



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**Evaluación de la toxicidad aguda y sub-crónica  
del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.)  
Less, (Capitaneja).**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Químico Farmacéutico Biólogo**

P R E S E N T A:

**Guerrero Arroyo Jonathan**

**DIRECTOR DE TESIS:**

Dr. Rubén Marroquín Segura

**ASESORES DE TESIS:**

Mtra. Yolanda Flores Cabrera.

M. C. Guillermo Rodolfo Gutiérrez Espindola

**MÉXICO, CDMX. 2016**





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Lo que hacemos sólo para nosotros muere con nosotros; lo que hacemos para los demás y para el mundo permanece y es inmortal.

Albert Pike

## **Agradecimientos**

Para:

La Universidad Nacional Autónoma de México.  
La Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.

El profesor Rubén Marroquín por enseñar, confiar y brindarme todo el apoyo durante mi estancia en el laboratorio, gracias por los consejos y ser el impulso de seguir adelante con la ésta de preparación profesional.

La profesora Yolanda Flores y el profesor Luis A. Mora, por revisar mi trabajo, por enseñarme que con el trabajo en equipo se puede lograr grandes cosas, por hacer la estancia en el laboratorio tan agradable.

Mis sinodales: Mtro. Valentín Islas Pérez, M. C. Guillermo Rodolfo Gutiérrez Espindola, por su apoyo y participación para que éste trabajo fuera lo mejor posible, tanto al inicio y en la culminación de este proyecto.

El profesor Ángel García, por todos esos consejos, los cuales, me ayudaron a tomar buenas decisiones, también, por enseñarme a ser una persona crítica, que siempre emplea la razón y el análisis correcto desde varios puntos de vista, así mismo, por brindarme ayuda cuando lo necesite.

Mis amigos de la facultad, Ruth L. Arteaga, Bárbara A. Yáñez., Carlos E. Báez, más que amigos, mis ejemplos a seguir, cada quien con sus defectos, pero con grandes cualidades dignas de imitar. Por hacer la carrera divertida, amena y estresante, ¡todo a la vez! muchas gracias por todo esos momentos inolvidables.

A todos los fulanitos y fulanitas de las estancias, Chenyax, Noemí Martínez, Alejandra, Maribel, Paola, Leslie, Laura, Brenda, Rosa, Diana, Luis, Jonathan y Samuel; por motivarme para transmitir mis conocimientos, así como los buenos y divertidos momentos que pasamos juntos dentro y fuera del laboratorio.

## **Dedicatoria**

Para:

Mi tío Miguel Guerrero, ha sido mi gran apoyo y sustento durante toda mi trayectoria estudiantil, por ser una persona que me sabe escuchar y dar consejos justos en el momento preciso.

Mi abuelita Sofía Gil, por enseñarme que sólo se logra llegar a la meta luchando contra las adversidades.

Mis sobrinos, Megan, Alison, Melanie y Jacob, por ser mi más grande inspiración para seguir adelante día con día; esperando ser el ejemplo a seguir, para que cumplan sus metas sin importar que tan alejado o duro sea el camino por recorrer.

Mis hermanos, Margarita y Luis F. Guerrero, por estar siempre a mi lado en los buenos y malos momentos.

Mi mamá Dolores y mi tía Norma, por hacer de mí, una persona de provecho, por cuidar de mí, por darme la vida y críame de la mejor manera posible.

La familia que escogí, David Martínez, Arturo Cortes, Alan Nájera, Francisco J. Gonzales, por todos esos grades momentos que hemos pasado juntos, y por todos los que vendrán, por sus consejos oportunos muchas gracias.

Rodríguez M K. una persona muy especial, sin ella no hubiera tenido la determinación e inspiración necesaria para iniciar ésta carrera; por el apoyo incondicional durante la misma, por las alegrías, las victorias, por el dolor que compartimos, así como, todos los momentos memorables que pasó junto a mí; por todo esto y más...

