

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



Toxicidad subcrónica a dosis repetidas del extracto de hojas de Juanilama *Calea urticifolia* (Miller) (Asteraceae) en ratones de laboratorio cepa NIH

Por:

Br. Marvin Wipfli Ramírez

CIUDAD UNIVERSITARIA, 19 DE NOVIEMBRE DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA



**Toxicidad subcrónica a dosis repetidas del extracto de
hojas de Juanilama *Calea urticifolia* (Miller) (Asteraceae) en
ratones de laboratorio cepa NIH**

Por:

Br. Marvin Wipfli Ramírez

REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

Licenciado en Medicina Veterinaria y Zootecnia

CIUDAD UNIVERSITARIA, 19 DE NOVIEMBRE DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR:

Lic. M. Sc. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

SECRETARIO GENERAL:

Lic. CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

Ing. M. Sc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO:

Ing. M. Sc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA

MVZ. Rosy Francis Alvarenga Artiga

DOCENTES DIRECTORES

MVZ. Ramón Oviedo Zelaya

Lic. Miguel Ángel Moreno Mendoza

COORDINADORA GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACIÓN

MVZ. María José Vargas Artiga

Resumen

El estudio completo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Utilizando 30 ratones *Mus musculus* 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 acuoso 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. Finalizados los días de administración, se tomaron muestras de sangre para los análisis de bioquímica clínica y exámenes hematológicos, luego se procedió a necropsia para la extracción de órganos y su análisis macroscópico.

Los grupos tratados con el extracto acuoso de *C. urticifolia* no manifestaron ningún signo característico como: deshidratación, piloerección, vasoconstricción periférica, disminución de la temperatura corporal. Pero si se observó en la necropsia: aumento de peso en algunos órganos (hígado, pulmones, bazo y riñón), del mismo modo se presentaron alteraciones en algunos de los parámetros bioquímicos como glucosa y TGO; también los parámetros hematológicos como hematocrito, recuento de eritrocitos y hemoglobina mostraron variaciones. No se recomienda la utilización del extracto para el tratamiento de enfermedades.

Palabras claves: *Calea urticifolia*, juanilama, toxicidad subaguda, ratones *Mus musculus*

Abstract

The complete study was performed in Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Using 30 mice *Mus musculus* Albinos strain NIH from the Animal Experimentation Laboratory, with a mean weight between 20 and 25 grams. They were maintained in a controlled temperature and relative humidity between $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y entre 50-60% respectively with a light/obscurity cycle of 12/12 hours, having five animals per cage. The toxicology study was performed in accordance to the guides 408 and 420 for use and husbandry from OECD (1998, 2001) Daily the water extract of *Calea urticifolia* was given at a 300 mg/kg dose using intragastric canula. Animals were then observed during the next four hours post administration. After the days of administration blood samples were taken for hematology and blood chemistry. After this necropsies were performed for the organ extraction and macroscopic analysis.

Neither of the treated groups showed typical signs as: dehydration, piloerection, peripheral vasoconstriction, corporal temperature loss. However during necropsies weight gain was found in some organs (Liver, spleen, lungs, kidneys) slight alteration of some biochemistry parameters like glucose and TGO, in hematology variation in hematocrit, hemoglobin and red blood cells counts were found. We do not recommend the use of the extract for any disease treatment.

Key words: *Calea urticifolia*, juanilama, sub-acute toxicity, mice *Mus musculus*

Agradecimientos

A Dios todopoderoso. Por la vida y todos sus dones gracias a los cuales he crecido y ahora puedo culminar este esfuerzo.

A mis padres Karl Josef Wipfli y María Rosa Ramírez que con esfuerzo y sacrificio me fueron educando y me dieron las bases para la vida. Gracias por haber creído siempre en mí. A mi hermano Welf mi primer amigo y compañero de travesuras.

A mis asesores, MVZ Oscar Luis Meléndez por haber iniciado este esfuerzo, por sus consejos y comentarios. Gracias por haberse esforzado a nuestro lado con sus enseñanzas y experiencia siempre nos animó a pensar en grande. Luego a MVZ Ramón Oviedo Zelaya por haber aceptado el reto de sumarse a este esfuerzo para llevarlo a término. Lic. Miguel Moreno Mendoza, por su paciencia al capacitarme y su confianza para permitirme desenvolverme en todas las áreas que requirió este estudio.

A todo el personal de CENSALUD, y compañeros que aquí conocí, Daniel, Rocío, Silvia Melany. Lic. Guillermo. Que con desinterés me ayudaron y compartieron sus conocimientos conmigo.

Docentes de la Facultad de Química y Farmacia, Laboratorio de Investigación en productos naturales, por su tiempo al capacitarme y permitirme el uso de sus instalaciones. Gracias por sus palabras de ánimo.

Docentes de la Facultad de Ciencias Agronómicas que con sus clases, asesorías, consejo han aportado su grano de arena para formarme.

Finalmente a todos mis compañeros que compartieron conmigo pero especialmente Denis Morales, que fué de gran apoyo mientras él a su vez terminaba su tesis. Daniel Hernández que siempre nos ha animado a seguir adelante. Y una lista de personas que es larga, Fernando Ramos, compañero de tertulias, Juan y Lidia que se interesan por mis avances y compartimos tiempo libre. Jackeline Serrano, por su paciencia, usted siempre ha sabido apoyarme en el momento oportuno ha tenido palabras que han servido para darme ánimo. Agradezco a todos aquellos que compartieron conmigo y en el transcurso del tiempo se fueron...

Gracias María Eva Leiva, por haber confiado en mí, gracias por apoyarme y darme aliento. Gracias por el tiempo.

Índice general

Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Agradecimientos	vi
Índice general	vii
Índice de tablas	ix
Índice de figuras	ix
Índice de figuras en anexos.....	ix
1 Introducción	1
2 Revisión bibliográfica.....	2
2.1 Generalidades de la familia Asteraceae.....	2
2.2 Género <i>Calea</i>	2
2.3 Especie <i>Calea urticifolia</i>	2
2.3.1 Taxonomía	2
2.3.2 Nombres comunes.....	3
2.3.3 Descripción botánica.....	3
2.3.4 Distribución de <i>Calea urticifolia</i>	3
2.3.5 Usos etnobotánicos	3
2.3.6 Sesquiterpenlactonas aisladas de <i>Calea urticifolia</i>	5
2.3.7 Actividades biológicas de <i>Calea urticifolia</i>	5
2.3.8 Actividades tóxicas de las sesquiterpenlactonas	6
2.3.9 Efectos tóxicos de sesquiterpenlactonas.....	7
2.4 Generalidades del ensayo toxicológico.....	9
2.4.1 Estudios subcrónicos.....	10
2.4.2 Uso de animales de experimentación	10
2.4.3 El ratón de laboratorio	10
2.5 Toxicología.....	12
3 Materiales y métodos	13
3.1 Metodología de laboratorio	13

3.1.1	Animales de experimentación.....	13
3.1.2	Extracto acuoso	14
3.1.3	Toxicidad subcrónica a dosis repetidas, por 90 días	15
3.1.4	Sacrificio y necropsia	16
3.2	Metodología estadística.....	17
4	Resultados y discusión.....	17
4.1	Peso corporal.....	17
4.2	Hematología	19
4.3	Bioquímica sanguínea	23
4.4	Peso de órganos	25
5	Conclusiones	28
6	Recomendaciones.....	28
7	Bibliografía	29
8	Anexos	33

Índice de tablas

Tabla 1: Usos etnobotánicos del Juanislama <i>Calea urticifolia</i>	4
Tabla 2: Efecto del extracto acuoso de <i>Calea urticifolia</i> en el peso corporal	17
Tabla 3: Efecto del extracto acuoso de <i>C. urticifolia</i> en los parámetros hematológicos	19
Tabla 4: Efecto del extracto acuoso de <i>C. urticifolia</i> en los parámetros de bioquímica sanguínea.....	23
Tabla 5: Efecto del extracto acuoso de <i>C. urticifolia</i> en el peso de órganos.....	25

Índice de figuras

Figura 1: Promedio de ganancia de peso semanal, ratones machos	18
Figura 2: Promedio de ganancia de peso, ratones hembras	18
Figura 3: Cantidad de hemoglobina en hembras (g/dL)	21
Figura 4: Hematocrito en hembras (%).....	21
Figura 5: Eritrocitos en hembras (10e6/ μ L)	22
Figura 6: Glucosa en machos mg/dL	24
Figura 7: Valores de TGO en machos U/L	24
Figura 8: Peso en gramos de estómago, hembras.....	26
Figura 9: Peso en gramos de intestino delgado, hembras.....	27
Figura 10: Peso en gramos de intestino grueso, hembras.....	27

Índice de figuras en anexos

Figura A- 1: Distribución de <i>Calea urticifolia</i>	33
Figura A- 2: Arbusto de <i>Calea urticifolia</i> , tallo, hoja y flor	34
Figura A- 3: Ratones marcados en jaula	35
Figura A- 4: Esquema de grupos experimentales usados en la investigación.....	35
Figura A- 5: Ratón sano de laboratorio.....	35
Figura A- 6: Administración de sustancia por canulación	36
Figura A- 7: Colecta de sangre del seno retro orbital.....	36
Figura A- 8: Proceso de necropsia	36
Figura A- 9: Preparación de extracto acuoso.....	36

1 Introducción

Las plantas medicinales son una fuente muy importante de sustancias con actividad biológica y por ello es necesaria su investigación para poder utilizarlos con seguridad y racionalmente. 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 y se utiliza además para saber si una sustancia conlleva o no riesgos lo bastante bajos para justificar su utilización.

El Juanilama (*Calea urticifolia*) es utilizada en nuestro país para tratar una gran diversidad de enfermedades, es una especie profundamente estudiada desde el punto de vista químico, pero carece de un estudio de su extracto completo que determine sus efectos sobre la salud de la población que la utiliza sin dosificación y por tiempo indefinido.

En el estudio toxicológico, se administró el extracto acuoso de *Calea urticifolia* en ratones NIH durante un periodo de 90 días, durante los cuales se realizó chequeo clínico diario, control de peso de los animales. Al término de los días estipulados se evaluaron parámetros sanguíneos: pruebas hematológicas y bioquímicas, necropsias y examen macroscópico de órganos. Todo esto con el propósito de detectar posibles efectos nocivos post administración, debido a evidencias científicas de daño renal provocado por extracto clorofórmico de hojas de *Calea urticifolia*

Para obtener los extractos se trabajó en el laboratorio de Investigación en Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia. Mientras el ensayo toxicológico se realizó en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) en el edificio de CENSALUD.

Las determinaciones sanguíneas finalmente se realizaron en el laboratorio de Química Clínica del Hospital Nacional Rosales.

