frente a células de melanoma de ratón B16 (4A5), demostrando un efecto antimelanogénesis potente en células de melanoma B16, provocando también una disminución significativa en la enzima tirosinasa, obteniendo los mejores resultados con la 2,3-epoxyjuanislamina a concentraciones menores de 1  $\mu$ M.

En 2008 (Umeruma *et al* 2008) evaluaron la actividad antioxidante de sesquiterpenlactonas procedentes del extracto acetónico de *C. urticifolia*, en la ruta Nrf2/ARE (Elemento Responsable Antioxidante). Midiendo la actividad de ARE a través del ensayo de transfección y luciferasa, mostrando la sesquiterpenlactona calealactona A como el metabolito secundario aislado más activa frente a la potenciación de la ARE.

El extracto etanólico de *C. urticifolia*, mostró efecto hipoglucemiante, hipolipemiante y antiinflamatorio en el proceso inflamatorio derivado del tejido adiposo, a través de la inhibición de la secreción de TNF- $\alpha$ . Adicionalmente el extracto incrementó los niveles de insulina circulante, lo cual puede interpretarse como actividad secretagoga, es decir, que presenta la capacidad de inducir la secreción de la hormona en la célula  $\beta$  pancreática en ratas (Ortiz 2011).

## IV. METODOLOGÍA

### 4.1 Generalidades del estudio

#### 4.1.1 Ubicación del área de estudio

El estudio se realizó en la Universidad de El Salvador ubicada en 13°43'6" N 89°12'11" O específicamente en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) principalmente en los Laboratorios de Patología y Experimentación Animal.

#### 4.1.2 Preparación de la muestra vegetal.

La recolección de las hojas frescas fue realizada en el Campus Central de la Universidad de El Salvador, a un costado del parqueo de la Facultad de Química y Farmacia, las hojas se secaron a la claridad durante 15 días y se almacenaron en un lugar fresco y seco.

#### 4.1.3 Obtención de extracto seco clorofórmico de *Calea urticifolia*

El extracto clorofórmico de las hojas de *C. urticifolia* fue proporcionado por el Laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia quienes obtuvieron el extracto a partir de las hojas secas y pulverizadas de *C. urticifolia*. Se pesó el total de muestra vegetal colectada y se extrajo por medio de un Soxhlet, hasta el agotamiento de la muestra usando como solvente cloroformo (aproximadamente 3L). Posteriormente se eliminó el solvente por medio del rotaevaporador obteniendo así el extracto seco.

#### 4.1.4 Animales de experimentación.

Se utilizaron 30 ratones (15 de cada sexo) de la cepa NIH, con peso corporal entre 20-25g, de aproximadamente 1 mes de nacidos, todos procedentes del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de CENSALUD, donde se mantuvieron a una temperatura y humedad relativa controlada de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y entre 50 – 60 % respectivamente, con ciclo de luz - oscuridad de 12/12 horas, permaneciendo 5 animales por jaula, y marcados con ácido pícrico para su identificación individual de la siguiente manera:

Ratón 1: Sin marca.

Ratón 2: Marca en cabeza.

Ratón 3: Marca en espalda.

Ratón 4: Marca en cola.

Ratón 5: Marca en pata delantera derecha.

Se verificó el estado de salud de todos los animales mediante un examen clínico antes de cada ensayo. La alimentación consistió en una dieta estándar a base de concentrado peletizado para ratones y agua a voluntad.

El examen clínico consiste en la verificación de la apariencia del ratón (ver fig. 2): pelo sano, sin piloerección ni caída, piel sin enrojecimiento ni palidez evidente, membranas mucosas y ojos sin secreciones anormales, sin salivación, reacción a estímulos (tacto o ruido) y actividad normal, sin deshidratación ni diarrea.





**Fig. 2** Ratón de laboratorio sano

#### **4.1.5 Administración de sustancias**

La vía de administración del extracto clorofórmico de *C. urticifolia* fue por canulación intragástrica, en la cual la anestesia no es necesaria, con el ratón correctamente inmovilizado de manera que la cabeza quede alineada con el cuerpo evitando cualquier movimiento durante el procedimiento (ver fig. 3) en especial movimientos de cabeza. La cánula debe ser insertada empujando la cabeza hacia atrás hasta lograr alinear la boca y el esófago, para luego permitir que esta baje por gravedad (sin empujar) hasta alcanzar una profundidad aproximada de 2 cm, inmediatamente debe vaciarse el contenido de la jeringa.



**Fig. 3** Canulación por vía intragástrica.

#### **4.1.6 Observaciones Clínicas**

Se observaron los animales después de la canulación durante las primeras 4 h, con especial énfasis los primeros 30 minutos. Registrándose el peso corporal una vez por semana (ver anexo 1) y los signos de toxicidad diariamente (descritos en la tabla 1), permaneciendo en observación los animales durante los días de canulación.

La observación diaria de los ratones se registró en una tabla de datos (ver anexo 2) que incluyen las modificaciones del pelo, la piel, los ojos y las mucosas, la frecuencia respiratoria, la circulación sanguínea, la actividad somatomotriz y motora.

Según Silverman (1991), la detección del dolor en roedores no es fácil. Cambios leves en los comportamientos, vocalizaciones, y el uso anormal de ciertas partes del cuerpo, pueden señalar dolor, pero no podemos evaluar su magnitud.

En roedores los indicadores importantes del dolor son el hecho de quedarse acostado, cambios en los pelos y en el brillo de los ojos (Montgomery 1990). Entre los criterios para evaluar condiciones mórbidas y moribundas encontradas en investigaciones oncológicas y toxicológicas, se observan una disminución de la actividad, cambios en el temperamento, nervosidad, una disminución en el consumo de alimentos y agua, vocalizaciones anormales, posturas anormales, la automutilación (Montgomery 1990).

**Tabla N° 1. Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación.**

<b>Parámetro de toxicidad</b>	<b>Descripción.</b>
Apariencia del pelo	Textura, color, caída.
Apariencia de la piel	Enrojecimiento, sequedad, exudación.
Ojos y membranas mucosas	Enrojecimiento, sequedad, secreción anormal.
Ataxia	Pérdida del equilibrio, caminata errática
Parálisis	Pérdida de respuesta en cualquier extremidad
Vasoconstricción periférica	Palidez
Vasodilatación periférica	Enrojecimiento
Pilo-erección	Pelaje erizo
Salivación	Exceso de secreción bucal
Tremores y Convulsiones	Contracción muscular anormal espontánea. Contracción o estiramiento muscular descontrolado.
Respiración	Aumento o disminución en la frecuencia respiratoria.
Deshidratación	Prueba de Robinou: pellizco de la piel, sin el retorno de esta a su posición normal.
Diarrea	Heces blandas o deposición acuosa.
<b>Actividad somatomotriz y motora</b>	<b>Descripción</b>
Actividad Motora	Aumento o disminución de la actividad normal, refleja o no.
Reacción a estímulos	Respuesta al tacto o al ruido

## 4.2 Estudios de toxicidad

El estudio de toxicidad se realizó según lo establecido en las guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación del Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCAC 1998) y lo establecido en las guías 408 y 420 de la Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD 1998, 2001) sobre la toxicidad oral de 90 días y el ajuste de dosis respectivamente.

#### **4.2.1 Pruebas preliminares**

Según el protocolo de la Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD 1998) en su Guideline for Testing of Chemical N° 408, un estudio sub crónico (90 días) a dosis repetidas debe de realizarse a partir de información preliminar recogida de estudios de toxicidad aguda. En este sentido, se llevaron a cabo pruebas de toxicidad aguda según la guía 420 de la OECD. Los resultados obtenidos de las pruebas agudas permitieron clasificar la sustancia de estudio en la categoría 4 de toxicidad que equivale a una DL50 (Dosis Letal Media) mayor que 300 mg/kg, pero menor que 2000 mg/kg, según el Sistema Armonizado para la clasificación de sustancia que causan efectos agudos (OECD, 1998).

De acuerdo a lo anterior y con el objetivo claro de realizar un ensayo sub crónico a dosis repetidas de 90 días, se determinó que la dosis de 300 mg/kg de la sustancia de estudio, es la idónea en tanto que es lo suficientemente baja para asegurar una sobrevivencia del 100% de los animales durante 90 días, pero lo suficientemente alta que permita evaluar los efectos tóxicos por acumulación de dicha especie vegetal.

#### **4.2.2 Estudio de toxicidad a dosis continúa de 90 días.**

Se administró oralmente el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* empleando una cánula intragástrica. Se utilizaron 6 grupos experimentales (3 grupos hembras y 3 grupos machos) a razón de 5 animales por grupo. Se administró diariamente 0.2 ml del extracto de una dosis de 300 mg/kg de peso corporal (detallado en fig. 4).

Los grupos utilizados fueron:

- Controles (C) que recibieron el vehículo (agua destilada con la que se elaboran las diluciones de la sustancia de estudio).
- Tratamientos (T) que recibieron la dosis de 300 mg/kg del extracto en estudio.
- Centinelas (Ce) que recibieron la misma dosis que los tratados (300 mg/kg del extracto en estudio) con la diferencia de que permanecieron en observación sin tratamiento durante catorce días luego de los 90 días del estudio.