**Infinitas gracias y aunque no sé los diga nunca...**

***In bocca al lupo,***

***Grazie di cuore, por ser parte de mi vida.***

**Guerrero A. J**

*Nos vemos cuando el destino tenga ganas de juntarnos,  
mientras tanto cuídate y se feliz.*

**J&K&L**

## Índice

|   |    |
|---|----|
| 1. <b>Introducción</b> .....                      | 1  |
| 2. <b>Marco teórico</b> .....                     | 2  |
| 2.1 Farmacognosia.....                            | 3  |
| 2.2 Obtención de drogas y principios activos..... | 4  |
| 2.3 Verbesina crocata (Cav.) Less.....            | 8  |
| 2.4 Pruebas de toxicidad .....                    | 9  |
| 2.5 Estudios de toxicidad agudo .....             | 11 |
| 2.6 Estudios de toxicidad sub-crónico.....        | 12 |
| 2.7 Analizadores automáticos.....                 | 13 |
| 2.8 Hemograma.....                                | 15 |
| 2.9 Bio-marcadores .....                          | 16 |
| 3. <b>Planteamiento de problema</b> .....         | 22 |
| 4. <b>Hipótesis</b> .....                         | 23 |
| 5. <b>Diseño de estudio</b> .....                 | 24 |
| 6. <b>Objetivos</b> .....                         | 25 |
| 6.1 Objetivo general.....                         | 25 |
| 6.2 Objetivos particulares .....                  | 25 |
| 7. <b>Material y equipo.</b> .....                | 26 |
| 8. <b>Métodos</b> .....                           | 27 |

|   |           |
|---|-----------|
| 8.1 Obtención del extracto .....                                | 27        |
| 8.2 Preparación del extracto .....                              | 27        |
| 8.3 Manejo de animales experimentales .....                     | 27        |
| 8.4 Modelo de toxicidad agudo de tres dosis .....               | 28        |
| 8.5 Modelo de toxicidad subcrónico .....                        | 28        |
| 8.6. Determinación de bio-marcadores y biometría hemática. .... | 29        |
| <b>9. Resultados</b> .....                                      | <b>30</b> |
| 9.1 Ensayo agudo.....   | 30        |
| 9.2 Ensayo sub-crónico .....                                    | 30        |
| <b>10. Discusión</b> .....                                      | <b>35</b> |
| 10.1 Ensayo agudo.....  | 35        |
| 10.2 Ensayo sub-crónico .....                                   | 36        |
| <b>11. Conclusión</b> .....                                     | <b>39</b> |
| <b>12. Recomendaciones</b> .....                                | <b>40</b> |
| <b>13. Referencias</b> .....                                    | <b>41</b> |



## 1. Introducción

Actualmente en México, el uso de la herbolaria se encuentra muy extendido entre la población, según la Secretaría de Salud de México, se estima que cerca del 90% de la gente ha recurrido alguna vez a estos remedios herbales para cuidar su salud. Sin embargo un tratamiento herbolario no es precisamente inocuo; por ello, se decidió estudiar la planta *Verbesina crocata* (Cav.) Less, debido a que es utilizada frecuentemente para tratar diversos problemas de salud, sin contar aún con ensayos toxicológicos que sustenten su inocuidad. Dentro de la batería de ensayos de primera barrera se encuentran los estudios de toxicidad a dosis única (ensayo agudo) imprescindibles en la estimación del potencial tóxico de una sustancia, referido como, el estudio cuali-cuantitativo de los fenómenos tóxicos y de su aparición, en función del tiempo tras la administración de una dosis única de la sustancia en el transcurso de 1 a 24 horas, de igual forma están los estudios de toxicidad a dosis repetidas (ensayo sub-crónico), la cual refiere los fenómenos tóxicos y su aparición tras la administración repetida en el transcurso de 30 hasta 90 días. El estudio de *V. crocata* (Cav.) Les, se debe a que ésta planta es usada de manera tradicional, sin fundamentos científicos que avalen sus actividades farmacológicas y toxicológicas, por lo que se considera necesario evaluar su potencial tóxico mediante el procedimiento de dosis fijas y continuas, de acuerdo a lo establecido internacionalmente por el Sistema Global Armonizado para estos modelos. Esta información brindará elementos al perfil toxicológico de la planta a evaluar, permitiendo o excluyendo su uso con bases científicas.