2 Revisión bibliográfica

2.1 Generalidades de la familia Asteraceae.

La familia de las compuestas (Compositae o Asteraceae) está conformada por más de 1000 géneros y más de 20000 especies, es una de las familias de plantas más importantes, formadoras de semillas, que presentan una variedad morfológica grande, así como su hábitat, sus formas vitales y la dispersión de sus frutos, se encuentran muy distribuidas tanto en zonas semidesérticas como tropicales, y hasta en países árticos, pero es más importante su distribución en zonas templadas o subtropicales que no están densamente pobladas de árboles. Es la familia evolutivamente más exitosa dentro de las plantas con flores. La continua expansión de la familia ha sido acompañada por diversos cambios fitoquímicos que le han permitido desarrollar y explorar nuevos mecanismos defensivos como: alcaloides, conductos laticíferos, olores, etc (Gallego 2000).

Según Gallego, estas familias fitoquímicamente, almacenan carbohidratos como oligosacáridos, incluyendo a la inulina. Usualmente, en las especies de la familia están presentes los poliacetilenos, los aceites aromáticos terpenoides y, quimiotaxonomicamente, su característica más importante, la presencia de sesquiterpenlactonas (STLs).

La familia incluye plantas alimenticias, medicinales, ornamentales e industriales, a la par de las malezas e incluso encontramos muchas plantas tóxicas (Ong 2005).

2.2 Género *Calea*

Es un género botánico de la familia de las Asteráceas que comprende 148 especies. Tiene una distribución neo tropical esta eco zona incluye América del Sur y Central, las tierras bajas de México, el Caribe, y el sur de Florida (Picman 1986).

2.3 Especie *Calea urticifolia*

2.3.1 Taxonomía:

Reino: *Plantae*

Filo: *Tracheophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Asterales*

Familia: *Asteraceae*

Género: *Calea*

Especie: *urticifolia*

2.3.2 Nombres comunes

Juanislama (El Salvador y Ecuador); Amargón, Calea, Hoja de empacho (El Salvador); Chirivito (Honduras); Jalacate, Jaral (Costa Rica); Murupo, Murupo de perro (Nicaragua); Jaral de castilla, Chilchaca, Jarilla, Tacote, Hierba del negro, Hierba del perro, Negro, Negrito chichiquizo, Matacucuyuchi (México).

2.3.3 Descripción botánica

Es un arbusto de 1 a 3 m de altura, que llega a medir hasta 3.5 m de alto, algunas veces leñoso en la base del tallo, con ramas opuestas; hojas sencillas estrechas o ampliamente ovadas, rara vez lanceoladas, agudas o semi agudas, redondeadas en la base, de textura membranácea a cartácea, verde oscura, por lo general rasposa y rugosa en el haz, trinerviadas, a menudo lustrosas en ambas caras, flores amarillo brillantes a veces de color crema, reunidas en capítulos dispuestos en inflorescencias umbeliformes (Figura A-2) (Ortiz 2011).

2.3.4 Distribución de *Calea urticifolia*

Ampliamente distribuida, pudiendo encontrarse desde Panamá hasta el norte de México (Figura A-1) (Rzedowski & Calderón, 2008). Es una planta de clima cálido y semi cálido 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).

2.3.5 Usos etnobotánicos

Popularmente, las plantas medicinales en El Salvador se han utilizado en la curación de muchas enfermedades comunes por la población mediante una amplia variedad de remedios caseros que se han transmitido por generaciones desde tiempos remotos. Así, *C. urticifolia*, es una de las plantas medicinales más utilizadas por los salvadoreños para el alivio de ciertos padecimientos, los cuales se enlistan en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1: Usos etnobotánicos de *Calea urticifolia*

Enfermedad	Órgano vegetal utilizado	Procedimiento para la elaboración	Vía de administración	Posología
Artritis	Hojas secas	Conocimiento de unas 9 hojas	-Oral -Baños locales calientes y fomentos	3 taza/d 3-4 veces/d
Fiebres	Hojas secas	Cocimiento de 6 hojas y 2 cucharadas de manzanilla picada (o medio manojo)	Oral	1 taza
Cáncer	Hojas secas	Cocimiento de 7-10 hojas; no usar más para que sea soportable lo amargo	Oral	
Coloradías (ácaros)	Hojas secas o frescas	Extractos de varias hojas bien deshechas porque son carrasposas	Restregamiento	1-2 veces/d
Diabetes	Hojas secas o frescas	Unas 7-10 hojas enteras	Oral	2-3 taza/d
Dismenorrea	Hojas secas o frescas	Cocimiento, usar 1 a 2 hojas	Oral, ¡cuidado si se toma mucho arde el estómago!	
Leucorrea	Hojas secas	Cocimiento de unas 2-3 hojas por botella; no ocupar más porque es muy amarga	Oral, cuidado	3-4 taza/d
Mazamorra	Hojas secas o frescas	Picar unas 20 hojas sanas; agregar unos 3-5 chiles rojos y ¼ penca de sábila; mezclar con manteca de cuche o vaselina simple y freír	Tópico	1-2 veces/d
-Cólicos -Dolor de estomago -Ulceraciones -Heridas infectadas -Hiperacidez -Cáncer -Diabetes -Artritis -Enfermedades hepáticas y de riñones -Diarreas -Anginas -Bronquitis -Empacho -Náuseas	Hojas secas o frescas	7 hojas se colocan en media botella de agua y se macera	Oral	Se toma con agua de tiempo

Fuente: CENSALUD. s.f

2.3.6 Sesquiterpenlactonas aisladas de *Calea urticifolia*

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 (Villacencio 2001, Martínez 2001).

Las sesquiterpenlactonas son derivadas biogénicamente 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 (Lock 1994).

En 1980, se aislaron ocho sesquiterpenlactonas del extracto clorofórmico de las partes aéreas de *C. urticifolia* denominadas como: 2f, 2g, 2h, 4a, 4b, 4c, 4d y 4e, sus estructuras fueron determinadas por medio de técnicas espectroscópicas (Hasegawa 2005). A nivel nacional, se aislaron y elucidaron, también en 1980 cuatro germacranólidos (Juanislamina, 2,3-epoxijuanislamina, Caleína D y 2,3 epoxicaleina D) de las hojas de *C. urticifolia* (Genovez 1980).

2.3.7 Actividades biológicas de *Calea urticifolia*

2.3.7.1 Efecto citotóxico

En 2004 se ensayaron seis sesquiterpenlactonas (Germacranolidos) de *Calea urticifolia* in vitro para ver su actividad citotóxica sobre células tumorales humanas de las líneas HL60 (Leucemia) y SW480 (cáncer de colon). Entre ellos el arucanólido y el partenólido mostraron marcada citotoxicidad contra ambas líneas celulares (Nakagawa 2005).

2.3.7.2 Efecto antiadipogenesis

Se evaluaron siete sesquiterpenlactonas presentes en el extracto etanólico de *Calea urticifolia* frente a la inhibición de la adipogénesis a concentraciones de 1.25-5 μM , resultando ser la más activa la Calealactona B, con valores de inhibición de lípidos de CME de 1.25 μmol y IC50 de 7.0 μmol , en células 3T3-L1 (células de fibroblasto de embrión de ratón) y ninguna actividad de unión no específica a proteína. Estos resultados indican que

estos germacranólidos son inhibidores específicos de diferenciación de preadipocitos. (Nobuyasu *et al*)

2.3.7.3 Efecto Hipoglucemiante e hipolipemiante

Recientemente en una tesis de maestría en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí se administraron una vez al día por 6 meses, macerados etanólicos de la hojas de *Calea urticifolia*, a ratas cepa Wistar inducidas a proceso inflamatorio de bajo grado y fueron analizados los parámetros bioquímicos por métodos enzimáticos colorimétricos. El extracto etanólico de *Calea 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- α . Adicionalmente el extracto incrementó los niveles de insulina circulante, lo cual puede interpretarse como que el extracto funciona como secretagogo, es decir, que presenta la capacidad de inducir la secreción de la hormona en la célula β pancreática (Ortiz, 2011).

2.3.8 Actividades tóxicas de las sesquiterpenlactonas

2.3.8.1 Mecanismos generales de toxicidad

Existen tres grupos principales de sesquiterpenlactonas que pueden considerarse: sesquiterpenlactonas alquilantes, no alquilantes y neurotóxicas. Que ejercen sus efectos tóxicos a través de diferentes mecanismos: alquilación de proteínas, la alquilación y daño oxidativo al ADN, el antagonismo de los receptores de GABA y glicina, la inhibición de la bomba SERCA, la inducción de reacciones de hipersensibilidad y la desregulación de los mecanismos epigenéticos. sesquiterpenlactonas alquilantes (son la gran mayoría), pueden comportarse como haptenos que al reaccionar con proteínas originan complejo hapteno-portador que es reconocido por el sistema inmune y provoca reacciones inmunes no deseadas de hipersensibilidad (Ong 2005, Post 1992). También alteran las funciones de numerosas proteínas que contienen cisteína causando variedad de lesiones en diferentes sistemas u órganos e inducen la acumulación de ROS (Ong 2005).

Las sesquiterpenlactonas no alquilantes actúan a través de la inhibición de enzimas que transportan Ca⁺ (Bomba SERCA). El calcio es librado del retículo endoplásmico aumentando los niveles de calcio citosólico. El incremento de niveles de Ca conduce a la alteración de numerosas funciones relacionadas, por ejemplo, causan estrés mitocondrial aumentando la liberación de ROS de las mitocondrias (Ong 2005).

2.3.8.2 Mecanismos de toxicidad de sesquiterpenlactonas

- Glutación y alquilación de proteínas resultando en aumento de estrés oxidativo y cambios funcionales de proteínas alquiladas.
- Alquilación de ADN puede llevar a mutaciones genéticas
- Proteínas alquiladas son reconocidas por sistema inmune y provoca reacciones de hipersensibilidad
- Estrés oxidativo es aumentado y lleva al daño oxidativo del ADN
- Inhibición de la bomba SERCA, resulta en acumulación de Ca citosólico, que interrumpe la homeostasis mitocondrial.
- Antagonismo alostérico no competitivo de receptores GABA en la entrada de Cl⁻ en la célula. (Ong 2005)

2.3.9 Efectos tóxicos de sesquiterpenlactonas

2.3.9.1 En el ganado

Numerosos estudios demuestran que las sesquiterpenlactonas son altamente irritantes en animales que consumen plantas ricas en este tipo de metabolitos secundarios, en especial las pertenecientes a la familia asteráceae, principalmente irritan la nariz, ojos y aparato gastrointestinal (Barrera 2010).

De hecho, las sesquiterpenlactonas son responsables de varios efectos tóxicos diferentes en mamíferos, con pérdidas de ganado que se presentan especialmente en ovejas y caballos, ya que estas especies son más comúnmente expuestas a las plantas que contienen sesquiterpenlactonas debido a sus hábitos de pastoreo y escases de los pastos (Cornell University 2014).

El envenenamiento se refiere a menudo como “enfermedad que arroja” debido a que provoca vómito. Las ovejas afectadas pueden tener una mancha verde alrededor de la boca. El material vomitado es inhalado a menudo hacia los pulmones, causando la muerte por que provoca el daño en el pulmón de carácter permanente acompañado de tos crónica. Las lesiones primarias son irritación del aparato gastrointestinal, congestión del hígado y del riñón y daño pulmonar (Barrera 2010) (Gupta 1995).