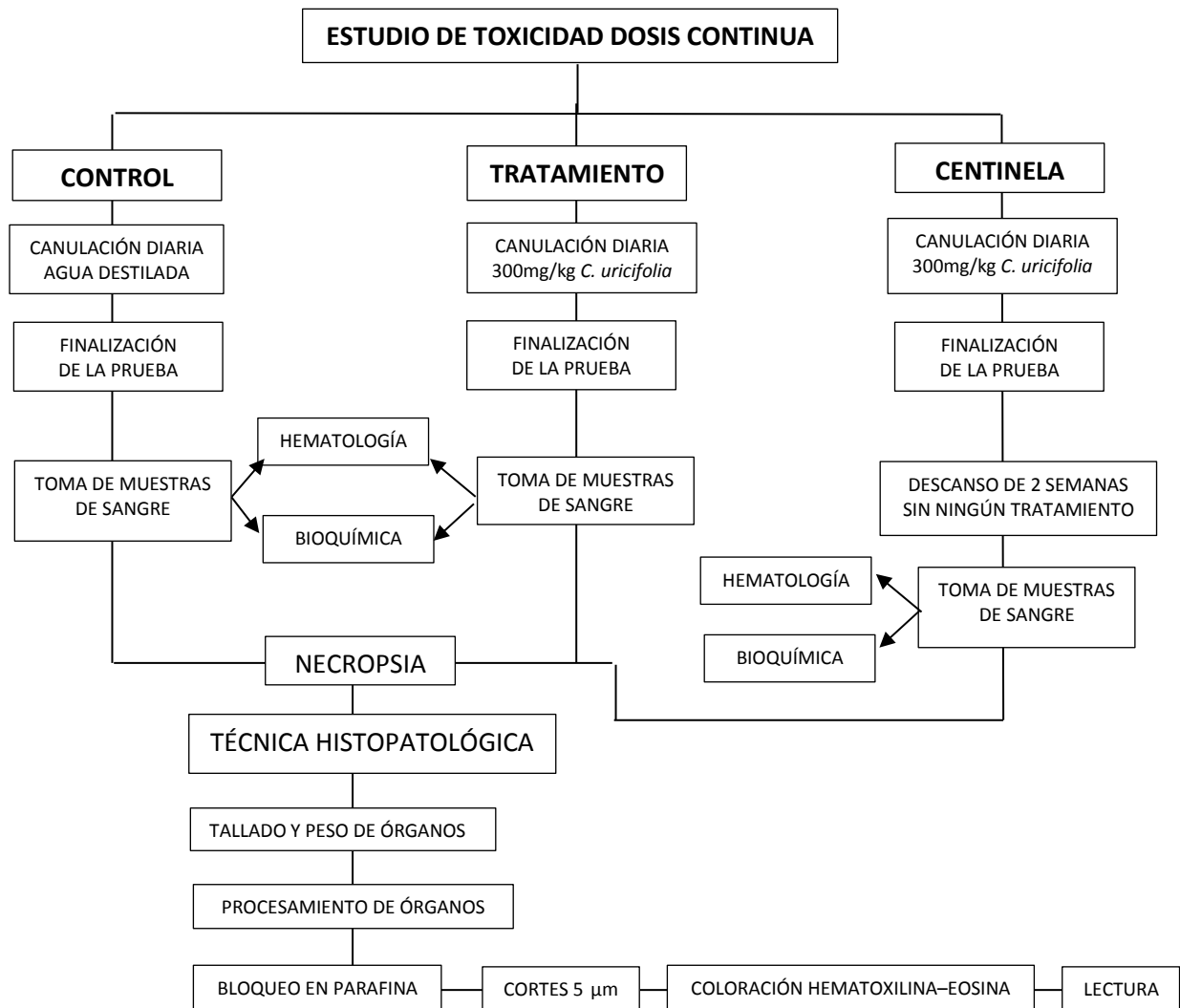


Fig. 4 Esquema metodológico del estudio de toxicidad por administración continua de 90 días del extracto clorofórmico de *C. urticifolia*.

### 4.3 Exámenes hematológicos y Bioquímica clínica

Al finalizar los 90 días de administración, se tomaron muestras de sangre de los animales con el objetivo de realizar los análisis de bioquímica clínica y exámenes hematológicos, a excepción de los animales del grupo centinela, de quienes se realizaron las tomas correspondientes 14 días después.

La toma de sangre se realizó según el Procedimiento Normalizado de Trabajo “Vías de administración y toma de muestras (rata y ratón)” (PROC-NT-002) estandarizado en el Laboratorio de Experimentación Animal de la siguiente forma:

Se sujeta al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración, insertando el capilar tratado con anticoagulante (EDTA, heparina) en el ángulo externo del ojo (2 mm aproximadamente) girando suavemente hasta que la sangre fluya por el mismo (fig.5). Recogiendo la muestra de 0.2 ml en tubos eppendorf y retirar el capilar. Se aplica pomada oftálmica (Lubriform) o azul de genciana al 1% al ojo.



Fig. 5 Toma de muestra de sangre seno retro-orbital.

Se determinaron hemoglobina, hematocrito, recuento diferencial de leucocitos, recuento total de leucocitos y recuento total de eritrocitos, glucosa, alaninoaminotransferasa (ALAT o transaminasa pívurica), aspartatoaminotransferasa (ASAT o transaminasa oxalacética), colesterol, urea, creatinina y bilirrubina. Todas estas determinaciones de hematología y bioquímica sanguínea se realizaron en el Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Rosales con el equipo Beckman Coulter AU480. Los datos obtenidos fueron registrados en una tabla descrita en el anexo 3.

#### **4.4 Sacrificio y necropsias.**

Una vez colectadas las muestras sanguíneas para los exámenes hematológicos y de bioquímica clínica se procedió al sacrificio de los animales por dislocación cervical para efectuar la extracción de los órganos: hígado, corazón, pulmón, bazo, riñón, estómago, intestinos; los cuales fueron examinados macroscópicamente y fijados en solución de formol al 10 %. El grupo centinela permaneció 14 días posteriores al período de administración sin tratamiento alguno, al cabo de los cuales se procedió de igual manera que los grupos anteriores, esto para determinar si existe reversibilidad de los efectos tóxicos si existen.

Las observaciones macroscópicas de los órganos extraídos fueron: apariencia, superficie, consistencia, y color de cada órgano; esto con el fin de observar la presencia o ausencia de lesiones en los órganos. Estos datos se registraron en tablas descritas en el anexo 4.

#### **4.5 Exámenes histopatológicos.**

Los órganos evaluados y preservados en formalina al 10 %, fueron procesados por medio de la técnica histológica para bloques parafinados, cortadas a 5  $\mu\text{m}$  con un micrótopo y después coloreadas con hematoxilina–eosina, para luego ser leídos al microscopio por un patólogo.

#### **4.6 Análisis estadístico.**

Los datos obtenidos fueron estadísticamente evaluados con el software SPSS versión 21. Se utilizó el contraste de Shapiro y Wilks para la prueba de normalidad. Se compararon los resultados obtenidos entre el grupo control y los grupos tratados con el extracto clorofórmico utilizando el análisis T de Student para muestras relacionadas para comparar cambios en peso corporal y el análisis T de Student para muestras independientes para los demás parámetros evaluados, buscando diferencias de medias significativas entre estos dos tratamientos (control y tratamientos).

Se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control sería significativa (\*) cuando  $p < 0,05$ . Todos los resultados están expresados como la Media  $\pm$  la Desviación Estándar de los grupos experimentales.

## V. RESULTADOS

### 5.1 Observaciones clínicas

Las observaciones clínicas diarias a los grupos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* mostraron alteraciones en algunos de los parámetros toxicológicos evaluados, como deshidratación, piloerección, vasoconstricción periférica, disminución de la temperatura corporal desde la segunda semana de tratamiento en el grupo de hembras tratadas con el extracto. En cuanto a los machos tratados, estas alteraciones fueron percibidas desde la tercera semana de tratamiento, además de una aceleración respiratoria.

Entre las semanas 5 y 7, los grupos tratados con la sustancia de estudio, mostraron normalización de los parámetros clínicos antes descritos. Posterior a este periodo, se evidenció encorvamiento de la espalda en algunos casos. La deshidratación en los grupos de hembras tratadas con el extracto fue persistente, reportándose la muerte de un ratón del grupo centinela durante el periodo de administración.

### 5.2 Peso corporal

En ambos sexos, el porcentaje del aumento del peso corporal en grupos control tratados con agua destilada fue mayor al 10%. En la tabla 2, puede observarse un aumento de 12.03% en machos y 12.86% en hembras. Con respecto a los grupos de machos tratados con el extracto, estos tuvieron valores promedio similares, observándose un aumento en el peso corporal de 9.63% para el grupo tratamiento y 7.23% en centinelas; no así en los grupos de hembras tratadas con la sustancia de estudio, en los cuales el grupo tratamiento aumento solo el 0.05% y el grupo centinela disminuyó en más de 2 puntos porcentuales respecto del peso inicial.

En la tabla 2, se detalla el peso corporal inicial y final junto al aumento porcentual obtenido al final del ensayo. Se encuentran diferencias significativas entre los valores promedios del aumento porcentual de los grupos hembras tratadas con la sustancia de estudio (tratamiento y centinela) comparada con el aumento porcentual del grupo control con un valor de 0,0011 y 0.000 respectivamente. En los grupos de machos no se encontraron diferencias significativas entre los valores porcentuales promedio del aumento del peso corporal entre los grupos tratamientos y el control.