## 2. Marco teórico

El conocimiento de las plantas medicinales es milenario y ha trascendido por generaciones gracias a la tradición. Se considera que nuestros antepasados obtuvieron el conocimiento de estas especies después de distinguir entre las que servían para comer y aquellas que tenían algún efecto en su organismo, por lo que a partir de esto empezaron a diferenciarlas y seleccionarlas, esto proporciono las bases para lo que hoy se conoce como herbolaria, que se puede definir como la botánica aplicada a la medicina, a través del uso tradicional de hierbas y plantas curativas.<sup>(1)</sup>

En México, el uso de la herbolaria se encuentra muy extendido entre la población, según la Secretaria de Salud de México, se estima que cerca del 90% de la gente ha recurrido alguna vez a estos remedios herbales para cuidar su salud. Asimismo especialistas tanto de la Universidad Autónoma de Chapingo, así como del Instituto Mexicano del Seguro Social, estiman que cerca del 45% de la población mexicana utiliza exclusivamente hierbas para tratar sus problemas de salud, mientras que el otro 45% las complementa con el uso de medicina alópata, y sólo el 10% con tratamiento homeopático<sup>(1)</sup>.

Actualmente, la importancia de las plantas medicinales no sólo radica en su riqueza como parte de la cultura, sino también en el conocimiento científico que se genera a partir de su estudio y del análisis que se realiza de cuestiones ecológicas, geográficas, culturales, químicas y de farmacognosia.<sup>(2)</sup>

La farmacognosia constituye hoy en día una parte muy importante dentro del desarrollo de nuevas moléculas con propiedades farmacológicas, entre los objetivos de esta se encuentran los de toxicidad, estudios que evalúan el riesgo o peligro potencial que puede ocasionar un agente químico sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas

## 2.1 Farmacognosia

El término farmacognosia fue utilizado por primera vez en el año 1815 (*Analecta Pharmacognostica*), por el alemán Aenotheus Seydler, quien lo uso en su tesis doctoral. El nombre farmacognosia se deriva del griego *Pharmakon*, que significa droga, y *Gignosco*, adquirir el conocimiento de algo. Por lo tanto, la farmacognosia es la ciencia farmacéutica que se ocupa del estudio de las drogas y las sustancias medicamentosas de origen natural; bien sea vegetal, microbiano (hongos, bacterias) y animal. Es la ciencia encargada del estudio de las fuentes naturales de materia prima de interés farmacéutico, estudiando tanto sustancias con propiedades terapéuticas como sustancias tóxicas, excipientes u otras sustancias de interés farmacéutico. En general, trata sobre los aspectos botánicos, químicos, biológicos y económicos de las drogas, destinadas a la preparación de medicamentos, de aquí que muchos autores designan a la farmacognosia como “Materia médica” o “Materia Farmacéutica”.<sup>(3)</sup>

La farmacognosia tiene como metas:

- Determinar el origen sistemático de la especie (vegetal o animal), de la cual procede la droga.

- Establecer las características morfo-anatómicas, tanto microscópicas y macroscópicas, como organolépticas, que permitan la caracterización de la droga.
- Investigar los métodos óptimos de producción de las drogas tanto a pequeña como a gran escala: cultivo, mejora, recolección, conservación, extracción de los principios activos, entre otros.
- Establecer la composición química de la droga desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo, sobre todo lo que se refiere a los principios activos.
- Obtener extractos de la droga que contengan los principios activos.

## 2.2 Obtención de drogas y principios activos

Para obtener un extracto de alguna planta con la calidad necesaria para evaluar su acción sobre un organismo, es necesario el conocimiento de diferentes técnicas y de fuentes potenciales para la obtención de extractos o de principios activos a partir de una droga o de un precursor de origen natural. Entre los métodos extractivos se encuentran:

- **Extracción mecánica:** Permite obtener los principios activos disueltos en los fluidos propios de la planta, los cuales una vez extraídos se denominan jugo. La extracción mecánica se puede realizar por expresión, la cual consiste en ejercer una presión sobre la droga, por calor, o mediante incisiones por las que fluyen los fluidos de la planta.