2.3.9.2 Sistema nervioso central

En el sistema nervioso central los síntomas se presentan como la enfermedad de Parkinson e incluyen una alimentación alterada, hipertonia de labios y lengua, trastornos del movimiento facial, masticación innecesaria, depresión, debilidad, hipocinesia, hiperquinesia y, finalmente, la muerte. Diferentes estudios realizados indican que la toxicidad a nivel de SNC es selectiva hacia los caballos más que para cabras y ovejas, ya que éstas no se ven afectadas a nivel de este sistema a pesar que pastan en las mismas plantas. No se ha especificado con exactitud pero es posible que algunos procesos de desintoxicación que se producen en los compartimentos gástricos de los rumiantes, les permite evitar la enfermedad, mientras que los caballos, al ser monogástricos, siguen en peligro (Ong. 2005).

2.3.9.3 Sistema cardiovascular

A nivel cardiovascular, los efectos tóxicos se han mostrado en el músculo liso del corazón y en el miocardio. Así, distintas preparaciones vegetales ricas en sesquiterpenlactonas han sido evaluadas en conejos y cerdos de guinea para determinar el daño toxico generado.

La sesquiterpenlactona Partenólida, aislada de *Tanacetum parthenium* en 1993 fue la causante del efecto inhibitorio de la contractilidad del músculo liso en aorta de conejos (Amorin 2013) (Ong 2005). La *Eupatorium rugosum* (nombre común: Serpentaria blanca; Familia: Asteraceae), en un estudio llevado a cabo en 1997, fue consumida por caballos, provocando necrosis del músculo del corazón. La Helenalina ejerce una actividad inotrópica positiva en preparaciones de miocardio de cerdo de guinea y, cuando se administra en dosis más altas, ejerce una irreversible actividad inotrópica negativa (Herz 1980).

2.3.9.4 Sistema renal

La toxicidad de los dos extractos de hojas de una hierba nativa de los Andes conocida como Yacón (*Smilax sonchifolius*; Familia: Asteraceae) rica en sesquiterpenlactonas, fue evaluada recientemente en un estudio de dosis repetidas en ratas Wistar durante 90 días. En varios países alrededor del mundo, entre ellos Brasil, sus raíces son utilizadas como alimentos dietéticos, y las hojas son útiles en la medicina popular para el tratamiento de trastornos hiperglucémicos de la diabetes mellitus. Los investigadores informaron de los parámetros bioquímicos alterados en muestras de sangre periférica que sugieren daño renal (Ong. 2005).

Los análisis bioquímicos demostraron mayores niveles de AST (aspartato aminotransferasa), triglicéridos, albúmina, proteínas totales, creatinina, la cual presente en suero es un indicador de un daño, y la glucosa, que en casos de enfermedad crónica tiende a aumentar (Ong 2005).

2.3.9.5 Hígado y tracto gastrointestinal

De las vías gastrointestinales y del hígado, las sesquiterpenlactonas son irritantes de las mucosas y se cree generalmente que la mayoría de estos tienen una actividad gástrica irritante (Heinrich 1998) (Ong 2005) (Post 1992). La sesquiterpenlactona Vernolepina, aislada de *Vernonia amygdalina*, un miembro de la Familia Asteraceae, en un estudio fue administrada a conejillos de indias presentando efectos potenciadores e inhibitorios sobre la contractilidad del músculo liso intestinal (Itoigawa 1987) (Ong 2005).

2.3.9.6 Dermatitis e irritación en la piel

Varias sesquiterpenlactonas (no alquilantes) aumentaron las concentraciones de Ca²⁺ citoplásmico, dando lugar a una amplia desgranulación de los mastocitos y la liberación de histamina, que resulta en irritación de la piel (Ohguchi 2009) (Ong 2005) (Perdomo) (Post 1992).

Las STLs parecen ser los principales alérgenos de plantas, pero también hay evidencia de que algunos monoterpenos emitidos pueden estar involucrados en la dermatitis de las Asteráceas (Ong 2005).

2.4 Generalidades del ensayo toxicológico

La mayoría de pruebas de toxicidad son llevadas a cabo en el contexto de requerimientos regulatorios sobre diferentes tipos de químicos en distintas partes del mundo. Las entidades reguladoras muchas veces enfatizan en la necesidad del estudio toxicológico para preservar la salud humana y animal, así como la protección del ambiente (Nuffield Council on Bioethics 2005).

La toxicidad tiene dos componentes principales: el efecto causado y el nivel de exposición (dosis) en el cual el efecto se observa. Algunas pruebas se diseñan específicamente para detectar un efecto particular, por ejemplo irritación dérmica u ocular, sensibilidad dérmica y estudios de mutagenicidad. Otras pruebas como estudios subcrónicos y crónicos se diseñan para detectar un rango amplio de efectos menos específicos en órganos y sistemas

corporales y el rango de dosis en los cuales los efectos se desarrollan (Nuffield Council on Bioethics 2005).

2.4.1 Estudios subcrónicos

Estos son estudios toxicológicos a dosis repetidas, estos tienen tres objetivos (i) identificar la toxicidad resultante luego de exposiciones continuas al químico (ii) identificar los órganos más afectados y (iii) determinar las dosis a las cuales ocurren los efectos (Nuffield Council on Bioethics 2005).

2.4.2 Uso de animales de experimentación

Los estudios de toxicidad son conducidos para determinar el grado de toxicidad de sustancias hacia el ser humano, el animal o el medioambiente, para la investigación del mecanismo toxico de químicos o para desarrollar nuevos o mejorar pruebas de efectos inducidos químicamente. Esto incluye: examen de efectos adversos que pueden ocurrir con una primera exposición a una dosis única de una sustancia (estudios agudos de toxicidad), estudios que buscan determinar el potencial de sustancias para interactuar con material genético “genotoxicidad”, pruebas cuyo objetivo es determinar si la toxicidad ocurre luego de la exposición constante a una sustancia: estudios de toxicidad a dosis repetidas, pruebas que desean descubrir si los canceres se desarrollan como resultado de exposición a ciertos químicos, estudios que se aseguran de la seguridad de medicinas (Nuffield Council on Bioethics 2005).

2.4.3 El ratón de laboratorio

Comúnmente es llamado ratón casero o doméstico, *Mus musculus* pertenece al orden Rodentia, familia Muridae. Los individuos adultos usualmente pesan entre 25 y 40 gramos, se conocen variedad de colores, incluyendo albinos, negros, cafés y grises (Figura A-3). Se ocupan más ratones que cualquier otro mamífero en investigación. Estos tienen atributos que los hacen muy valiosos para investigación, desde un periodo de vida corto, corto tiempo de gestación, camadas abundantes, gran variedad genética. Cada una de estas características permite adaptar al ratón a campos de investigación muy específicos. Sus aplicaciones más comunes en biomédica incluyen: enfermedades infecciosas, oncología, condiciones autoinmunes, inmunología, descubrimiento de nuevas drogas, seguridad de productos. Finalmente comparadas a otras especies su bajo costo y fácil mantenimiento los hace ideales para estudios de toxicidad y carcinogenicidad de varios compuestos donde se necesita gran número de animales para proveer datos estadísticos válidos (Hrapkiewicz 2013).

2.4.3.1 Alimentación

Usualmente el ratón consume 4-5 gramos de dieta sólida al día. Es recomendable suministrar una dieta comercial para roedores. Esta debe contener al menos 16% de proteína y de 4% a 5 % de grasa. Los alimentos deben darse siempre frescos y respetando los tiempos de caducidad establecidos por los fabricantes. El alimento es ofrecido en forma de pellets secos y a libre consumo. El ratón es coprófago, consumiendo sus propias heces como fuente significativa de vitaminas del complejo B y otros nutrientes. El ratón adulto bebe de 6-7 ml de agua por día, esta debe estar disponible ad libitum, sea en botellas con nipples o bebederos automáticos (Hrapkiewicz 2013).

2.4.3.2 Identificación

Uso de tarjetas en cada jaula así como la identificación de cada animal por jaula. La identificación temporal puede lograrse mediante uso de colorantes o tintas.

2.4.3.3 Recuentos hematológicos del ratón

Glóbulos rojos: Es el conteo de eritrocitos en un volumen dado de sangre entera. Estos métodos de conteo son mediante equipos automatizados, contados mientras fluyen por una apertura en una sola fila sea mediante impedancia o tecnologías ópticas. (Hedrich et al. 2004) Los recuentos tienen un rango de 7 a 11 x 10¹²/L (Hedrich et al. 2004). Según Schalm el recuento es de 10.1 x 10⁶/μL en machos y una media de 9.98 x 10⁶/μL en hembras.

Hemoglobina: su concentración es la medición de hemoglobina total por volumen de sangre entera, siendo sus rangos de 130 a 180 g/L. Según Shalm su concentración es 14.6 g/dL en machos y hembras

Hematocrito: es la medición del volumen de glóbulos rojos como un porcentaje de sangre entera. El porcentaje de sangre compuesto de eritrocitos es el hematocrito. Los valores para ratones son generalmente de 0.40 a 0.50 con mayores de 0.60 dependiendo del sitio de toma de muestra y el estado de ayuno (Hedrich *et al.* 2004).

Volumen Celular Medio o MCV: es el tamaño promedio de glóbulos rojos. Este índice puede ser medido o calculado. En el ratón las medias son de aproximadamente 40 a 55fl.

Concentración media de Hemoglobina: Es la concentración de hemoglobina dividida entre el hematocrito, siendo entonces el promedio de concentración de hemoglobina en todos los glóbulos rojos. Es mucho más relevante porque es más sensitivo a cambios que afectan los glóbulos rojos. Su rango es entre 260 a 320 g/L (Hedrich *et al.* 2004).

2.5 Toxicología

Es el estudio de los venenos, incluidos sus propiedades químicas y sus efectos biológicos, el diagnóstico y tratamiento de los organismos afectados por venenos son incluidos en este campo de estudio. Cualquier sustancia debe acceder a los procesos sistémicos del cuerpo antes de ejercer efecto tóxico. La cantidad de la sustancia que penetre el animal determina el efecto (si lo hay) y su intensidad. Esto es dosis-respuesta (Plumlee Clinical veterinary toxicology).

Una vez que el animal ha sido expuesto a la sustancia cuatro eventos tienen lugar: Absorción, distribución, metabolismo y excreción. Por absorción se entiende cuanto de la sustancia entra al cuerpo en un periodo de tiempo. Una vez absorbido la sustancia se distribuye a los diferentes órganos del cuerpo, esto es basado en múltiples variables. Una vez distribuida la sustancia puede ser metabolizada, en esto se considera al hígado como el mayor órgano metabólico, pero otros sistemas como piel, riñones, tracto gastrointestinal tienen poderes metabólicos significativos. Una vez ocurrió o no el metabolismo ocurre la eliminación de la sustancia (Plumlee Clinical veterinary toxicology).