**Tabla 2. Peso corporal en gramos**

Sexo	Hembras				Machos				
	Grupo	Inicio	Final	Aumento (%)	Sig. Bilateral	Inicio	Final	Aumento (%)	Sig. Bilateral
Control		22.08 ± 0.62	24.92 ± 0.53	12.86		26.57 ± 0.72	29.76 ± 0.97	12.03	
Tratamiento		22.23 ± 0.56	22.24 ± 1.17	0.05	0.001*	24.48 ± 1.96	26.76 ± 1.98	9.63	0.603
Centinela		22.02 ± 0.69	21.40 ± 1.01	-2.77	0.000*	24.74 ± 1.82	26.50 ± 1.90	7.23	0.160

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (DE) y  $P < 0.05$

### 5.3 Bioquímica sanguínea

Respecto a los valores de bioquímica sanguínea y tal como puede verse en la tabla 3, en la mayoría de los parámetros evaluados no se observan diferencias significativas entre los valores promedios de los grupos tratamiento y centinela, comparados con sus controles, tanto en grupos machos como en hembras. Se puede observar una disminución leve en los valores de bilirrubina total de los grupos centinela de ambos sexos, también en glucosa, y un leve aumento en el nitrógeno ureico en los grupos tratados de ambos sexos, aunque sin significancia estadística.

Contrario a lo anterior, se observa una disminución estadísticamente significativa de los valores promedio de creatinina de los grupos machos tratamiento (0.028) y centinela (0.010) respecto del grupo control. Esta disminución, también fue observada en el grupo de hembras centinela (0.019). El grupo de hembras tratamiento tuvo una disminución, aunque no estadísticamente significativa.

En este sentido, es importante mencionar el aumento significativo encontrado en los valores promedio de colesterol del grupo de machos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* al ser comparados estos con los valores encontrados en el grupo control, las hembras, por su parte, también mostraron aumento en los niveles de colesterol.

En cuanto a transaminasa oxalacética (TGO), debe mencionarse la disminución de sus valores en el grupo de machos tratados con la sustancia en estudio, al ser relacionados con los valores encontrados en el grupo control tratado con agua destilada; resultados que no fueron observados en hembras. La transaminasa pívurica (TGP) tuvo un aumento significativo únicamente en el grupo de hembras tratamiento (0.007).



**Tabla 3. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamientos y centinelas con respecto al grupo control, calculados a partir de los valores promedio de cada parámetro bioquímico.**

Parámetro	Grupo	Hembras			Machos		
		Media	± Desv. Típica	Sig. Bilateral	Media	± Desv. Típica	Sig. Bilateral
<b>Bilirrubina t</b>	Control	0.306	± 0.199		0.292	± 0.134	
	Tratamiento	0.260	± 0.163	0.701	0.364	± 0.195	0.556
	Centinela	0.138	± 0.082	0.120	0.120	± 0.000	0.083
<b>Bilirrubina dir.</b>	Control	0.033	± 0.011		0.032	± 0.008	
	Tratamiento	0.022	± 0.017	0.391	0.022	± 0.010	0.143
	Centinela	0.032	± 0.017	0.945	0.030	± 0.000	0.621
<b>Bilirrubina ind.</b>	Control	0.216	± 0.262		0.257	± 0.130	
	Tratamiento	0.302	± 0.071	0.632	0.342	± 0.199	0.490
	Centinela	0.140	± 0.028	0.664	0.088	± 0.004	0.080
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	Control	171.000	± 24.062		197.333	± 13.203	
	Tratamiento	192.333	± 3.055	0.202	178.000	± 5.291	0.078
	Centinela	150.000	± 27.404	0.375	171.800	± 15.073	0.052
<b>Nitrógeno ureico</b>	Control	19.250	± 1.258		24.333	± 2.516	
	Tratamiento	22.000	± 6.245	0.527	32.600	± 5.683	0.059
	Centinela	21.000	± 3.559	0.390	29.200	± 3.563	0.086
<b>Creatinina</b>	Control	0.385	± 0.190		0.317	± 0.120	
	Tratamiento	0.217	± 0.197	0.268	0.125	± 0.057	0.028*
	Centinela	0.080	± 0.016	0.019*	0.122	± 0.032	0.010*
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	Control	84.000	± 14.422		82.333	± 11.150	
	Tratamiento	107.333	± 39.310	0.389	132.400	± 12.259	0.001*
	Centinela	-	± -	-	-	± -	-
<b>Triglicéridos</b>	Control	135.000	± 22.605		193.666	± 57.709	
	Tratamiento	161.333	± 47.056	0.432	205.500	± 11.818	0.758
	Centinela	-	± -	-	-	± -	-
<b>TGO</b> (Transaminasa Oxalacética)	Control	85.333	± 13.012		124.666	± 7.571	
	Tratamiento	109.000	± 21.377	0.177	86.800	± 7.429	0.000*
	Centinela	77.250	± 8.732	0.366	75.500	± 4.041	0.000*
<b>TGP</b> (Transaminasa Pivurica)	Control	54.500	± 2.886		72.500	± 5.066	
	Tratamiento	63.000	± 1.732	0.007*	74.750	± 9.945	0.701
	Centinela	56.000	± 2.943	0.494	63.200	± 9.338	0.119

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (DE) y P < 0.05

## **5.4 Hematología sanguínea**

### **5.4.1 Glóbulos rojos.**

Los valores de glóbulos rojos y hemoglobina (tabla 4), no mostraron diferencias entre los grupos. Por otro lado, se observa un aumento en los valores de hematocrito de los grupos tratados, pero solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control-centinela de ambos sexos, mostrando valores de significancia de 0.002 en machos y 0.003 en hembras. En cuanto a los valores de Volumen Corpuscular Medio (MCV), estos aumentaron en los grupos machos tratados, con valores de significancia de 0.030 en control-tratamiento y 0.000 en control-centinela. En cuanto a hembras el MCV aumentó presentando diferencia significativa de 0.002 entre los grupos control-centinela.

La Hemoglobina Corpuscular Media (MCH) en los grupos de hembras no presentó cambios, solo el grupo tratamiento de machos aumento mostrando una diferencia significativa de 0.031. En ambos sexos disminuyeron los valores de Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (MCHC) en los grupos tratados, presentando diferencias entre control-centinela de 0.000 en ambos sexos. Los valores de Amplitud de Distribución de Eritrocitos (RDW-SD), en el grupo tratamiento de hembras no mostraron alteración, no así en el grupo centinela de hembras que mostró un aumento significativo de 0.015. En machos los valores de RDW-SD en el grupo tratamiento, hubo una disminución significativa de 0.033, lo contrario al grupo centinela de machos, donde hubo un aumento significativo de 0.002.

### **5.4.2 Plaquetas.**

Las plaquetas (ver tabla 4) no mostraron diferencias estadísticamente significativas en los grupos de hembras, aunque sí se mostró una leve disminución en el grupo tratamiento. En machos hubo una disminución en ambos grupos tratados, pero solo el grupo tratamiento mostró una diferencia significativa con un valor de significancia estadística de 0.008. El Volumen Plaquetar Medio (VPM) no mostró diferencias significativas en ninguno de los grupos.

### **5.4.3 Glóbulos blancos.**

Los valores de glóbulos blancos (tabla 4) en hembras disminuyeron en ambos grupos tratados (tratamiento y centinela), respecto al grupo control, pero no mostraron diferencias estadísticamente significativas. En machos, si se encontró una disminución significativa con un valor de 0.021 en el grupo tratamiento, no así en el grupo centinela.

Los valores de linfocitos disminuyeron en los grupos hembras tratados, sin presentar diferencia significativa. En machos solo el grupo tratamiento presento disminución significativa comparada con el grupo control para un valor de significancia de 0.023. En cuanto a monocitos se observó un aumento en los grupos centinela de ambos sexos, sin significancia estadística en machos, y en hembras fue de 0.013. Los eosinófilos y basófilos no mostraron cambios significativos en ninguno de los grupos, en ningún grupo tratado.

**Tabla 4. Valores de significancia de la diferencia entre los grupos tratamiento y centinela con respecto al grupo control a partir de los valores promedio de cada parámetro hematológico.**

Parámetro	Grupo	Hembras			Machos			
		Media	± Desv. Estándar	Sig. Bilateral	Media	± Desv. Estándar	Sig. Bilateral	
Glóbulos rojos	Glóbulos rojos (10e6/ $\mu$ L)	Control	10.310	± 0.241		10.678	± 0.678	
		Tratamiento	10.235	± 0.201	0.634	10.580	± 0.287	0.774
		Centinela	10.465	± 0.246	0.374	10.394	± 0.276	0.411
	Hemoglobina (mg/dl)	Control	15.620	± 0.349		15.560	± 0.403	
		Tratamiento	15.500	± 0.244	0.581	15.960	± 0.378	0.145
		Centinela	15.800	± 0.469	0.529	15.400	± 0.387	0.540
	Hematocrito	Control	48.360	± 0.920		48.300	± 1.392	
Tratamiento		47.240	± 2.227	0.329	50.140	± 1.438	0.074	
Centinela		51.625	± 1.279	0.003*	51.780	± 0.920	0.002*	
MCV (fL)	Control	46.920	± 0.725		45.880	± 1.175		
	Tratamiento	47.460	± 2.028	0.590	47.380	± 0.496	0.030*	
	Centinela	49.325	± 0.741	0.002*	49.840	± 0.646	0.000*	
MCH (pg)	Control	15.140	± 0.151		14.760	± 0.207		
	Tratamiento	15.140	± 0.288	1.000	15.080	± 0.178	0.031*	
	Centinela	15.100	± 0.270	0.786	14.820	± 0.130	0.599	
MCHC (g/dL)	Control	32.320	± 0.268		32.220	± 0.531		
	Tratamiento	31.920	± 0.852	0.346	31.840	± 0.207	0.194	
	Centinela	30.625	± 0.287	0.000*	29.550	± 0.129	0.000*	
RDW-SD (fL)	Control	33.520	± 1.355		33.620	± 1.123		
	Tratamiento	33.080	± 4.167	0.828	31.740	± 1.186	0.033*	
	Centinela	35.925	± 0.660	0.015*	37.980	± 1.758	0.002*	
Plaquetas	Plaquetas (10e3/ $\mu$ L)	Control	1540.50	± 86.681		1612.75	± 89.604	
		Tratamiento	1515.25	± 64.685	0.657	1414.00	± 47.972	0.008*
		Centinela	1529.00	± 189.285	0.917	1493.00	± 104.718	0.133
VPM (fL)	Control	6.560	± 0.114		6.400	± 0.070		
	Tratamiento	6.880	± 0.589	0.267	6.620	± 0.258	0.104	
	Centinela	6.475	± 0.221	0.477	6.375	± 0.287	0.875	
Glóbulos blancos	Glóbulos blancos (10e3/ $\mu$ L)	Control	10.280	± 3.133		11.560	± 3.110	
		Tratamiento	6.425	± 1.175	0.054	6.800	± 0.673	0.021*
		Centinela	6.625	± 1.081	0.063	12.240	± 3.090	0.738
	Neutrófilos (10e3/ $\mu$ L)	Control	1.214	± 0.383		1.444	± 0.343	
		Tratamiento	0.963	± 0.056	0.318	1.175	± 0.044	0.157
		Centinela	0.845	± 0.168	0.119	1.522	± 0.297	0.711
	Linfocitos (10e3/ $\mu$ L)	Control	8.964	± 2.903		10.002	± 2.782	
Tratamiento		5.315	± 1.128	0.051	5.625	± 0.604	0.023*	
Centinela		5.660	± 0.926	0.067	10.438	± 2.943	0.816	
Monocitos (10e3/ $\mu$ L)	Control	0.040	± 0.020		0.088	± 0.064		
	Tratamiento	0.054	± 0.019	0.325	0.056	± 0.016	0.340	
	Centinela	0.102	± 0.029	0.013*	0.258	± 0.179	0.081	