- **Destilación:** Es una técnica que se basa en la diferente volatilidad de los componentes de la droga, lo cual permite la separación de componentes volátiles de otros que son menos o nada volátiles. Se suelen hacer destilaciones por arrastre de vapor o de hidro-destilaciones que facilitan la extracción de los principios activos volátiles. La destilación permite obtener, por ejemplo, las esencias de las drogas. Es un método en el que se utiliza una fuente de calor, por lo que sólo es aplicable a principios activos termoestables.<sup>(2)</sup>

Se puede distinguir distintos tipos de extractos según la concentración de principio activo respecto a la droga original y según su consistencia

- **Extractos fluidos:** El disolvente se ha evaporado en el rotavapor hasta conseguir una concentración de principio activo similar a la concentración de principio activo en la droga original. Tienen consistencia líquida y se obtienen generalmente por maceración o percolación. El disolvente suele ser agua o mezclas hidro-alcohólicas. También pueden obtenerse por disolución de extractos secos. Los extractos fluidos se alteran fácilmente en contacto con la luz y el aire. Son muy utilizados para obtener formas líquidas (jarabes, pociones, gotas, entre otras) ya que se manipulan y dosifican con facilidad.

- **Extractos blandos:** poseen una concentración de principio activo superior a la de la droga original y tienen consistencia semisólida. El disolvente suele ser agua o mezclas hidro-alcohólicas. Los extractos blandos son poco estables y resultan difíciles de manipular, por lo que prácticamente no se utilizan.
- **Extractos secos:** Se obtienen por evaporación total del disolvente y tienen una consistencia de polvo. Presentan una concentración muy superior de principio activo que la droga original. Son preparados bastante estables (aunque en muchas ocasiones resultan higroscópicos) y de fácil manipulación que se pueden utilizar para preparar tinturas, extractos fluidos, etc. Actualmente es posible obtener extractos secos nebulizados todavía más estables que los extractos secos tradicionales.

Una vez obtenido el extracto adecuado es necesario determinar las propiedades fitoquímicas del extracto; la rama de la farmacognosia que se encarga de este trabajo es la quimiotaxonomía que relaciona los tipos de sustancias químicas encontrados en un ser vivo y su clasificación taxonómica.

Ahora bien, la planta de estudio pertenece a la familia *Asteraceae*, familia que alberga gran cantidad de especies útiles de importancia directa en alimentación humana (hortalizas y semillas oleaginosas) e indirectamente, por productos obtenidos para la industria farmacéutica, agrícola, entre otras y siendo que la clasificación taxonómica esta mediada por la quimiotaxonomía, los datos

fitoquímicos generales para la familia *Asteraceae*, son: la presencia de ácidos iso- y clorogénico, isoflavonoides, lactonas sesquiterpénicas (imagen 1), alcoholes triterpénicos pentacíclicos, aceites esenciales (con predominio de terpenoides), alcaloides (especialmente pirrolizidínicos) y diversos derivados acetilénicos, mientras que carece de taninos verdaderos y de iridoides. Las semillas de ésta familia almacenan glúcidos (particularmente como inulina), prótidos (como proteína amorfa) y lípidos. Los aceites seminales son ricos en ácidos grasos de cadenas cortas, sobre todo linoleico y esteárico, en menor cantidad oleico, linolénico y palmítico. Los metabolitos secundarios aislados de *Asteráceas* son muy variados. Algunos flavonoides y aceites volátiles (con di- y triterpenos) son comunes a casi todas las especies y dos grupos de sistematización de las *Asteráceas* sustancias que son “marcadores quimiotaxonómicos” de la familia, las lactonas sesquiterpénicas y los compuestos poliacetilénicos.<sup>(4,5)</sup>