Según Plumlee Clinical veterinary toxicology los cuatro eventos se describen como:

- **Absorción:** para que una sustancia ajena tenga un efecto tóxico, primero debe acceder sus sitios de acción y para ello debe cruzar múltiples membranas corporales. Una de ellas es la gastrointestinal, esta vía es normalmente de menor exposición, dependiendo de sus características fisicoquímicas múltiples eventos pueden ocurrir, algunas sustancias son inestables en la acidez estomacal, si esto les destruye minimiza su absorción. Otras sustancias se absorbe ya en el estómago, otras sustancias pasan al intestino delgado desde donde pueden ser degradados y absorbidos por la mucosa intestinal y de ahí a la sangre. La circulación portal los lleva al hígado, uno de los mayores órganos metabólicos del cuerpo, ciertas moléculas no absorbidas pueden pasar a intestino delgado y luego al intestino grueso.
- **Distribución:** al ser absorbida a través de las barreras corporales la sustancia entra la sangre y puede ser distribuida a todos los órganos y tejidos. La sustancia dejara la sangre y entrara en tejidos a diferentes velocidades.

- **Metabolismo:** casi todos los órganos tienen habilidad de metabolizar al menos una sustancia externa, pero es el hígado que posee la mayor capacidad metabólica sin importar la especie, aunque otros órganos como riñón, tracto gastrointestinal, piel, corazón y cerebro también poseen capacidades metabólicas considerables.
- **Excreción:** es el último paso en e implica la remoción de la sustancia del cuerpo por múltiples vías, la más común es vía urinaria, aunque existen otras vías importantes como por ejemplo, heces fecales, vía leche, fluido cerebroespinal, sudor y saliva

3 Materiales y métodos

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

3.1 Metodología de laboratorio

3.1.1 Animales de experimentación

Se utilizaron 30 ratones (15 de cada sexo) de la cepa NIH, procedentes del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de CENSALUD, donde se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad relativa entre 50-60%, y ciclo de luz - oscuridad de 12/12 horas

Los ratones seleccionados fueron destetados a los 21 días de nacidos y alcanzaron un peso promedio de 22 gramos, se crearon seis grupos de cinco individuos, dejando tres grupos de hembras y tres grupos de machos, totalizando 30 animales. Los grupos fueron llamados, control, tratamiento y centinela (Figura A-4).

Se marcó a cada uno de los animales en cada jaula de los tres grupos con ácido pícrico, que colorea de amarillo el pelaje 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 dieta estándar a base de concentrado pelétizado para ratones y agua a libre consumo.

3.1.2 Extracto acuoso

3.1.2.1 Obtención de hojas de *Calea urticifolia*

Se recolectaron las hojas de una jardinera de la Facultad de Química y Farmacia (Figura A-2). Se secaron a claridad por una semana y luego en estufa para su secado completo en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia. Se molieron para obtener un pulverizado el cual se conservó en bolsas plásticas con su respectiva identificación.

3.1.2.2 Preparación del extracto acuoso

Una semana antes de iniciar la prueba de toxicidad se preparó el extracto acuoso de *Calea urticifolia*. Para esto se colocaron 1000 ml de agua destilada en un beaker de 2000 ml de capacidad sobre un Hot Plate a 300° C. Una vez se alcanzó una ebullición fuerte se agregaron 100 gramos de hojas secas y molidas de *Calea urticifolia* que se dejaron en decocción por 20 minutos. Transcurrido este tiempo retiramos el beaker del Hot Plate y dejamos enfriar por 10 minutos. Se procedió a colar la solución para eliminar las partículas grandes de la solución. Una vez terminado este proceso la solución fue pasada por papel filtro para eliminar partículas finas de la solución (Figura A-8).

Concluido con este proceso se llevó la solución al Genevac para obtener el extracto acuoso. Para esto se pesaron los Holders del Genevac con tubos de ensayo pyrex vacíos nuevos. Luego se procedió a llenar los tubos de ensayo buscando un equilibrio entre ambos Holders. Logrado esto se colocaron los tubos en sus Holders al interior del Genevac para iniciar el ciclo de extracción del agua de la solución a una temperatura de 40° C y a ocho mil rpm, durante 13 horas. Al terminar el ciclo de extracción los tubos fueron sacados, pesados nuevamente para obtener los porcentajes de rendimiento de la solución. Se procedió a sellar los tubos y posteriormente fueron llevados a cámara refrigerante entre 2° y 5° C.

Cada 15 días se preparó el extracto de *Calea urticifolia* a ser empleado para preparar las diluciones.

3.1.2.3 Preparación de las diluciones

Se tomaron los pesos semanales de los grupos en tratamiento y se calculó el peso promedio de los grupos en tratamiento. En base a este peso promedio se calculó la dosis de 300 mg/kg que estuvo contenida en 0.2 ml que se suministraron a cada ratón. Finalizados los

cálculos se extrajo la cantidad necesaria de extracto de los tubos de ensayo, pesando esto en balanza analítica en un beaker de 50 ml. Al tener el peso requerido de extracto, se agregó 5 mL de agua destilada y se llevó al sonicador por 90 minutos para disolver a totalidad el extracto, agitando ocasionalmente esta dilución. Una vez se logró la disolución se colocó la dilución en un balón y se aforo a 10 ml. Estas soluciones fueron llevadas a refrigeradora entre 2 y 5 °C.

3.1.3 Toxicidad subcrónica a dosis repetidas, por 90 días

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 Organization for Economic Cooperation and Development (OECD 1998, 2001)

3.1.3.1 Administración de sustancia

Al grupo control se le administro mediante cánula intragástrica 0.2 ml de agua destilada diariamente. Los grupos tratamiento y centinela al ser canulados recibieron 300 mg/kg contenidos en 0.2 ml de solución de extracto acuoso de *Calea urticifolia* (Figura A-6). La solución fue preparada en los laboratorios de investigaciones de productos botánicos de la Facultad de Química y Farmacia bajo la supervisión del equipo de docentes a cargo del laboratorio

3.1.3.2 Examen clínico

El examen clínico consistió en la verificación de la apariencia del ratón, observando los parámetros siguientes: pelo sano, sin pilo erección ni caída, piel sin enrojecimiento ni palidez evidente, apariencia de las membranas mucosas y ojos sin secreciones anormales, sin salivación, evaluación de su reacción a estímulos como tacto o ruido, y actividad normal, sin deshidratación ni diarrea (Figura A-5).

Previa a la administración diaria del extracto de *Calea urticifolia* fueron evaluados los parámetros antes descritos para comprobar la evolución de cada uno de los individuos en estudio, garantizando su salud y su bienestar. Se realizó una toma de pesos una vez por semana a lo largo de todo el ensayo.

3.1.3.3 Toma de muestras: examen hematológico y bioquímica sanguínea

Concluidos los 90 días de duración de la prueba toxicológica se procedió a la recolección de muestras sanguíneas de cada uno de los animales para su envío a laboratorio para obtener hemograma y química sanguínea de cada uno de los sujetos del estudio es decir 30

muestras. Se evaluaron los valores hemáticos y bioquímicos de los sujetos posterior al consumo de la sustancia.

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 sujetó al ratón estirando la piel del cuello hacia atrás asegurándose de no dificultar la respiración y se insertó el capilar tratado con anticoagulante (EDTA) en el ángulo externo del ojo (Canto lateral del ojo) seno retroorbital (2 mm aproximadamente) girando suavemente hasta que la sangre fluía por el mismo. Una vez recogiendo la muestra de 0.2 ml en el tubo Ependorf se retiró el capilar. Posterior se aplicó pomada oftálmica o en su defecto violeta de genciana al 1% al ojo (Figura A-7).

Se determinó el conteo de hemoglobina, hematocrito, recuento diferencial de leucocitos, recuento total de leucocitos y recuento total de eritrocitos. En la parte bioquímica se midió: glucosa, Alanino amino transferasa (ALT), Aspartatoaminotransferasa (AST), 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.

3.1.4 Sacrificio y necropsia

Un día después de la toma de muestra de sangre se procedió al sacrificio de los animales mediante dislocación cervical. Seguidamente se realizó la necropsia de cada uno de ellos buscando daños evidentes en sus órganos internos, observación macroscópica de: apariencia del gano, superficie, consistencia, y color de cada órgano. Se extrajeron el estómago, intestinos, hígado, bazo, riñones, corazón y pulmones de cada uno de ellos, los órganos fueron examinados, medidos, pesados y conservados en formalina al 10% (Figura A-8).

El grupo centinela se mantuvo con vida 30 días más, posteriores al período de administración. Al cabo de este tiempo se procedió a la necropsia de igual manera que los grupos anteriores, esto para determinar si existe reversibilidad de los efectos tóxicos.

3.2 Metodología estadística

Los datos obtenidos fueron evaluados estadísticamente con el software SPSS versión 21 donde se compararon los resultados obtenidos entre el grupo control y los grupos tratamientos, mediante un análisis de “T”-Student para muestras independientes y muestras relacionadas para los pesos corporales. Se consideró que la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control fue significativo (*) cuando $p < 0,05$. Los resultados son expresados como la media + la desviación estándar de los grupos experimentales.

4 Resultados y discusión

Las observaciones clínicas diarias realizadas a los animales en estudio, animales controles a los que se suministró agua destilada y los animales tratados con extracto acuoso de *Calea urticifolia*, a una dosis de 300 mg/kg no mostraron alteración en cuanto a la aparición de alguno de los parámetros toxicológicos evaluados como lo fueron alteraciones del peso corporal, valores hematológicos y bioquímica sanguínea.

4.1 Peso corporal.

En la Tabla 1 se observa el comportamiento de peso durante el ensayo, observando para ambos sexos diferencias significativas para machos y hembras tratamientos comparadas a los controles de cada sexo. Asimismo únicamente se observa diferencias significativas en el peso de los machos centinelas respecto a los controles.