<b>Eosinófilos (10e3/<math>\mu</math>L)</b>	Control	0.002	±	0.004		0.000	±	0.000	
	Tratamiento	0.002	±	0.004	1.000	0.000	±	0.000	-
	Centinela	0.002	±	0.005	0.879	0.000	±	0.000	-
<b>Basófilos (10e3/<math>\mu</math>L)</b>	Control	0.012	±	0.008		0.010	±	0.007	
	Tratamiento	0.008	±	0.008	0.471	0.010	±	0.012	1.000
	Centinela	0.005	±	0.005	0.200	0.010	±	0.000	1.000

Los valores se expresan con la Media  $\pm$  Desviación Estándar (DE) y  $P < 0.05$

## 5.5 Peso de órganos

El peso de los órganos extraídos mostraron algunas diferencias entre los grupos control y tratamientos (ver tabla 5). El hígado en los grupos tratados de ambos sexos aumentó, pero solo el grupo centinela de machos mostró una diferencia estadísticamente significativa (0.000). Por otro lado, se observa una disminución de peso del corazón en los grupos tratados de ambos sexos, pero solo el grupo machos tratamiento tuvo una diferencia significativa con un valor de significancia de 0.022. En cuanto a los pulmones en los grupos tratados de ambos sexos, puede observarse un aumento estadísticamente significativo con valores de 0.001 en hembras tratamiento y 0.002 en hembras centinela; mientras que en machos, los valores de significancia fueron de 0.028 en el grupo tratamiento y 0.016 en el centinela.

El bazo en grupos tratamiento de machos y hembras, no hubo cambio en peso, en cambio en los grupos centinelas de ambos sexos, tuvieron aumento significativo con valores de 0.008 en hembras y 0.009 en machos. En el caso del riñón, los valores promedio de peso en este órgano no muestran diferencias en los grupos tratados, a excepción del grupo centinela de hembras, observándose un aumento con significancia de 0.000.

Por otro lado, en estómago de hembras tratadas mostró una disminución de peso significativa con un valor de 0.004 en tratamiento y 0.011 en centinelas. Respecto al intestino delgado, tanto en hembras, como en machos tratados con la sustancia de estudio, se observó un aumento de peso, pero estadísticamente significativo solo en el grupo centinela de hembras. En cuanto al intestino grueso, los valores en hembras tratadas con el extracto muestran una disminución no significativa, únicamente el grupo centinela de machos mostró aumento estadísticamente significativo con un valor de 0.001.

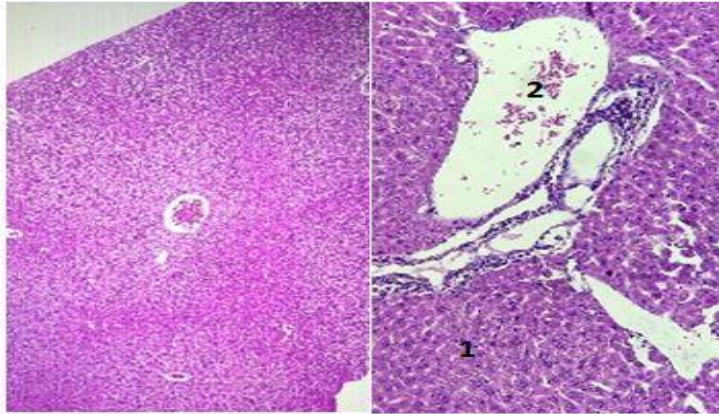
**Tabla 5. Peso de órganos en gramos**

Órgano	Grupos	Hembras			Machos				
		Media	±	Desv. Estándar	Sig. Bilateral	Media	±	Desv. Estándar	Sig. Bilateral
<b>Hígado</b>	Control	1.096	±	0.099		1.288	±	0.078	
	Tratamiento	1.126	±	0.092	0.635	1.430	±	0.144	0.090
	Centinela	1.190	±	0.068	0.152	1.528	±	0.455	0.000*
<b>Corazón</b>	Control	0.100	±	0.014		0.126	±	0.005	
	Tratamiento	0.106	±	0.015	0.536	0.115	±	0.005	0.022*
	Centinela	0.090	±	0.028	0.508	0.120	±	0.008	0.227
<b>Pulmones</b>	Control	0.132	±	0.008		0.144	±	0.013	
	Tratamiento	0.178	±	0.017	0.001*	0.178	±	0.024	0.028*
	Centinela	0.170	±	0.018	0.002*	0.188	±	0.029	0.016*
<b>Bazo</b>	Control	0.132	±	0.013		0.086	±	0.019	
	Tratamiento	0.137	±	0.005	0.456	0.088	±	0.016	0.865
	Centinela	0.170	±	0.018	0.008*	0.122	±	0.005	0.009*
<b>Riñón</b>	Control	0.172	±	0.005		0.209	±	0.010	
	Tratamiento	0.165	±	0.013	0.309	0.206	±	0.028	0.831
	Centinela	0.195	±	0.004	0.000*	0.210	±	0.015	0.910
<b>Estómago</b>	Control	1.578	±	0.512		0.762	±	0.128	
	Tratamiento	0.622	±	0.114	0.004*	1.110	±	0.439	0.180
	Centinela	0.682	±	0.084	0.011*	0.546	±	0.212	0.119
<b>Intest. Delgado</b>	Control	2.013	±	0.032		1.612	±	0.248	
	Tratamiento	2.046	±	0.178	0.709	1.982	±	0.261	0.086
	Centinela	2.173	±	0.025	0.002*	1.882	±	0.185	0.132
<b>Intest. Grueso</b>	Control	0.884	±	0.101		0.810	±	0.027	
	Tratamiento	0.782	±	0.079	0.116	0.740	±	0.098	0.251
	Centinela	0.815	±	0.078	0.303	0.897	±	0.020	0.001*

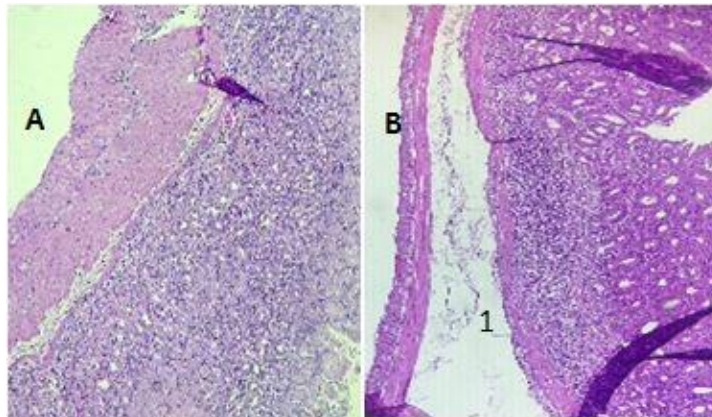
Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (DE) y P < 0.05

## 5.6 Histopatología.

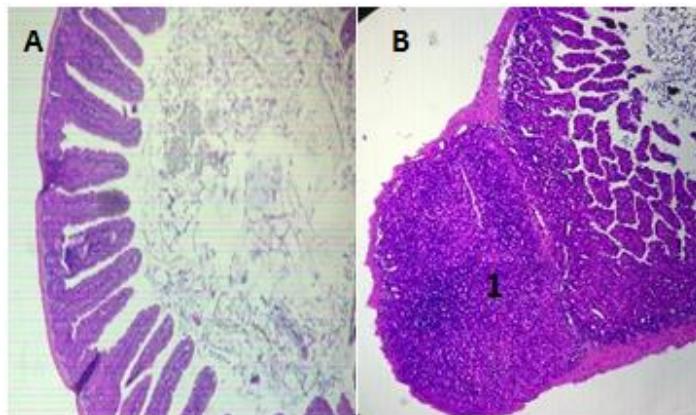
Hubo diferencias en las lesiones encontradas en los órganos de machos y hembras (ver fig. 6 a 11), en cuanto a machos sólo se encontró congestión vascular en hígado (control y tratamientos), congestión y edema vascular en riñones (también en ambos grupos), y dilatación de la pulpa blanca y congestión de la pulpa roja en el bazo. Mientras que en hembras tanto en los grupos control como tratamiento, se observó hiperemia vascular (en hígado, estómago e intestinos), además acúmulos linfoides leves en intestinos. En todos los grupos el bazo mostró dilatación de la pulpa blanca y congestión de la pulpa roja. Las diferencias fueron que el estómago en el grupo control presentó acúmulos de linfocitos a nivel de submucosa, los pulmones presentaron hemorragia en parénquima. En tratamiento los pulmones mostraron hiperemia vascular y acúmulos linfoides, además el hígado con dilatación e infiltrado inflamatorio crónico de interfase y el riñón con hiper celularidad glomerular y focos de infiltrado inflamatorio crónico. En cuanto a las hembras centinela, los únicos cambios observados fueron pequeños acúmulos linfoides en pulmones e hígado con hiperemia y congestión vascular.