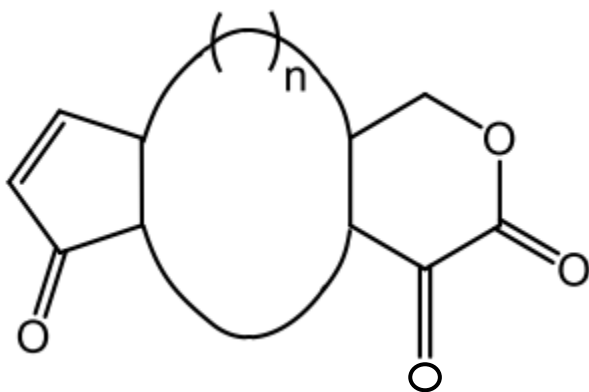


Imagen 1. Estructura general de las lactonas sesquiterpénicas

### 2.3 *Verbesina crocata* (Cav.) Less.

Dentro de la familia *Asteraceae* se encuentra *Verbesina crocata* (Cav.) Less., es una planta empleada comúnmente para diversas afecciones de salud. Planta originaria de México, conocida comúnmente como “Capitaneja” (Imagen 2), habita en clima cálido, semi-cálido y templado, puede encontrarse desde los 600 hasta los 1000 metros sobre el nivel de mar, se encuentra en los estados de Durango, Guerrero, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Oaxaca y Puebla.

Está, puede crecer de 1.5 a 4 metros de altura, las hojas tienen forma de lanza y algunos picos de color oscuro o verde claro. Las flores en forma de cabezuelas son de color amarillo o naranja y de tallo erguido.<sup>(4,6-8)</sup>

El uso medicinal de esta planta al que se hace mayor referencia es en contra de afecciones ginecológicas (como infecciones vaginales y la retención de placenta en el postparto). También se usa para tratar heridas en la piel y otras afecciones dermatológicas como erupciones y salpullido, se emplea para tratar úlceras en la boca, lavar heridas y enjuagar el cabello para evitar su caída.



Imagen 2. *Verbesina crocata* (Cav.) Less.<sup>(7)</sup>



## 2.4 Pruebas de toxicidad

Ahora bien, la farmacognosia emplea los extractos como pruebas en animales, con los cuales se puede comprobar los fenómenos reales en tiempos establecidos según sea el caso; estas pruebas son conocidas como ensayos biológicos<sup>(9)</sup>. Los ensayos biológicos son herramientas de diagnóstico adecuadas para determinar el efecto de agentes físicos y químicos sobre organismos de prueba bajo condiciones experimentales específicas y controladas. Estos efectos pueden ser tanto de inhibición como de magnificación, evaluados por la reacción de los organismos, tales como muerte, crecimiento, proliferación, multiplicación, cambios morfológicos, fisiológicos, hematológicos o histológicos. Los efectos pueden manifestarse a diferentes niveles, desde estructuras sub-celulares o sistemas de enzimas, hasta organismos completos. Por lo tanto, la toxicidad será la capacidad de una sustancia para ejercer un efecto nocivo sobre un organismo y dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto como de su concentración, según sea la duración o frecuencia de la exposición al tóxico y su relación con el ciclo de vida del organismo.<sup>(9,10)</sup>

Los modelos de estudio de toxicidad en animales son protocolos que están diseñados para proveer una descripción de los efectos producidos por un compuesto, si estos son propiamente calificados, llegan a ser aplicables a modelos humanos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los estudios de toxicidad no están diseñados para demostrar que una sustancia, principio activo o fármaco es seguro para la salud, sino para encontrar los posibles efectos tóxicos

que está pueda generar. Los estudios toxicológicos ofrecen información sobre la dosis a partir de las cuales los efectos tóxicos comienzan a aparecer. Para lograr establecer los efectos tóxicos, se realizan estudios de toxicidad aguda, subaguda, crónica y sub-crónica sobre animales de experimentación.<sup>(11)</sup>

- **Reactivo biológico**

Los animales de experimentación o animal de laboratorio es cualquier especie “animal” que se mantiene bajo condiciones determinadas y se utiliza con fines científicos. El reactivo biológico es un animal estandarizado, lo que significa que tiene una composición genético-sanitaria definida, son criados y mantenidos en ambientes controlados que cumplen con los requerimientos específicos para cada especie.