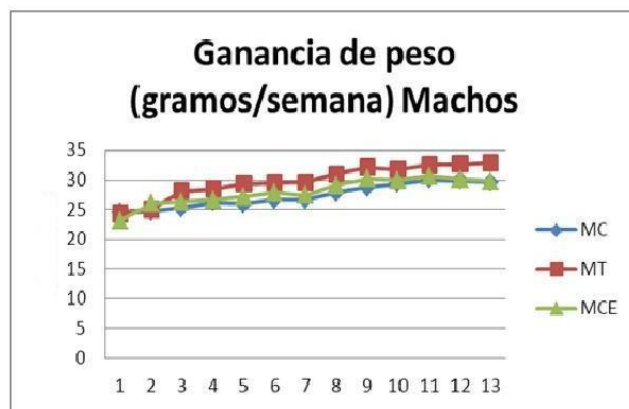
Tabla 2: Efecto del extracto acuoso de *Calea urticifolia* en el peso corporal

Grupo	Machos				Hembras			
	Inicio	Final	Aumento (%)	Sig. Bilateral	Inicio	Final	Aumento (%)	Sig. Bilateral
Control	24.46 ± 1.38	29.66 ± 1.77	21.25		23.64 ± 0.18	25.28 ± 0.51	6.93	
Tratamiento	24.26 ± 0.63	32.98 ± 2.32	35.94	0.001*	24.08 ± 0.25	26.20 ± 0.67	8.80	0.001*
Centinela	23.12 ± 0.49	29.76 ± 1.65	28.71	0.001*	24.64 ± 0.67	25.50 ± 2.10	3.49	0.382

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (D.S) y la significancia de la diferencia (*) entre los grupos tratamiento y control cuando $p < 0.05$

Fuente: Elaboración propia

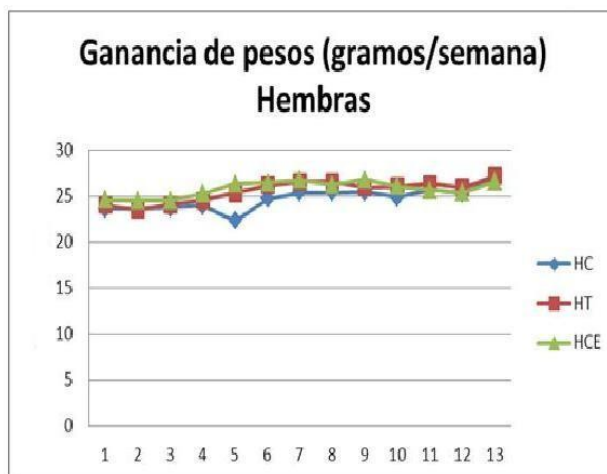
Mancebo (2002), afirma que los datos referentes al peso corporal y al consumo de alimentos, poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones debidas a productos químicos de baja toxicidad. Así la diferencia significativa encontrada entre los tratamientos comparados a sus controles no parece ser atribuida a la sustancia en estudio, al estudiar las gráficas de ganancia de pesos promedio semanal se observa la ganancia de peso en todos los grupos.



	peso inicial	sem1	sem2	sem3	sem4	sem5	sem6	sem7	sem8	sem9	sem10	sem11	peso final
MC	24.46	24.76	25.24	26.2	25.92	26.66	26.68	27.9	28.72	29.32	30.06	29.86	29.66
MT	24.26	25.06	28.12	28.46	29.34	29.54	29.58	31.04	32.12	31.8	32.58	32.66	32.98
MCE	23.12	26.04	26.3	26.62	27.2	27.84	27.42	29.12	30.22	29.98	30.7	30.1	29.76

Figura 1: Promedio de ganancia de peso semanal, ratones machos

Es evidente la constante ganancia de peso en los tres grupos de ratones machos, a lo largo de las semanas del estudio, observándose incrementos leves entre semanas acompañados incrementos superiores en otras semanas.



	peso inicial	sem1	sem2	sem3	sem4	sem5	sem6	sem7	sem8	sem9	sem10	sem11	peso final
HC	23.64	23.72	23.8	23.98	22.38	24.74	25.4	25.43	25.46	24.92	25.72	25.38	26.94
HT	24.08	23.56	24.12	24.58	25.36	26.22	26.62	26.62	26	26.1	26.38	26.02	27.24
HCE	24.64	24.58	24.58	25.32	26.4	26.52	26.78	26.26	26.82	26.08	25.7	25.42	26.6

Figura 2: Promedio de ganancia de peso, ratones hembras

La disminución leve del peso corporal es notoria en grupos hembras tratamiento y centinela en las primeras semanas, esta puede atribuirse a la actividad metabólica incrementada como parte de los procesos de desintoxicación. Seguidamente a esto es evidente la constante ganancia de peso en los individuos de los grupos tratamiento y centinela comparado a los grupos control que de igual manera ganan peso.

Aunque en el presente estudio no se tomó en cuenta la cantidad ingerida de alimento, puede existir una disminución en esta, lo que puede sospecharse con la disminución estadísticamente significativa en el peso del estómago en machos tratados con el extracto, repitiéndose este hallazgo en las hembras centinelas ya que la disminución del consumo de alimentos, es indicador de toxicidad.

4.2 Hematología.

Para la interpretación de resultados de laboratorio clínico, tanto hematología, bioquímica sanguínea, es útil establecer rangos normales desde una población no alterada, es decir individuos controles. (Suckow 2000)

Tabla 3: Efecto del extracto acuoso de *C. urticifolia* en los parámetros hematológicos

Parámetro	Grupo	Machos			Hembras		
		Media ± D. S		Sig. Bilateral	Media ± D. S		Sig. Bilateral
Hemoglobina (g/dL)	Control	15.1000	± .57009		14.9000	± .14142	
	Tratamiento	15.9400	± 1.66973	.318	15.2333	± .66583	.478
	Centinela	15.6400	± .38471	.117	15.9000	± .30822	.000*
Hematocrito (%)	Control	46.7200	± 2.82082		46.8000	± 1.33041	
	Tratamiento	49.3400	± 4.37070	.293	48.7000	± 2.85832	.236
	Centinela	47.5400	± 1.36858	.575	50.1000	± .84261	.002*
Eritrocitos (10e6/μL)	Control	10.0640	± .65995		9.7780	± .11300	
	Tratamiento	10.4525	± .32623	.321	10.0333	± .55788	2.099
	Centinela	10.6000	± .26315	.130	10.6240	± .19347	.000*
MCV (fL)	Control	46.44000	± 1.36308		47.8400	± .99398	
	Tratamiento	45.14000	± 1.163185	.143	48.5333	± .30551	.206
	Centinela	44.8600	± 1.36675	.105	47.1400	± .73007	.240
MCH (pg)	Control	15.125	± .61847		15.2400	± .13416	
	Tratamiento	14.5600	± .23022	.164	15.2000	± .26458	.781
	Centinela	14.7800	± .41473	.349	14.9600	± .37815	.157
MCHC (g/dL)	Control	32.3600	± .92087		31.8400	± .86197	
	Tratamiento	32.2600	± .63087	.846	31.3000	± .70000	.397
	Centinela	32.9000	± .75166		31.7600	± .47749	.860
RDWSD (fL)	Control	32.6400	± .90719		32.3400	± 1.88361	
	Tratamiento	31.7400	± 1.32023	.244	34.0000	± .79373	.137
	Centinela	30.5800	± .94974	.008*	34.2200	± 2.07654	.172

RDWCV	Control	22.9000	±	1.01242		22.1800	±	1.05688
	Tratamiento	23.6500	±	1.54164	.407	22.7667	±	.45092 .407
	Centinela	22.7000	±	.78422	.736	23.6600	±	1.03827 .056
PLAQUETAS (10e3/μL)	Control	1737.0000	±	177.52042		1537.000	±	466.18505
	Tratamiento	1517.0000	±	427.40671	.319	1647.000	±	54.99091 .707
	Centinela	1502.2000	±	277.04458	.149	1612.600	±	127.52764 .736
VPM (fL)	Control	7.4000	±	.15811		7.4600	±	.18166
	Tratamiento	7.7000	±	.40825	.170	7.6000	±	.36056 .482
	Centinela	7.3500	±	.05774	.571	7.7600	±	.42778 .187
GLOBBLANC (10e3/μL)	Control	6.8100	±	2.74402		7.8440	±	1.65001
	Tratamiento	7.0280	±	1.22279	.875	6.6200	±	3.04848 .478
	Centinela	7.7600	±	2.03925	.552	8.3020	±	1.79199 .685
NEUT% (%)	Control	11.5400	±	5.66286		11.7000	±	.72111
	Tratamiento	12.1600	±	9.32968	.902	15.9000	±	2.66646 .058
	Centinela	9.7600	±	6.42285	.654	13.3000	±	3.07679 .427
LINF% (%)	Control	84.5600	±	5.38033		86.7333	±	1.06927
	Tratamiento	85.6800	±	9.54971	.825	82.8000	±	3.71618 .153
	Centinela	84.4000	±	4.32839	.960	84.0800	±	2.21630 .106
MONO% (%)	Control	2.1000	±	.70711		1.4600	±	.66182
	Tratamiento	1.5800	±	.90111	.340	.8667	±	.90738 .322
	Centinela	2.0200	±	.72595	.864	2.0400	±	.63482 .195
EOS% (%)	Control	.6600	±	1.36492		.0200	±	.04472
	Tratamiento	.1000	±	.11547	.446	.1667	±	.20817 .346
	Centinela	.1600	±	.11402	.460	.0250	±	.05000 .879
BASO% (%)	Control	1.1400	±	.54129		.4200	±	.23875
	Tratamiento	.5600	±	.28810	.067	.2667	±	.11547 .347
	Centinela	.6200	±	.31145	.100	.3800	±	.38341 .849
NEUT# (10e3/μL)	Control	.54058	±	.24176		.8267	±	.07572
	Tratamiento	.55980	±	.25035	.885	1.0667	±	.56146 .537
	Centinela	.7040	±	.45081	.708	1.1475	±	.29937 .136
LINF# (10e3/μL)	Control	5.7420	±	2.28703		6.1800	±	.96005
	Tratamiento	5.9420	±	1.41477	.872	5.4767	±	2.50464 .673
	Centinela	6.5760	±	1.93388	.551	6.9840	±	1.56542 .459
MONO# (10e3/μL)	Control	.1500	±	.10271		.1140	±	.05225
	Tratamiento	.1080	±	.05718	.447	.0500	±	.04000 .121
	Centinela	.1560	±	.06580	.915	.1720	±	.07918 .330
EOS# (10e3/μL)	Control	.0240	±	.04278		.0020	±	.00447
	Tratamiento	.0050	±	.00577	.413	.0100	±	.01000 .160
	Centinela	.0100	±	.00707	.491	.0025	±	.00500 .879
BASO# (10e3/μL)	Control	.0680	±	.02775		.0320	±	.01643
	Tratamiento	.0420	±	.02864	.183	.0167	±	.00577 .180
	Centinela	.0460	±	.02191	.202	.0300	±	.02828 .895

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (D.S) y la significancia de la diferencia (*) entre los grupos tratamiento y control cuando $p < 0.05$

Fuente: elaboración propia

En el caso de hemoglobina en las hembras centinela encontramos una diferencia significativa con relación al grupo control. Pero no tiene valor diagnóstico al encontrarse en el rango normal según literatura especializada 10.9 – 16.3 g/dl (Suckow 2000).