**Figura 6. Comparación de cortes histológicos de hígado de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* A. Hígado sin alteración. B. Hígado con dilatación y congestión vascular (1) e infiltrado inflamatorio crónico (2) en grupo hembra tratamiento.**

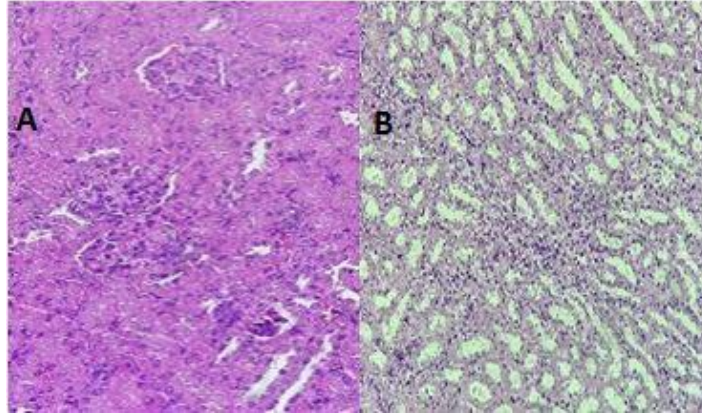


**Figura 7. Comparación de cortes histológicos de estómago de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* A. Estómago sin alteraciones. B. Estómago con acúmulos de linfocitos (1) en hembras tratamiento.**

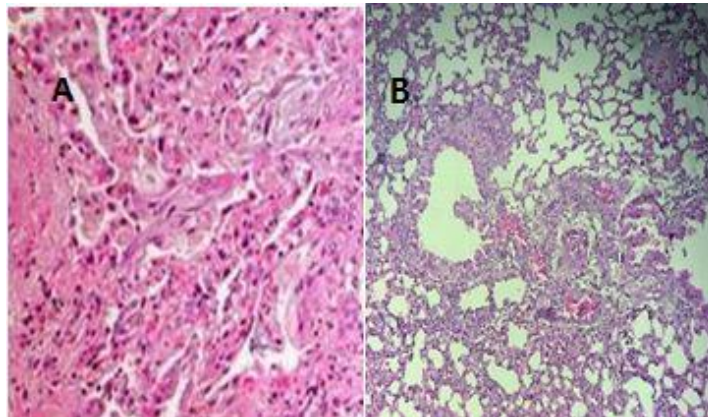


**Figura 8. Comparación de cortes histológicos de intestino de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* A. Intestino sin alteraciones. B. Intestino con acúmulos linfoides (1) en hembras.**

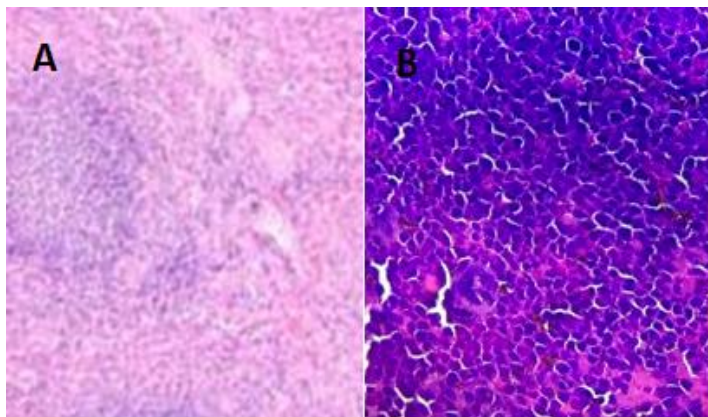




**Figura 9. Comparación de cortes histológicos de riñón de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* A. Riñón sin alteraciones. B. Riñón con focos de infiltrado inflamatorio crónico en hembras tratamiento.**



**Figura 10. Comparación de cortes histológicos de pulmón de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* A. Pulmón sin alteración. B. Pulmón con discreto infiltrado inflamatorio en ambos sexos tratados.**



**Figura 11. Comparación de cortes histológicos de bazo de animales control y animales tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* A. Bazo sin alteración. B. Bazo con dilatación de la pulpa blanca y congestión de pulpa roja en ambos sexos tratados.**

## VI. DISCUSIÓN

Según Silverman (1991), la detección del dolor en roedores no es fácil. Cambios leves en los comportamientos, vocalizaciones, el uso anormal de ciertas partes del cuerpo, pueden señalar dolor, pero no podemos evaluar su magnitud. Entre los criterios para evaluar condiciones mórbidas y moribundas encontradas en investigaciones oncológicas y toxicológicas se observan la disminución de las actividades como, por ejemplo; cambio en el comportamiento y en la manifestación de reflejos, cambios en el temperamento, nervosidad, disminución en el consumo de alimentos y agua, vocalizaciones anormales, posturas anormales, automutilación y cambios en las actividades intestinales o urinarias (Amyx 1990). Por su parte, Montgomery (1990), menciona que en roedores se describe como indicadores importantes de dolor, el hecho de quedarse acostado, cambios en el pelaje y en el brillo de los ojos.

De acuerdo a lo anterior, y a lo descrito en el apartado de resultados, las observaciones clínicas hechas en el presente estudio, demuestran dolor en los animales de laboratorio como consecuencia de la administración del extracto clorofórmico de *C. urticifolia* al evidenciarse algunos de los siguientes signos y síntomas: piloerección, deshidratación, palidez y aumento en la frecuencia respiratoria. Así mismo se observó el encorvamiento de espalda desde la segunda semana del grupo tratamiento de hembras y desde la tercera semana en los machos tratados, hecho que debe ser considerado, como indicador de dolor abdominal. De hecho, estas observaciones indican un deterioro de la condición de salud general de los animales tratados con la sustancia de estudio, y deben ser considerados como signos de toxicidad en tanto que no fueron observados en los animales de los grupos controles tratados únicamente con agua destilada.

Las alteraciones clínicas descritas anteriormente, pueden ser explicadas por la presencia de sesquiterpenlactonas (Matsuura *et al* 2005), sustancias que han sido reportadas como responsables de efectos tóxicos neurológicos y en músculo cardíaco (Alastair *et al* 1994; Robles *et al* 1995). También Barbosa de Oliveira *et al* (2011) reportan a las sesquiterpenolactonas como los principales compuestos tóxicos en su evaluación de la toxicidad de *Smallanthus sonchifolius*, especie vegetal que ocasionó daño renal después de su administración oral prolongada.

En cuanto al encorvamiento de la espalda observada en animales de esta investigación, puede ser atribuido al dolor abdominal, que muy bien puede estar relacionado con la naturaleza irritante de las sesquiterpenlactonas sobre la mucosa intestinal (Hoffmann 2003). Además, sesquiterpenlactonas aisladas de especies que forman parte de la Familia Asteraceae, administradas en un estudio a conejillos de indias, estos presentaron efectos inhibitorios sobre la contractilidad del músculo liso intestinal (Amorin 2013). Ésta comprobada la actividad tóxica sobre tejido intestinal, esto podría explicar la caída del peso corporal en los grupos tratados con



el extracto de *C. urticifolia*, debido a una inhibición de la absorción de nutrientes a través de este tejido.

De la misma manera la disminución del peso corporal, puede atribuirse a la actividad metabólica incrementada como parte de los procesos de desintoxicación (Moreno *et al* 2013). Dicho resultado en el peso corporal y aunque en el presente estudio no se tomó en cuenta, bien pudo deberse a una disminución en la ingesta de alimento, lo que a su vez concuerda con la disminución estadísticamente significativa en el peso del estómago de las hembras tratadas con el extracto, ya que la disminución del consumo de alimentos, es otro indicador de toxicidad (CCAC 1998, ACU 2015). Y por esta razón nos encontramos entonces, con evidencia de la toxicidad del extracto de *C. urticifolia*.

Por su parte, el manual del Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCAC 1998) describe que a medida que la condición del animal empeora éste llega a ser silencioso y deja de reaccionar, apartándose del grupo. Dicho manual describe, además la hipotermia como signo del deterioro de la condición de salud (el animal está frío cuando se le toca). Coincidentemente, la disminución de la actividad motora, la poca reacción a estímulos y la disminución en la temperatura corporal, fueron condiciones observadas en los grupos de animales tratados con el extracto de *C. urticifolia* en el presente estudio.