Dentro de los modelos de experimentación, el ratón es el más estudiado y utilizado en la mayoría de las experiencias *in vivo* de biología y la medicina<sup>(12)</sup>, es en general el modelo elegido para conocer la reacción de un organismo mamífero frente a una agresión, una intoxicación, reacciones o trastornos inmunológicos, oncológicos teratología y embriología. Se considera al ratón (Imagen 3), como un modelo animal casi perfecto porque además de su corto tiempo generacional, alta tasa reproductiva y fácil mantenimiento, son los animales más sofisticados que pueden ser utilizados por los investigadores, para realizar entre otros; los estudios de toxicidad aguda, sub-crónica.<sup>(11,13,14)</sup>



Imagen 3. Ratón macho CD1.

## 2.5 Estudios de toxicidad agudo

Los estudios de toxicidad aguda tienen por objetivo determinar algunos parámetros toxicológicos de cierta utilidad: la dosis mínima mortal o las dosis letales 100 ( $DL_{100}$ ) y 50 ( $DL_{50}$ ). Esta última permite establecer un orden de anticipación en las sustancia químicas, atendiendo a su toxicidad. El compuesto o extracto, se administra en una sola toma, con un periodo de observación variable, pero siempre bastante corto. Sus resultados suelen servir de punto de partida para fijar las dosis a utilizar en pruebas posteriores.<sup>(15,16)</sup>

Para la determinación de toxicidad aguda sin  $DL_{50}$ , se establece la dosis de acuerdo al peso del animal de experimentación y tóxico de prueba, en rangos de 5-50 mg/Kg; 50-500 mg/Kg sin exceder los 2 g/Kg de peso, en dosis única a administrar. Para este estudio se requiere de 10 ratones, de 25-30 g de peso, sin importar sexo, generalmente se emplean machos; separados en dos grupos, un control y uno de prueba a 100 mg/Kg de peso; administrado en una o varias dosis, observando cambios en el comportamiento después de la administración,

reportando cada anomalía en los animales de experimentación.

Existen otros modelos de toxicidad como lo es el ensayo crónico, el cual es un estudio de exposición prolongada y repetida de la sustancia química, a animales de laboratorio, periodos que van desde 3 meses hasta 2 años; los resultados se manifiestan porque: la sustancia química se acumula en el organismo, es decir, en cada exposición, ya que la cantidad eliminada es inferior a la absorbida. La concentración de la sustancia química en el organismo aumenta progresivamente hasta que puede generar manifestaciones tóxicas.<sup>(17)</sup>

En el ensayo cónico, debido a que la duración de la exposición está en función del agente utilizado y del ciclo vida del organismo, entre otras, existen variables a este ensayo, como lo es el ensayo sub-crónico.

## **2.6 Estudios de toxicidad sub-crónico**

En el ensayo de toxicidad sub-crónico, las principales metas del ensayo de toxicidad sub-crónico son establecer el nivel de efectos adversos no observables, además de caracterizar el órgano específico u órganos afectados por el ensayo después de repetidas administraciones. La exposición sub-crónica puede durar diferentes períodos de tiempo, pero de 30 a 90 días es la más común, con 10 a 20 ratones por ensayo, donde cada animal deberá ser identificado con una marca permanente, como lo es la muesca permanente en la oreja, para está, sólo animales saludables deberán ser empleados, separados por grupos en un ambiente adecuadamente controlado.<sup>(10,18)</sup> Los animales deberán ser observados de una a dos veces diariamente para identificar signos de toxicidad, que incluyen,

cambios en el peso corporal, alimento consumido, cambios en el color o textura del pelaje, dificultad respiratoria o cardiovascular, anormalidades conductuales o motoras y masas palpables; después del término del estudio, se determinan marcadores biológicos séricos y hematológicos.

Estos parámetros se podrán determinar a partir de reacciones químicas, enzimáticas o colorimétricas, esto dependiendo del analito y el método empleado; hoy en día existen equipos automatizados que permiten determinar estos en menor tiempo, con menor grado de error y utilizando una pequeña cantidad de muestra.