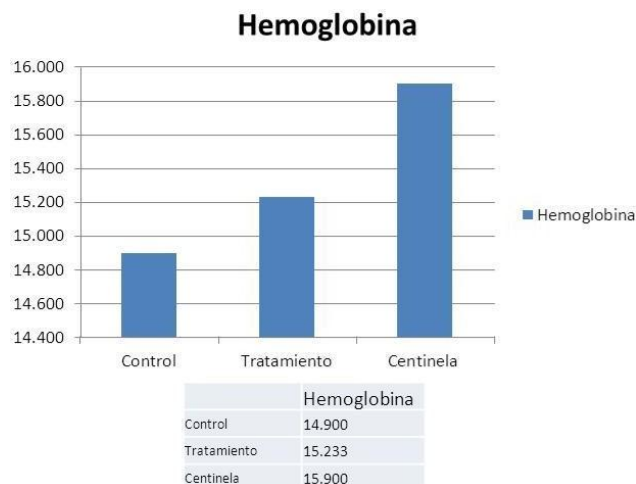


Figura 3: Cantidad de hemoglobina en hembras (g/dL)

Para hematocrito encontramos en las hembras una significancia al comparar las hembras centinelas con sus controles. Según Suckow 2000 los rangos son de 38.5 a 45.1 % con lo cual coloca a todos los grupos del estudio en los rangos superiores. Hematocrito elevado puede ser indicativo de deshidratación (Hedrich, 2004). Pero este parámetro puede tener elevaciones hasta 60% dependiendo del sitio de toma de muestra y estado de ayuno (Hedrich, 2004).

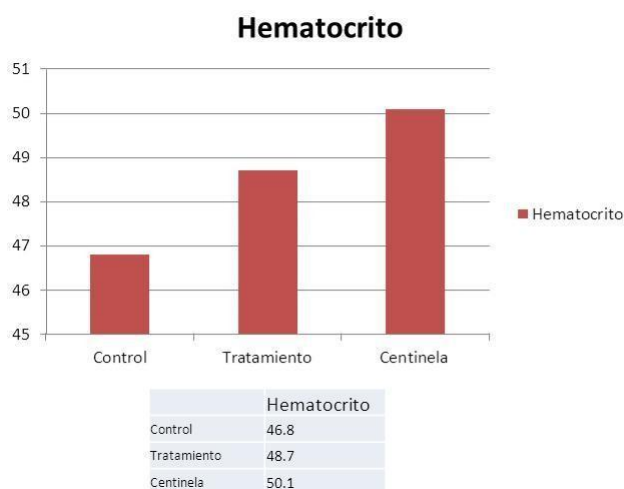


Figura 4: Hematocrito en hembras (%)

El recuento de eritrocitos muestra significancia en las hembras centinela comparada a los controles. La cantidad de eritrocitos varía de 5.0 a 9.5 10^6 xmm^3 (Suckow 2000) y (Hedrich 2004) menciona parámetros de 7 a 11 $\times 10^{12}/\text{L}$

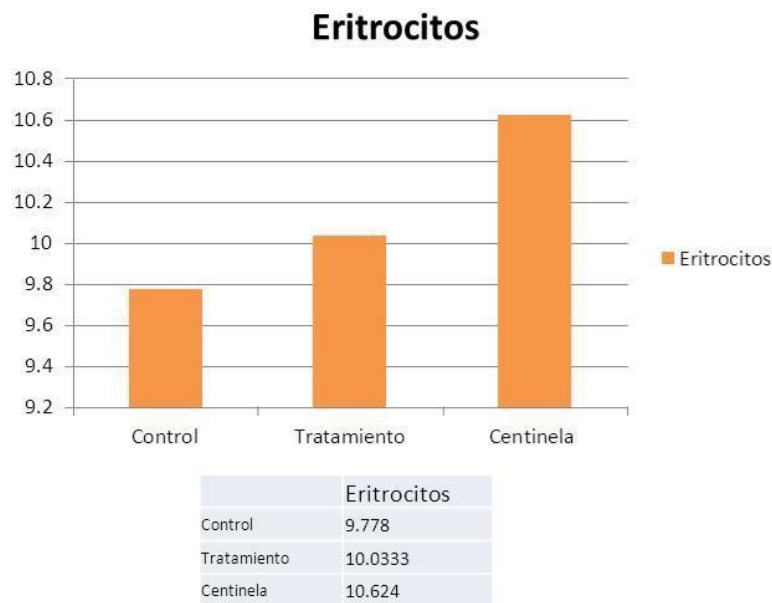


Figura 5: Eritrocitos en hembras ($10^6/\mu\text{L}$)

Según lo mencionado por Hedrich 2004 Los incrementos en la masa de glóbulos rojos (Hematocrito, hemoglobina, Eritrocitos) se relaciona a Deshidratación.

4.3 Bioquímica sanguínea.

Tabla 4: Efecto del extracto acuoso de *C. urticifolia* en los parámetros de bioquímica sanguínea

Parámetro	Grupo	Machos		Sig. Bilateral	Hembras		Sig. Bilateral
		Media ± D. S			Media ± D. S		
Bilirrubina total (mg/dL)	Control	.1540	± .01517		.1150	± .01915	
	Tratamiento	.1800	± .03082	.129	.1300	± .02000	.292
	Centinela	.1600	± .02121	.621	.1300	± .02236	.323
Bilirrubina directa (mg/dL)	Control	.0320	± .00837		.0120	± .00837	
	Tratamiento	.0275	± .00957	.476	.0180	± .00837	.290
	Centinela	.0300	± .00707	.694	.0180	± .01095	.359
Bilirruina indirecta (mg/dL)	Control	.1220	± .01095		.1060	± .01140	
	Tratamiento	.1540	± .03578	.092	.1100	± .01414	.652
	Centinela	.1300	± .02000	.455	.1120	± .02775	.667
Glucosa (mg/dL)	Control	195.2000	± 20.38872		153.6000	± 14.44991	
	Tratamiento	146.2500	± 8.26136	.003*	179.6000	± 41.07676	.219
	Centinela	150.2000	± 15.38506	.004*	164.8000	± 22.26432	.373
Nitrógeno ureico (mg/dL)	Control	29.4000	± .89443		21.2000	± 2.48998	
	Tratamiento	27.4000	± 3.28634	.251	21.2000	± 2.68328	1.000
	Centinela	29.6000	± 6.58027	.949	21.0000	± 2.82843	.908
Creatinina (mg/dL)	Control	.0820	± .04817		.0760	± .00894	
	Tratamiento	.1140	± .02966	.242	.1060	± .03130	.073
	Centinela	.1160	± .04561	.285	.1340	± .04159	.034
Relación BUN/CREA	Control	549.3500	± 589.97763		284.2020	± 54.47850	
	Tratamiento	248.2640	± 50.18918	.383	213.1880	± 54.44494	.073
	Centinela	225.0950	± 44.45723	.352	171.0260	± 64.81171	.017*
Colesterol total (mg/dL)	Control	82.6000	± 26.29258		75.5000	± 17.13671	
	Tratamiento	97.6000	± 18.47431	.327	93.8000	± 7.85493	.069
	Centinela	102.6000	± 23.62837	.241	80.8000	± 17.10848	.658
Triglicéridos (mg/dL)	Control	211.8000	± 45.32328		187.2000	± 80.56178	
	Tratamiento	214.6000	± 57.40035	.934	158.2000	± 24.67185	.478
	Centinela	202.6000	± 80.87830	.830	143.4000	± 29.30529	.286
TGO (U/L)	Control	100.0000	± 8.51469		76.8000	± 7.25948	
	Tratamiento	95.2000	± 31.03546	.747	92.0000	± 18.54724	.126
	Centinela	82.2000	± 8.43801	.011*	85.2000	± 11.77710	.212
TGP (U/L)	Control	53.6000	± 5.89915		48.4000	± 11.30487	
	Tratamiento	60.0000	± 9.77241	.245	40.2500	± 2.62996	.206
	Centinela	57.8000	± 10.87198	.469	40.2000	± 6.41872	.196

Fuente: elaboración propia

El grupo de machos mostro significancia en las mediciones de glucosa observándose valores disminuidos para grupo tratamiento y centinela al compararlos a grupo control. (Suckow 2000) refiere para glucosa un rango de 106 a 278 mg/dl encontrándose pues en valores de referencia.

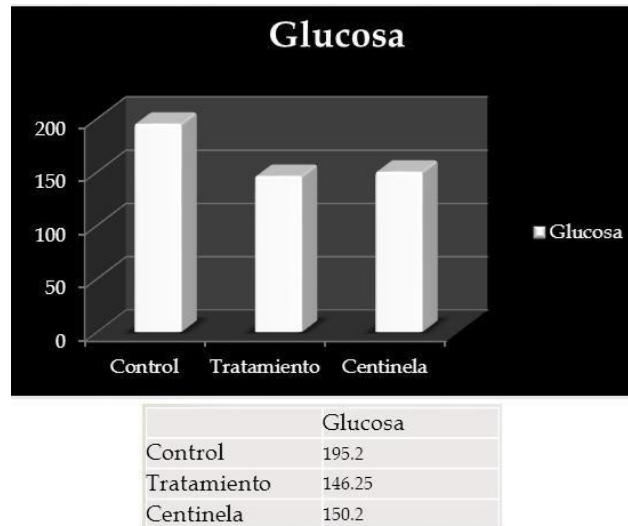


Figura 6: Glucosa en machos mg/dL

Asimismo se observó un descenso en el conteo de TGO en el grupo centinela en machos comparados al grupo control. Según Suckow (2000) el rango de referencia para TGO va desde 69 a 191 U/L. El descenso de TGO no tiene valor diagnóstico, pero si su aumento, puede ser indicativo de lesiones hepáticas.

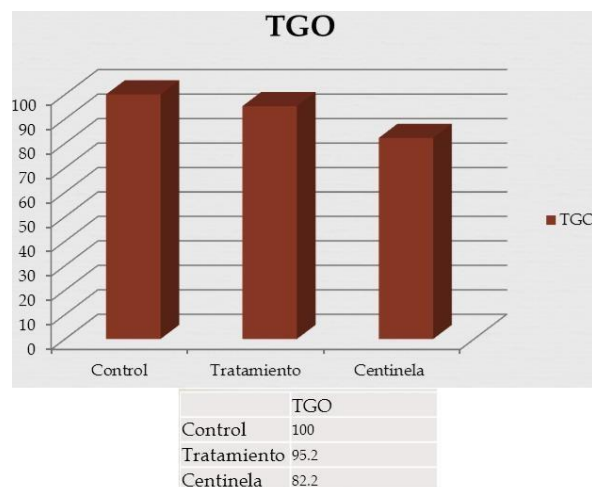


Figura 7: Valores de TGO en machos U/L

4.4 Peso de órganos

Tabla 5: Efecto del extracto acuoso de *C. urticifolia* en el peso de órganos

Parámetro	Grupo	Machos		Hembras	
		Media ± D. S	Sig. Bilateral	Media ± D. S	Sig. Bilateral
Hígado	Control	1.6700 ± .12923		1.3060 ± .13465	
	Tratamiento	1.7820 ± .23784	.390	1.2900 ± .14422	.879
	Centinela	1.9100 ± .54589	.367	1.1420 ± .05586	.036*
Corazón	Control	.1280 ± .01924		.1540 ± .01949	
	Tratamiento	.1500 ± .02000	.114	.1633 ± .02517	.575
	Centinela	.1720 ± .05020	.125	.1400 ± .01000	.191
Pulmón	Control	.1900 ± .03742		.2040 ± .02881	
	Tratamiento	.1920 ± .04207	.939	.2100 ± .02646	.779
	Centinela	.1940 ± .02702	.851	.1725 ± .01500	.090
Bazo	Control	.1540 ± .01140		.2120 ± .02775	
	Tratamiento	.1620 ± .02280	.503	.2300 ± .02646	.402
	Centinela	.1300 ± .04183	.275	.1240 ± .02302	.001*
Riñón derecho	Control	.2200 ± .02449		.1600 ± .01871	
	Tratamiento	.2360 ± .03975	.506	.1767 ± .02082	.402
	Centinela	.2480 ± .03564	.225	.1600 ± .01155	1.000
Riñón izquierdo	Control	.2060 ± .01949		.1640 ± .02510	
	Tratamiento	.2220 ± .02168	.255	.1533 ± .00577	.407
	Centinela	.2650 ± .02380	.005	.1580 ± .02280	.703
Estomago	Control	.7120 ± .17541		.6000 ± .07937	
	Tratamiento	.4625 ± .01500	.027*	.6567 ± .11930	.443
	Centinela	.9600 ± .37256	.229	.4040 ± .06580	.003*
Intestino delgado	Control	1.7740 ± .08355		1.8050 ± .09883	
	Tratamiento	1.9880 ± .26262	.145	1.8400 ± .45826	.884
	Centinela	2.0320 ± .33522	.133	1.6340 ± .11216	.048*
Intestino grueso	Control	1.0400 ± .13398		.9620 ± .11967	
	Tratamiento	.8440 ± .08620	.025*	.8600 ± .07937	.243
	Centinela	.9660 ± .15307	.440	.9740 ± .18229	.905