Por otro lado, las alteraciones bioquímicas del organismo son resultado de la exposición a un compuesto químico que también modifica la composición celular sanguínea (Mancebo *et al* 2002). En cuanto a la bioquímica sanguínea reportada en este estudio, la elevación de los valores de Alanino aminotransferasa (ALT) observado únicamente en el grupo de hembras tratadas con la sustancia en estudio, se presume según Wasan *et al* (2001); Crook (2006) y González *et al* (2006), que sea consecuencia de un daño hepático; aunque de carácter leve en tanto que, según Tejada (2010), un aumento leve de transaminasas acompañado de niveles normales de bilirrubina indica la presencia de una alteración de carácter leve a nivel hepático; combinación de resultados que concuerdan con lo observado en el grupo de hembras expuestas a la sustancia de estudio.

En cuanto a las observaciones histopatológicas, la dilatación e infiltrado inflamatorio crónico observado en este grupo de hembras durante el examen microscópico de este órgano, concuerdan con los valores elevados de ALT, y demuestran nuevamente el potencial toxico de esta especie vegetal. Con respecto a la congestión celular observada en tejido hepático del grupo de machos tratados con la sustancia de estudio y sin la correlación de la alteración de otros parámetros, según Isaza *et al* (2005), no se relacionada con toxicidad química.

Estas diferencias entre las respuestas biológicas a la sustancia de estudio entre ambos sexos, según Cai *et al* (2003), pueden ser explicadas, en cuanto que las hembras son más susceptibles a la toxicidad del compuesto por el papel funcional de los receptores de retinoides X (RXR) en

hepatocitos, por el hecho de que tienen diferentes expresiones de enzimas de citocromo P450 que se presentan durante el metabolismo oxidativo en el hígado; o bien, esta diferencia, podría ser explicada por la lipofilia de las sesquiterpenlactonas y su consecuente acumulación en depósitos de grasa que relativamente son mayores en hembras que en machos, es decir, demostraron una diferencia de género.

En el caso del metabolismo celular del colesterol, este se halla regulado para asegurar una síntesis normal de la membrana celular sin acumulación intracelular significativa. No obstante, las células fagocíticas pueden llegar a estar sobrecargadas de lípidos (triglicéridos, colesterol y ésteres de colesterol) en diversos procesos patológicos (Kumar *et al* 2008). Esto explicaría el aumento encontrado en los valores promedio de colesterol de los grupos de ambos sexos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia*, aunque en hembras no fue estadísticamente significativo.

Por otra parte, el aumento significativo en los valores de hematocrito en los grupos centinelas de ambos sexos, puede explicarse de acuerdo a que las moléculas, los iones y los coloides de tóxicos se pueden ser transportados por la sangre, uniéndose física o químicamente a los componentes de esta, sobre todo a los eritrocitos (Silbergeld *et al* s.a), esto también explicaría el aumento en el Volumen Corpuscular Medio (MCV), encontrado en los grupos tratados con el extracto para ambos sexos, observándose un aumento estadísticamente significativo en los dos grupos centinelas (machos y hembras).

Del mismo modo los valores de la Concentración de Hemoglobina Corpuscular Media (CHCM) de los grupos tratados de ambos sexos son menores que la de sus controles, es decir, que los eritrocitos tienen menor concentración de hemoglobina (hipocrómicas), lo que a su vez explicaría la palidez de los órganos de todos los animales tratados con el extracto, esto observado durante la necropsia.

En cuanto a los órganos, los cambios en el tamaño, forma, superficie, color, consistencia y peso; determinan la presencia de daños toxicológicos (Höfle 2007). Por su parte Dybing *et al* (2002) explica que el peso relativo de los órganos es fundamental para diagnosticar si el órgano fue expuesto a la lesión o no. El corazón, el hígado, el riñón, el bazo y los pulmones son los primeros órganos afectados por reacción metabólica causada por agente tóxico. Igualmente, Kumar *et al* (2008) explica que la hinchazón celular es la primera manifestación de casi todas las formas de lesión en las células, y es más manifiesta considerando el órgano en su totalidad, pues cuando afecta a muchas células de este causa una cierta palidez, aumento de la turgencia y en el peso. Esto explicaría el aumento de peso del hígado y pulmones en los grupos tratados con la sustancia de estudio para ambos sexos y del bazo en los grupos centinelas.

De manera específica Ríos (1998), describe que en la respuesta tóxica del hígado manifestada en inflamación, se produce una migración de linfocitos al espacio porta, alrededor de los

hepatocitos necróticos, neutrófilos y otras células inflamatorias, esto explica el aumento de los monocitos que se observó en los grupos centinelas de ambos sexos. De la misma manera, Subieta Imaña (2005), encontró que la savia de *Musa paradisiaca* produjo daño hepático en dosis concentrada evidenciada en infiltrado de células inflamatorias, sin reportar daño renal o pulmonar. En el presente estudio los pulmones de los animales para ambos sexos aumentaron de peso significativamente en todos los grupos tratados con el extracto, pero sólo en las hembras tratamiento los pulmones mostraron hiperemia vascular y acúmulos linfoides.

Por otro lado, el significativo aumento en el peso del bazo en los grupos centinelas de ambos sexos es explicado según Jaime y Gómez (2005), que es debido a que éste funciona como un filtro de sangre que atrapa antígenos en forma de partículas, como bacterias y células, o antígenos solubles en forma de agregados y representa el órgano más importante en la síntesis de anticuerpos.

Únicamente las hembras del grupo centinela tratadas con el extracto mostraron aumento de peso significativo y además de la palidez observada de forma macroscópica, el riñón mostró hiper celularidad glomerular y focos de infiltrado inflamatorio crónico. Esto coincide con la reportado por Gross *et al* (1992) en donde la tasa de filtración glomerular (TFG) es 10% menor en las mujeres que en los hombres, después de la corrección para el tamaño corporal, es decir, que existe un aumento de la depuración renal en los varones.

Así mismo Gregory *et al* (2011) estudiaron los efectos tóxicos de un extracto de hexano en *Pterocaulon polystachyum* que causó alteraciones en los parámetros bioquímicos, alteraciones morfológicas en los tejidos y provocando genotoxicidad, pero no observaron mortalidad ni signos visibles de letalidad en los ratones en el tratamiento agudo. Del mismo modo, el tratamiento subagudo causó diferencias importantes en los parámetros bioquímicos y en los tejidos, entre los grupos control y tratados. Sus resultados también revelaron genotoxicidad en el tejido renal. Su análisis microscópico de tejidos hepáticos y renales, después de ambos tratamientos, también reveló que la administración del extracto dañó la morfología de estos órganos. Especialmente cuando se usaron dosis altas del extracto, se observaron lesiones tales como procesos inflamatorios y esteatosis (hígado graso) en el tejido hepático de los ratones en los grupos tratados.

## VII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos por en la prueba preliminar y en consideración del anexo 2 de la guía OECD 423 permiten clasificar la sustancia de estudio en la categoría 4 de toxicidad que equivale a una DL50 (Dosis Letal Media) mayor o igual que 300 mg/kg pero menor que 2000 mg/kg, según el sistema armonizado para la clasificación de sustancias que causan efectos agudos (OECD, 1998), por lo que no se recomienda su utilización para el tratamiento de enfermedades a dosis repetidas.

Los grupos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* manifestaron deshidratación, piloerección, vasoconstricción periférica, disminución de la temperatura corporal, encorvamiento de la espalda, disminución en la actividad motora, caída o disminución del peso corporal y el aumento de peso en hígado, pulmones y bazo, demostrando el potencial tóxico del extracto clorofórmico de *C. urticifolia* a dosis repetidas, por lo cual no se debe utilizar *C. urticifolia* para tratar enfermedades.

Las hembras son más susceptibles a la sustancia de estudio, debido al papel que ejercen los receptores de retinoides X (RXR) en hepatocitos, pues poseen diferentes expresiones de enzimas de citocromo P450 que los machos, evidenciado en la elevación de los valores de ALT en el grupo de hembras tratadas con la sustancia de estudio, indicando la presencia de una alteración de carácter leve a nivel hepático manifestado en dilatación e infiltrado inflamatorio crónico; en cuanto a los machos tratados éstos sólo mostraron congestión celular.

## VIII. RECOMENDACIONES

- Al realizar este tipo de investigaciones, hay que tomar siempre en cuenta la utilización de ambos sexos en las pruebas, pues como ha resultado en este trabajo, pueden existir diferencias en la absorción y depuración de las sustancias dependiendo de este factor (del sexo).
- Dado que en el presente estudio no se registraron los cambios en el consumo de alimento y agua, se recomienda recopilar éstos valores en futuras investigaciones, con la finalidad de explicar de mejor manera los cambios en el peso corporal.
- Para complementar los estudios que evalúan el efecto de las sustancias en los riñones, deben tomarse en cuenta otros análisis que permitan hacer un diagnóstico más especializado, como es la Tasa de Filtración Glomerular (TFG), que permite evaluar la función renal con una mayor precisión, además del análisis general de la orina.
- Realizar más estudios que validen la utilización de extractos de plantas medicinales, con el objetivo de que sea una alternativa segura para la población en general, y a su vez garantizar su efectividad frente a diversas enfermedades para las que son utilizadas hoy en día.
- Establecer alianzas estratégicas entre la Escuela de Biología y laboratorios afines a este tipo de investigaciones, para que de esta forma se obtenga un mayor seguimiento y especialización al respecto.

## IX. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Alastair J.B., Hay, Hamburger, M., Hostettmann, K., Houlst, J.R.S. (1994). Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive  $\alpha$ -methylenebutyrolactone functions. *Br. J. Pharmacol.* 112, 9-12.

Amorin, H. MH, Gil da Costa RM, Lopes C, Bastos MM. (2013). Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit Rev Toxicol*, 43(7), 559–579.

Anderson, Gail D. (2005). Sex and Racial Differences in Pharmacological Response: Where Is the Evidence? Pharmacogenetics, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Journal of Women's Health*. Volume 14, number 1. Department of pharmacy, University of Washington, Seattle, Washington.