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (D.S) y la significancia de la diferencia (*) entre los grupos tratamiento y control cuando $p < 0.05$

Fuente: elaboración propia

En el estudio macroscópico de órganos los cambios en el tamaño, forma, superficie, color, consistencia y peso; determinan la presencia de daños toxicológicos (Höfle 2007). Mientras 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.

Para hígado se encontró significancia estadística mediante un descenso en el grupo de hembras centinelas. Pero en los grupos de machos es evidente el aumento de peso. Este aumento se observa de igual manera para corazón, pulmones, bazo y riñones de los ratones machos tratados con el extracto. (Figura A-) 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.

El estómago mostro significancia estadística en machos del grupo tratamiento y hembras del grupo centinela con una disminución de peso. Este hallazgo puede 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, OACU 2015).

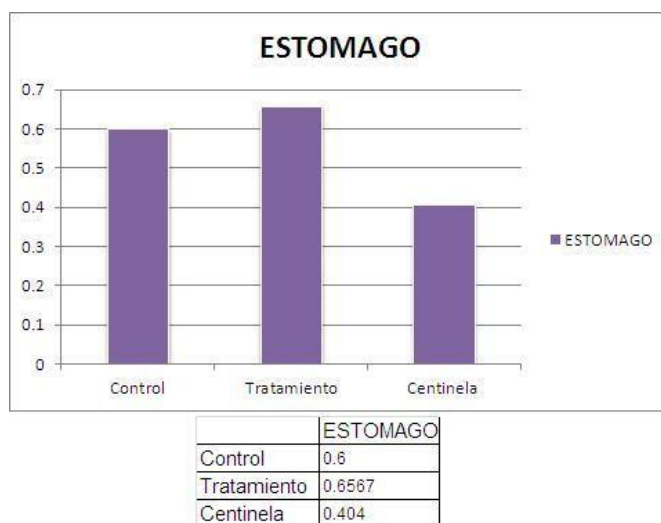


Figura 8: Peso en gramos de estómago, hembras

Para el intestino delgado observamos significancia estadística en las hembras centinelas estando su peso disminuido respecto al grupo control. Mientras en el grupo de machos nuevamente la tendencia es al aumento.

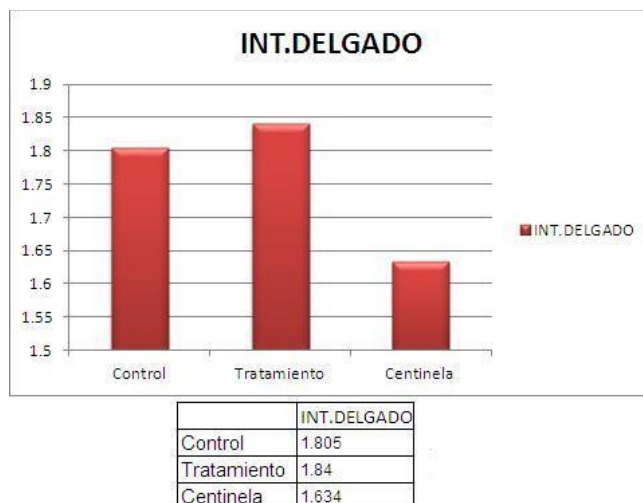


Figura 9: Peso en gramos de intestino delgado, hembras

El intestino grueso mostro significancia estadística en los machos tratamiento con una marcada disminución de peso en el grupo tratamiento respecto a controles. Igual tendencia se observa en hembras tratamiento. Esto debe relacionarse con la escasa presencia de material en el interior de los mismos al momento de la necropsia, evidencia de bajo consumo de alimento por parte de estos individuos.

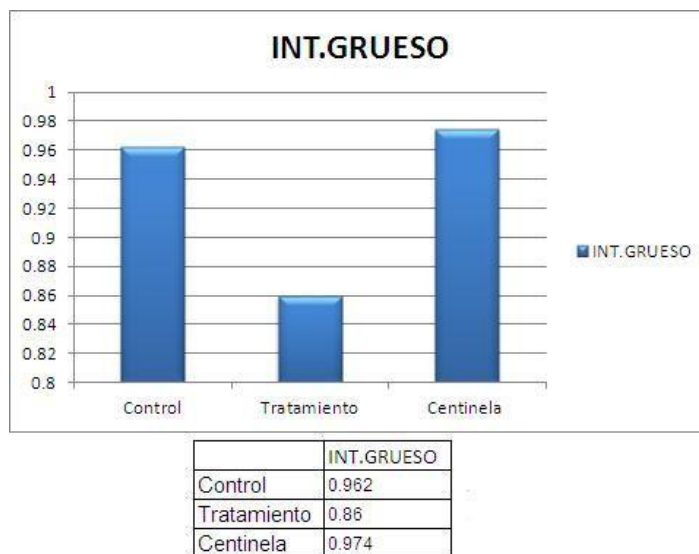


Figura 10: Peso en gramos de intestino grueso, hembras

5 Conclusiones

Los grupos tratados con el extracto acuoso de *Calea urticifolia* a una dosis de 300 mg/kg no manifestaron signos visibles de toxicidad, las dosis repetidas a 90 días, no tuvieron efecto sobre el peso corporal de los ratones tanto en machos como en hembras.

Al término del estudio, los hemogramas de los ratones tratamiento y centinelas únicamente muestran un leve incremento en los valores hematológicos

Al estudiar los órganos se encuentra aumento de peso de hígado, bazo, riñones y corazón lo cual evidencia efectos del extracto en estos órganos. No se recomienda su uso para tratamiento de enfermedades.

6 Recomendaciones

1. Estandarizar los valores normales para Hemogramas y Bioquímicas sanguíneos de los ratones de la cepa NIH en las condiciones imperantes en el laboratorio.
2. Usar únicamente de ratones Machos para los estudios de toxicología, para evitar las variaciones debidas a los ciclos hormonales de las hembras
3. Realizar los cortes histológicos del tejido extirpado en animales tratados con el extracto
4. Revisar y actualizar las marchas de necropsia en ratones de laboratorio, la conservación, fijación y tallado de tejido de estos animales

7 Bibliografía

Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. Jaral de castilla (en línea). Consultado 14 sept. 2014 Disponible en: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Jaral_de_castilla&id=7856

(CCAC) Canadian Council on Animal Care. 1998. Guidelines on: Choosing an appropriate endpoint in experiments using animals for research, teaching and testing. (En línea). Consultado 16 sept. 2014. Disponible en: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Appropriate_endpoint.pdf

Catalogue of life. 2014. Detalles de la especie *Calea urticifolia* (Mill.) consultado 3 jul. 2015. Disponible en <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/281d3f6465e83263178f503387324c44>

Cornell University. 2014. Sesquiterpene Lactones and their toxicity to livestock (en línea). Consultado 27 sept. 2014 Disponible en <http://www.ansci.cornell.edu/plants/toxicagents/sesqlactone/sesqlactone.html>

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

Fuentes F; Mendoza RA; Rosales AL; Cisneros RA. 2008 Guia de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón (en línea) Instituto nacional de salud PE. Consultado 5 dic. 2014. Disponible en http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf

Gallego Cl., Melendez D y Perez G. 2000 Determinación de la bioactividad de 26 especies de la flora salvadoreña mediante el bioensayo interacción con ADN por cromatografía líquida de alta resolución Facultad de Química y farmacia Universidad de El Salvador. Pag. 4-5

Genovez LAN. 1980 Estudio inicial de cuatro germacranólidos de la *Calea urticifolia* Trabajo de graduación Universidad de El Salvador San Salvador.

Gonzalez JC 1994. Botánica medicinal popular: etnobotánica medicinal de el salvador. Jardín Botánico La Laguna ES 189 p.

Greaves P. 2012 Histopathology of preclinical toxicity studies 4a ed. CA. Academic Press 866 p.

Grupo de investigación en modelos animales CENSALUD. s.f. Estudios sobre la toxicidad Extracto clorofórmico de *Calea urticifolia*

Gupta R. 2007 Veterinary Toxicology: Basic and clinical principles. Kentucky US. Academic press.

Gupta R. 2012. Veterinary Toxicology: Basic and clinical principles. 2a ed. Kentucky, US. Academic Press 1158p.

Hay JB; Hamburger M; Hostettmat K; Hoult JRS. 1994. Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive alpha-methylenebutyrolactone functions. (en línea) Br. J of pharmacology. 112, 9-12. Consultado 14 sept. 2014. Disponible en <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.14765381.1994.tb13020.x/pdf>

Hedrich H; Everds N. 2004 The Laboratory mouse Elsevier Academic Press 574p London UK

Höfle U. 2007 Tecnicas de diagnostico post-mortem: Necropsia y Toma de muestras ES consultado 16 nov 2016. Disponible en: http://encontroiberico.no.sapo.pt/docs/necropsias_TomaMuestras_UHofle.pdf

Hrapkiewicz K; Colby L; Denison P. 2013 Laboratory Animal Medicine an introduction Fourth edition. 431p. Wiley Blackwell UK.

J. Borges del Castillo, M.T. Manresa Ferrero, F. Rodriguez Luis, PVB. . 1981. Salvadorian compositae II. Juanislamin and 2,3- Epoxy – juanislamin, two sesquiterpenic lactones from *Calea urticifolia*. (en línea). Journal of Natural Products 44(3): 348-350. Consultado 2 nov. 2014. Disponible en: <http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/np50015a019>

Lock O de. 1994 Investigación fotoquímica, métodos en el estudio de productos naturales 2a ed. Fondo editorial de la Pontificia Universidad Católica del Perú. 300p.

Mancebo, A., Scull, I., González, Y., Arteaga, ME, González, BO., Fuentes, D., Hernández, O., Correa, M., Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de morinda citrifolia en ratas Sprague Dawley. Revista de Toxicología [en línea] 2002, 19 (cuatrimestral): Fecha de consulta: 11 de septiembre de 2018. Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=91919204>> ISSN 0212-7113

Martínez A. 2001. Sesquiterpenlactonas (en línea) UdeA CO. Consultado 14 Sept. 2014. Disponible en: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/slactonas2001.pdf>

Matsuura N; Yamada M; Suzuki H; Hasegawa N; Kurosaka C; Ubukata M; Tanaka T; Linuma M. 2005. Inhibition of preadipocyte Differentiation by Germacranolides from *Calea urticifolia* in 3T3-L1 Cells. (en línea) Bioscience Biotechnology and Biochemistry

69(12): 2470-2474 Consultado 15 nov. 2014. Disponible en: <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1271/bbb.69.2470>

Nakagawa Y; Inuma M; Matsuura N; Yi K; Naoi M; Nakayama T; Nozawa Y; Akao Y; 2005. A Potent Apoptosis-Inducing Activity of a Sesquiterpene Lactone, Arucanolide, in HL60 Cells: a Crucial Role of Apoptosis-Inducing Factor. (En línea) Journal of pharmacological Sciences 97(2): 242-252 Consultado 30 oct. 2014. Disponible en https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/97/2/97_2_242/_article

Nuffield Council on Bioethics 2005. The ethics of research involving animals London UK. 286 p

OACU Office of Animal Care and use Guidelines for Endpoints in Animal Study Proposals (En línea) Consultado 30 oct. 2016. Disponible en https://oacu.oir.nih.gov/sites/default/files/uploads/arac-guidelines/asp_endpoints.pdf

Ong, CN; Shens HM; Wongs YK Zhang, S 2005 Anticancer potential of sesquiterpene lactones: Bioactivity and molecular mechanisms. Current Medicinal Chemistry Anticancer Agents, 5, 239-249

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures. (En línea). Consultado 2 nov. 2014. Disponible en: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2001\)6](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2001)6)

Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. Harmonised integrated classification system for human health and environmental hazards of chemical substances and mixtures. (en línea). Consultado 2 nov. 2014. Disponible en: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono\(2001\)6](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?doclanguage=en&cote=env/jm/mono(2001)6)

Ortiz M. 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. (en línea) Tesis M.sc San Luis Potosi MX. Facultad de ciencias químicas, ingeniería y medicina. 68p Consultado 31. oct. 2014 Disponible en: comunidadpmpca.uaslp.mx/documento.aspx?idT=83

Peña CE; Carter DE; Fierro FA. 2001. Toxicología ambiental: Evaluación de riesgos y Restauración ambiental. (en línea) Consultado 14 ago. 2014. Disponible en <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>

Picman AK. 1986 Biological activities of sesquiterpene lactones. *Biochem System Ecol*, 14, 255-281

Rodriguez OR; Torrez EA; Valenzuela RA. 2005. Plantas utilizadas para el tratamiento de enfermedades en los animales domésticos, Reserva Natural el Tisey Estelí (en línea) Tesis Tec. NI 143p Consultado 15 nov 2014. Disponible en: <http://www.bionica.info/biblioteca/Rodriguez2005Etnobotanica.pdf>

Rzedowski J; Calderón RG. 2008. Familia Compositae Tribu Heliantheae I (Géneros Acmele-Jefferia). *Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes*. Fascículo 157. Michoacán, MX. 344 p.

Silberberg E. (S.F.) Toxicología herramientas y enfoques. *Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo* (en línea) 1(33): 1-83 Consultado 29 oct. 2014. Disponible en <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/TextosOnline/EnciclopediaOIT/tomo1/33.pdf>

Steinbeck, C; Spitzer, V; Starosta, M; Gilsane P von. 1997. Identification of Two Chromenes from *Calea serrata* by Semiautomatic Structure Elucidation. *Journal of Natural Products* (60), 627-628.

Suckow M; Danneman P; Brayton C 2000 The laboratory mouse consultado 5 nov 2017 Disponible en: <https://animals.ekmd.huji.ac.il/He/home/courses/Documents/the%20laboratory%20mouse%20-%20the%20book.pdf>

Toledo, RA. 2002. Cincuenta especies de la flora medicinal existentes de El Salvador. APROCSAL (Asociación de promotores comunales salvadoreños) SV S.p. UNAM. 2009. Atlas de la medicina tradicional mexicana (Base de datos en línea) consultado 5 dic. 2014 Disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7856>

Yamada M; Matsuura N; Suzuki M; Kurosaka C; Hasegawa N; Ubukata M; Tanaka T; Linuma M. 2004. Germacranolides from *Calea urticifolia* (en línea) *Phytochemistry* 65(23):3107-3111 Consultado 25 oct. 2014 Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0031942204004248>

Zenaide, S; Ferreira, N; Gottlieb, O; Oliveira, F; and Gottlieb, H; 1980. Structural Clarification of Germacranolides from *Calea* species. (en línea) *Phytochemistry*, 19(5): 1481-1484. Consultado 1 nov. 2014. Disponible en <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0031942280802007>

8 Anexos



Figura A- 1: Distribución de *Calea urticifolia*
Se observada presencia de la planta desde México hasta Panamá. Marcas amarillas

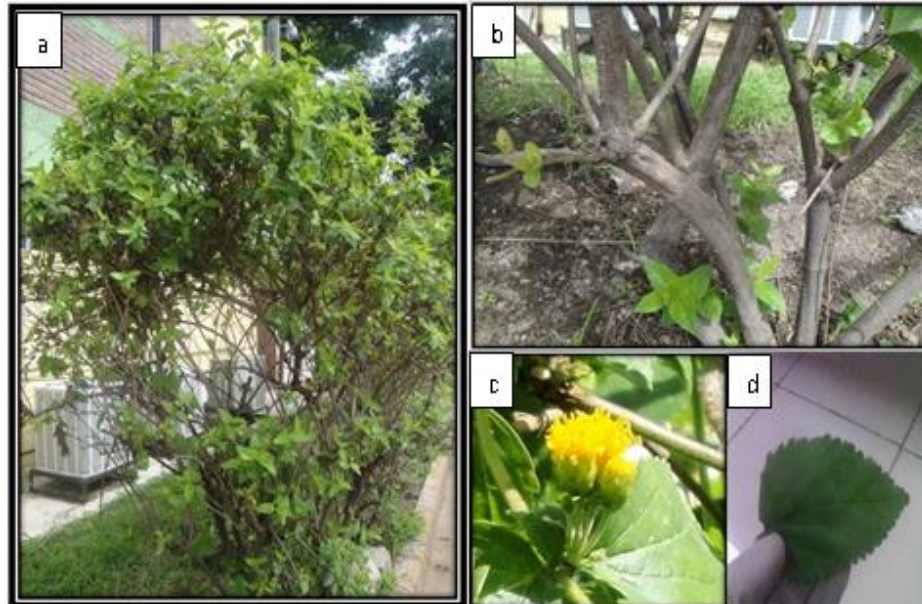


Figura A- 2: *Calea urticifolia*;

a) planta de *C. urticifolia* b) tallo *C. urticifolia*, c) y d) flor y hoja de *C. urticifolia*



Figura A- 3: Ratones marcados en jaula

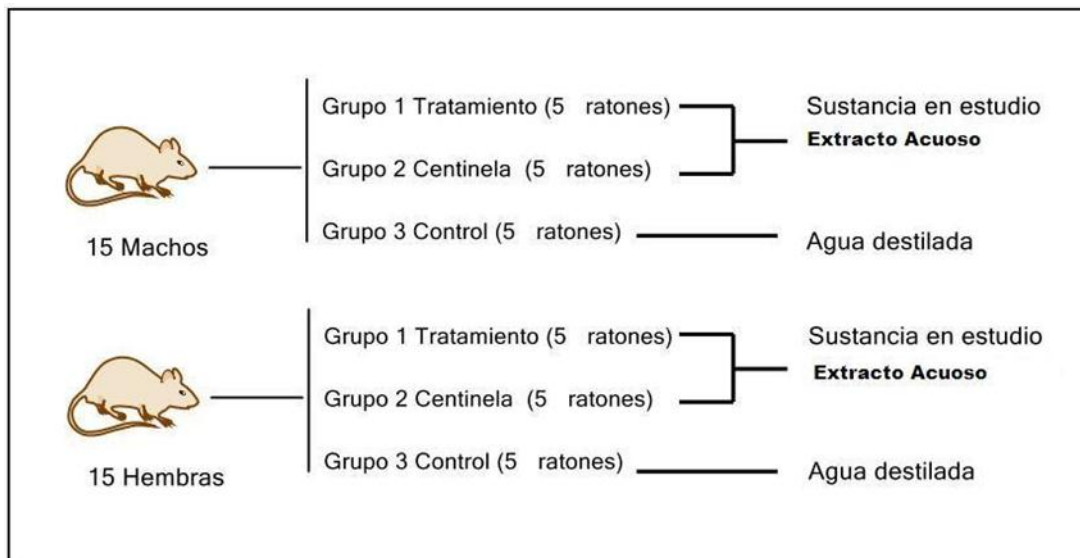


Figura A- 4: Esquema de grupos experimentales usados en la investigación



Figura A- 5: Ratón sano de laboratorio



Figura A- 6: Administración de sustancia por canulación



Figura A- 7: Colecta de sangre del seno retro orbital

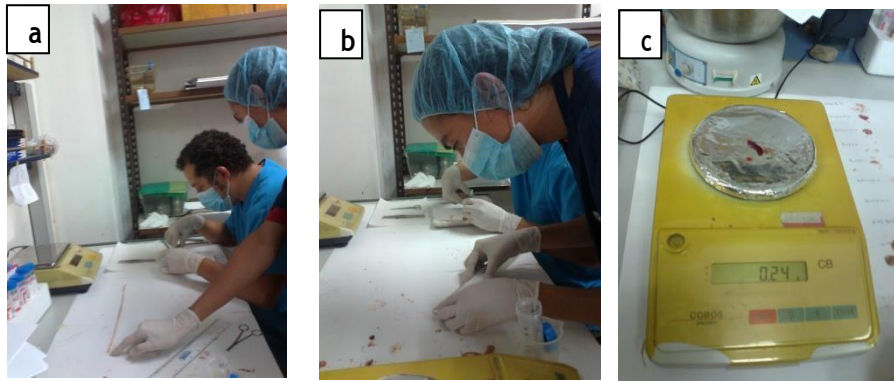


Figura A- 8: Proceso de necropsia: a) medición de órganos, b) observación de órganos c) pesaje de órganos



Figura A- 9: Preparación del extracto acuoso:

- a) Pesado de las pulverizadas hojas de juanilama, b) Adición del pulverizado en un litro de agua c) Decocción de calea, d) Filtrado de calea, e) Centrifugado en genevac