Animal Care and Use (ACU). (2015). ARAC Guidelines. Guidelines for Pain and Distress in Laboratory Animals: Responsibilities, Recognition and Alleviation. Disponible en: [http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Pain\\_and\\_Distress.pdf](http://oacu.od.nih.gov/ARAC/documents/Pain_and_Distress.pdf)

Barbosa de Oliveira, R., Chagas de Paula, D.A., Alves Rocha, B., José Franco J., Gobbo-Neto, L., Akira Uyemura, S., Dos Santos, W. F., Da Costa, F. B. (2011). Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. *Journal of Ethnopharmacology* 133: 434–441.

Bioquímica Clínica Sangre y orina. Laboratorio de Bioquímica clínica. Disponible en: <http://www.fmed.uba.ar/depto/bioqhum/TP%20%2014%20Bioquimica%20ClinicaSangre%20y%20orina.pdf>

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2009). Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/termino.php?l=1&t=tos>

Borges del Castillo, J., Ferrero, M. T. M., Luis F. R., Bueno. P. R., Leonor N. L. y Portillo de Rivas R. M. (1980). *Anales de Química*, 77, 1980-1982. Compuestas Salvadoreñas I. Caleína D y 2,3-epoxicalcina D, dos germacranólidos de la *Calea urticifolia*.

Borges del Castillo, Manresa Ferrero M.T. Rodriguez L. and Vázquez B. P. (1981) “Salvadoriam Compositae II. Juanislamin and 2,3- Epoxy – juanislamin, two sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*” *J. Nat. Prod.*, 44, N° 3, pp 348-350

Cai Yan, Dai Tiane, Ao Yan, Konishtamiko I, Chuang Kuang-Hsiang, Lue Yanhe, Chang Chawnshang, Wan Andyu-Jui Yvonne. (2003). Cytochrome P450 Genes Are Differentially

Expressed in Female and Male Hepatocyte Retinoid X Receptor Deficient Mice. *Endocrinology* 144(6):2311–2318.

Cavilla María Verónica. (2016). Fisiología renal. Procesos renales en la formación de orina: Filtración glomerular, Reabsorción y Secreción tubular. Parte 1. Disponible en: <http://www.vet.unicen.edu.ar/ActividadesCurriculares/FisiologiaCardiovascularRespiratoriaRenal/images/Documentos/2016/Fisiolog%C3%ADa%20Renal%20Parte%20I.%20Filtraci%C3%B3n%20Glomerular.pdf>

CCAC. (1998). Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. Consejo Canadiense de Protección de los Animales. Manual vol. 1 (2nda edición) 322p.

Cornell University. (2005). Department of Animal Science, Plants Poisonous to livestock.

Crook MA. (2006). *Clinical Chemistry and Metabolic Medicine*. 7 Edition. Hodder Arnold, London, p.426.

Cubillos Godoy, Víctor; Paredes, Enrique. (2006). Patología general y sistemática (PANI 141). Instituto de Patología Animal. Universidad Austral de Chile.

Delesque-Touchard Nathalie, Park Soo-Hee and Waxman David J. (2003). Synergistic Action of Hepatocyte Nuclear Factors 3 and 6 on *CYP2C12* Gene Expression and Suppression by Growth Hormone-activated STAT5b. Proposed model for female-specific expression of *cyp2c12* in adult rat liver. *Endocrinology* 144(6):2311–2318.

Dybing, E.; Doe, J.; Groten, J.; Kleiner, J.; O'Brien, J. (2002). Hazard characterization of chemicals in food and diet: dose response, mechanism and extrapolation issues. *Food Chem. Toxicol.* 42, 237-282.

González Ayala, J. C. (2002). Botánica medicinal popular, El Salvador, Centroamérica, CUSCATLANIA, Diciembre.

González Torres Y, Scull Campos I, Bada Barro AM, Fuentes Morales D, González Navarro B, Arteaga Pérez ME. (2006). Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. *Rev Cubana Plant Med [revista en la Internet]*.:11(2). Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S102847962006000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962006000200005&lng=es&nrm=iso&tlng=es)

Gregory Regner Gabriela, Ganesini Janaína, Gomes Von Borowski Rafael, Silveira Fabiana, Garcia Semedo Juliane, Falcão Ferraz Alexandre de Barros, Wiilland Elenir, Von Poser Gilsane,

Allgayer Mariângela, Nascimento Picada Jaqueline, Pereira Patrícia. (2011). Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: A medicinal plant with antifungal activity. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 31: 242–249.

Gross JL, Friedman R, Azevedo MJ, Silveiro SP, Pecis M. (1992). Effect of age and sex on glomerular filtration rate measured by <sup>51</sup>Cr-EDTA. *Braz J Med Biol Res.* 25:129.

Hoffmann D. (2003). *Medicinal herbalism: the science and practice of herbal medicine.* Rochester, UK: Healing Arts Press.

Höfle U. (2007). *Técnicas de Diagnóstico Post-Mortem: Necropsia y Toma de Muestras.* España: Sevilleja de la Jara. Disponible en:  
[http://encontroiberico.no.sapo.pt/docs/Necropsias\\_TomaMuestras\\_UHofle.pdf](http://encontroiberico.no.sapo.pt/docs/Necropsias_TomaMuestras_UHofle.pdf)

Hwang-Verslues Wendy W., Sladek Frances M. (2010). HNF4 $\alpha$ -- role in drug metabolism and potential drug target? NIH-PA Author Manuscript. *Curr Opin Pharmacol.* December; 10(6): 698–705. doi: 10.1016/j.coph.2010.08.010.

Infante J, Sifontes S, Pérez P, González P, Muñoz E, Marrero O. (1998). Toxicología de VA-DIFTET por aplicación ha dosis única en ratones. *Rev Toxicol.* 15:59-63.

Isaza G, Arango M, Buriticá O, Marulanda H. (2005). Determinación de la toxicidad subcrónica de la n Zebrina pendula en ratones. *Biosalud.* 14:67-77.

Jorge OA, Jorge AD. (2005). Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. *Revista Española de enfermedades digestivas (Madrid);* 97: 115-124.

Klaassen, Curtis D. s.a. *Principios de toxicología y tratamiento de la intoxicación.*

Klaseen, C., Watkins, J. (2001). *Manual de toxicología.* 5<sup>o</sup> Edición.

Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Mitchell, Richard N. (2008). *Robbins Patología humana* 8<sup>a</sup> edición. ElServier Sounders.

Lagarto, A., Tillán, J., Bueno, V., Chávez, I., Guerra, I., Vega, Y., Valdés, O., Gabilondo, T. (2005). Toxicidad Aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. *Revista de Toxicología* 22: 175-179. Asociación Española de Toxicología. Pamplona, España. ISSN 1697-0748.

Leonor Genovez, A. N. (1980). Tesis de licenciatura. Estudio inicial de cuatro Germacranólidos de la *Calea urticifolia* (Juanislamina).



Lamba Vishal, Lamba Jatinder, Yasuda Kazuto, Strom Stephen, Davila Julio, Hancock Michael L., Fackenthal James D., Rogan Peter K., Ring Barbara, Wrighton Steven A. and Schuetz Erin G. (2003). Hepatic CYP2B6 Expression: Gender and Ethnic Differences and Relationship to *CYP2B6* Genotype and CAR (Constitutive Androstane Receptor) Expression. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 307 (3) 906-922; DOI: <https://doi.org/10.1124/jpet.103.054866>

Lock de Ugaz, Olga. (1994). Investigación fitoquímica, Métodos en el estudio de productos naturales, Perú, Pontificia Universidad Católica del Perú, Segunda edición. Pág. 53-63; 265-269.

López-Novoa JM. (2013). Nuevas perspectivas para la prevención de la nefrotoxicidad desde el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos. *Rev. Toxicol.* 30

Martínez A. (2011). Sesquiterpenlactonas. Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>

Moreno Mendoza, M. A., Parada Palacios, E. A., Mejía Valencia, J.G., Espinoza Madrid, P. A. (2013). Toxicología subcrónica de infusión de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) por administración oral en ratones NIH.. *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 18(1) 157-170.

Mancebo A, Scull I, González Y, Arteaga M, González B, Fuentes D. (2002). Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. *Rev Toxicol.* 19:73 -8.

Matsuura, N., Yamada M., Suzuki H., Hasegawa N., Kurosaka C., Ubukata M., y col. (2005). Inhibition of preadipocyte differentiation by germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 cells. *Biosci. Biotech. Biochem*; 69: 2470-2474.

Montgomery, C.A. (1990). Oncologic and toxicologic research: alleviation and control of pain and distress in laboratory animals. *Cancer Bull*; 42(4): 230-237.

Nakagawa, Y., Iinuma, M., Matsuura, N., Yi, K., Naio, M., Nakayama, T., y col. (2005). A potent apoptosis-inducing activity of a sesquiterpenelactone, arucanolide, in HL60 cells: a crucial role of apoptosis-inducing factor. *J Pharmacol Sci.*; 97: 242-252

Núñez Cairo, Carlos Rafael. (2012). Biomodelo de insuficiencia renal crónica con el uso del tisuacryl en ratas. *Revista Habanera de Ciencias Médicas* 11(5)593-604.

Obeso Fernández Gonzalo, Carretero López Fernando, Pérez Corra Ana María. (2014). Manual CTO de Medicina y Cirujía. 9ª edición. Grupo CTO. CTO Editorial.

OECD. (1998). Harmonised Integrated Hazard Classification for Human Health and Environmental. Effects of Chemical Substances as endorsed by the 28th Joint Meeting of the Chemicals Committee and the Working Party on Chemicals in November 1998, Part 2, p.11. Disponible en: <http://webnet1.oecd.org/oecd/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF.html>

OECD. (1998). Guideline for the testing of chemicals N° 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Organization for Economic Cooperation and Development.

OECD. (2001). Guideline for Testing Of Chemicals N°420. Acute Oral Toxicity–Fixed Dose Procedure. Organization for Economic Cooperation and Development.

Ortiz Segura, María del Carmen. (2011). Evaluación del extracto etanólico de *Calea urticifolia* (mill.) Dc. Sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina. Programas Multidisciplinarios de posgrado en Ciencias Ambientales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Pocock Guilliam y Richards Christopher. (2005). Fisiología humana. La base de la medicina. 2ª Edición. Editorial Masson S.A

PROC-NT-002. Procedimiento normalizado de trabajo: Vías de administración y toma de muestras (rata y ratón). Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) Centro de Investigación d Desarrollo en Salud CENSALUD. Universidad de El Salvador.

Rhiouania, H.; El-Hilalya, J.; Israili, Z.H.; Lyoussia, B. (2008). Acute and subchronic toxicity of an aqueous extract of the leaves of *Herniaria glabra* in rodents. J. Ethnopharmacol 118, 378-386.

Robles, M., Argullin, M., West, J., Rodriguez, E. (1995). Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones. *Planta Med.* 61:199-203. Georg Thieme Verlag Stuttgart-New York.

Rzedowski J. y Calderón RG. (2008). Familia Compositae Tribu Heliantheae I (Géneros *Acmella-Jejea*). Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fascículo 157. Instituto de Ecología A.C. Centro Regional del Bajío Pátzcuaro, Michoacán, México en colaboración con CONACYT y CONABIO.

Sandoval Adrián G., Manzur Fernando, Gómez Doris, Gómez-A Claudio. (2009). Receptores nucleares y metabolismo de lípidos: implicaciones cardiovasculares. *Cardiología del adulto - revisión de temas. Revista Colombiana de Cardiología*. Vol. 16: 29-34. ISSN 0120-5633.

Steinbeck C, Spitzer V., Starosta M. and Gilsane von Poser. (1997). "Identification of Two Chromenes from *Calea serrata* by Semiautomatic Structure Elucidation" *J. Nat Prod.* V 60 pp 627-628.

Tejada Cifuentes F. (2010). Hepatotoxicidad por Fármacos. *Revista Clínica Médica Familiar*. 2010; 3 (3): 177-191

Toledo, R. A. (2002). Asociación de promotores comunales salvadoreños (APROCSAL), "Cincuenta especies de la flora medicinal existentes de El Salvador"

Umeruma K., Itoh T., Hamada N., Fujita Y., Akao Y., Nozawa Y. y col. (2008). Preconditioning by sesquiterpenelactone enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Nrf2/ARE activation. *Biochem .Biophys. Res. Commun.* 368: 948-954.

Wasan KM, Najafi S, Wong J, Kwong M. (2001). Assessing plasma lipid levels, body weight, and hepatic and renal toxicity following chronic oral administration of a water soluble phytostanol compound FM- 1806. *Afr.J.Biotechnol.VP4*, to gerbils. *J. Pharm. Sci.* (www.ualberta.ca/~csps) 4(3): 228-234

Watson WH, Dahm LJ, Jones DP. (2003). Mechanisms of chemically induced liver disease. En Zakim D, Boyer TD. *Hepatology. A text book of Liver Disease*. Philadelphia: Saunders p. 739-53.

Wolbold R, Klein K, Burk O, Nüssler AK, Neuhaus P, Eichelbaum M, Schwab M, Zanger UM. (2003). Sex is a major determinant of CYP3A4 expression in human liver. *Hepatology*; 38:978.

Wrighton SA, Stevens JC. (1992). The human hepatic cytochrome P450 involved in drug metabolism. *Crit Rev Toxicol* 22:1.

Yamada M., Matsuura N., Hiroto S., Chihiro K., Naoko H., Makoto U., y col. (2004). Germacranolides from *Calea urticifolia*. *Phytochemistry* 65: 3107-3111.

Yukawa E, Mine H, Higuchi S, Aoyama T. (1992). Digoxin population pharmacokinetics from routine clinical data: Role of patient characteristics for estimating dosing regimens. *J Pharm Pharmacol* 44:761.

Zapata Builes, Wildeman. Fajardo Rincon, Holtman Deiver. Disponible en:  
[http://www.microclin.com/archivos/manual\\_de\\_quimica\\_sanguinea\\_veterinaria\\_Zapata\\_Fajardo.pdf](http://www.microclin.com/archivos/manual_de_quimica_sanguinea_veterinaria_Zapata_Fajardo.pdf)

Zenaide, S. Ferreira, N. Gottlieb, O. Oliveira, F. and Gottlieb, H. (1980). "Structural Clarification of Germacranolides from *Calea* species." *Phytochemistry* 19: 1481-1484.

## X. ANEXOS.

### Anexo 1. Hoja de registro de peso corporal semanal.

Sustancia de ensayo: \_\_\_\_\_ Concentración o dosis: \_\_\_\_\_ Vía administración: \_\_\_\_\_

Especie: \_\_\_\_\_ Cepa: \_\_\_\_\_ Fecha inicio: \_\_\_\_\_ Fecha final: \_\_\_\_\_

GRUPO	ANIMAL	PESO INICIAL	SEM. 1	SEM. 2	SEM. 3	SEM. 4	SEM. 5	SEM. 6	SEM. 7	SEM. 8	SEM. 9	PESO FINAL	AUMENTO PORCENTUAL
Hembras Control	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
<b>PROMEDIO</b>													
Hembras Tratamiento	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
<b>PROMEDIO</b>													
Hembras Centinela	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
<b>PROMEDIO</b>													
Machos Control	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
<b>PROMEDIO</b>													
Machos Tratamiento	1												
	2												
	3												
	4												
	5												
<b>PROMEDIO</b>													
Machos Centinela	1												
	2												
	3												
	4												
	5												

## Anexo 2. Hoja de observaciones clínicas.

Protocolo: \_\_\_\_\_ Sustancia de ensayo: \_\_\_\_\_  
 Concentración o dosis: \_\_\_\_\_ Fecha inicio: \_\_\_\_\_ Fecha final: \_\_\_\_\_ Semana n°: \_\_\_\_\_  
 Vía administración: \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_ Cepa: \_\_\_\_\_ Edad inicial: \_\_\_\_\_  
 Grupo: control tratamiento centinela

Parámetro de Toxicidad	Animal	ANIMAL 1						ANIMAL 2						ANIMAL 3						ANIMAL 4						ANIMAL 5					
	Día	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Ataxia																															
Deshidratación																															
Diarrea																															
Parálisis																															
Pilo-erección																															
Respiración ▪																															
Salivación																															
Sialorrea																															
Tremores y convulsiones																															
Vasodilatación periférica																															
Vasoconstricción periférica																															
Actividad Motora ○																															
Apariencia de piel *																															
Ojos y membranas mucosas *																															
Reacción a estímulos ○																															

Clave:

- 0 Normal    1 Acelerada    2 Disminuida
- 0 Normal    1 Ausente        2 Exagerada
- \* 0 Normal    1 Enrojecimiento        2 Sequedad        3 Excesiva humedad

OBSERVACIONES

Responsable de la prueba. Silvia Pérez

### Anexo 3. Hoja de registros hematológicos y bioquímica clínica

Protocolo: \_\_\_\_\_ Sustancia de ensayo: \_\_\_\_\_

Vía administración: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_ Cepa: \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Grupo: Control Tratamiento Centinela

#### Examen hematológico y bioquímico.

N° ANIMAL	HEMATOLOGÍA					BIOQUÍMICA						
	HEMO	HEMA	RD LEUCO	RT LEUCO	RT ERI	GLU	COL	URE	CRE	BIL	ALAT	ASAT
1												
2												
3												
4												
5												
<b>MEDIA</b>												

CLAVE

HEMO: hemoglobina

HEMA: hematocrito

RD LEUCO: recuento diferencial de leucocitos

RT LEUCO: recuento total de leucocitos

RT ERI: recuento total de eritrocitos

GLU: glucosa

COL: colesterol

URE: urea

CRE: creatinina

BIL: bilirrubina

ALAT: Alanino aminotransferasa

ASAT: Aspartato aminotransferasa

Responsable de la prueba. Silvia Pérez

### Anexo 4. Hoja de observaciones post mortem

Protocolo: \_\_\_\_\_ Sustancia de ensayo: \_\_\_\_\_

Vía administración: \_\_\_\_\_ Especie: \_\_\_\_\_ Cepa: \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Grupo: Control Tratamiento Centinela

**Examen externo** (en caso de muerte no programada)

Condición corporal: Buena  Regular  Mala  Observaciones \_\_\_\_\_

Lesiones Si  No

Descripción \_\_\_\_\_

**Examen interno.**

ÓRGANO	Animal	SUPERFICIE					CONSISTENCIA					COLOR					TAMAÑO (mm)					PESO (g)					
		A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	A1	A2	A3	A4	A5	
HÍGADO																											
CORAZÓN																											
PULMONES																											
BAZO																											
RIÑÓN																											
ESTOMAGO																											
INTESTINO DELGADO																											
INTESTINO GRUESO																											

Clave.

Superficie: L. Lisa      A. Áspera      G. Granula      Ar. Arrugada

Consistencia: F. Firme      Q. Quebradizo      E. Esponjoso

Color: H. Homogéneo      M. Manchado

Responsable de la prueba. Silvia Pérez