## 2.7 Analizadores automáticos

Un analizador es un instrumento que permite medir la concentración de algún o algunos componentes de una muestra; así mismo, se entiende por automático aquel proceso o dispositivo que, en condiciones determinadas, funciona sin intervención humana. Sin embargo, los instrumentos utilizados para esta investigación: CELL-DYN 3700 CS<sup>®</sup> (analizador hematológico) e ILab<sup>600</sup> (analizador de química clínica), no son totalmente automáticos ya que las muestras a analizar requieren de una preparación. El fundamento de las determinaciones de estos equipos semiautomáticos son impedancia eléctrica, espectrofotometría, potenciometría y la separación de distintos ángulos de dispersión polarizada, de sus siglas en inglés M.A.P.S.S.<sup>(19-21)</sup>

- **Impedancia eléctrica**

La impedancia eléctrica, se basa en la detección de los cambios de la resistencia

eléctrica producidos por una partícula suspendida en un diluyente conductor a su paso por una apertura de dimensiones conocidas. Para crear corriente eléctrica se sumergen dos electrodos en el líquido, uno a cada lado de la abertura; a medida que cada partícula pasa por ésta, se produce un cambio en la resistencia entre los electrodos, este cambio genera un impulso eléctrico mensurable. El número de impulsos corresponde con el número de partículas que atraviesan la abertura; la amplitud de cada impulso resulta, en esencia, proporcional al volumen de partícula.

- ***Espectrofotometría***

Este método se basa en la capacidad de las sustancias de absorber la luz, a una longitud de onda determinada, en proporción directa a la cantidad de materia presente.<sup>(22)</sup>

- ***Potenciometría***

Esta consiste en la determinación de la actividad (concentración) de una especie de forma directa, rápida y simple, mediante la medida potencial eléctrico; la técnica requiere la comparación del potencial producido por el electrodo indicador en una disolución problema con el potencial que se obtiene cuando se sumerge el mismo electrodo en una disolución patrón de concentración conocida.

- ***MAPSS (Multi Angle Polarized Scatter Separation).***

Este sistema utiliza técnicas de citometría de flujo para analizar subpoblaciones de células, en ella se establece un flujo laminar con reactivo envolvente, cuya función es proteger la integridad celular; estas células van alineándose para así atravesar

la zona de detección. Las células dispersan la luz láser en ángulos diferentes, proporcionando información sobre su tamaño, estructura interna, su granularidad y morfología de su superficie. Las señales ópticas generadas son detectadas y convertidas en impulsos eléctricos.

Los ángulos de dispersión que mide el instrumento son los siguientes:

- a) Dispersión de la luz a  $0^\circ$ ; proporciona el conteo total y la media de tamaño.
- b) Dispersión de la luz a  $10^\circ$ ; mide complejidad celular.
- c) Dispersión de la luz a  $90^\circ$ ; mide la globularidad o lobularidad celular.
- d) Dispersión de la luz a  $90^\circ$ D; mide la granularidad celular.<sup>(23)</sup>

## 2.8 Hemograma

Dentro de los parámetros que se determinaran en estos ensayos se encuentra la biometría hemática (BH) o hemograma, que es un estudio sanguíneo, el cual se divide en tres bloques con base en los tipos de células sanguíneas analizadas; los leucocitos, eritrocitos y plaquetas. La interpretación correcta del hemograma orienta al diagnóstico oportuno de infecciones, anemias, leucemias, parasitosis, policitemias, enfermedades del sistema inmune, patologías de la hemostasia, entre otras<sup>(24)</sup>. El estudio de la biometría hemática completa incluye el análisis morfológico (tamaño, forma y volumen celular) y cuantitativo de las células sanguíneas mencionadas.

Tabla 1. Valores de referencia hemograma de ratón CD1.

| Parámetros         | Suizo*                                 | Norte América**            |
|--------------------|--|----------------------------|
| <b>Eritrocitos</b> | 8.93 ± 1.37 x 10 <sup>6</sup> /mL      | 9.52 x 10 <sup>6</sup> /mL |
| <b>Hemoglobina</b> | 14.67 ± 2.21 mg/dL                     | 14.4 mg/dL                 |
| <b>Hematocrito</b> | 49.97 ± 7.67%                          | 53%                        |
| <b>VCM</b>         | 56.10 ± 4.59 fL                        | 55.8 fL                    |
| <b>HCM</b>         | 16.45 ± 0.97 pg                        | 15.2 pg                    |
| <b>CMHC</b>        | 29.50 ± 2.76 g/dL                      | 27.5 g/dL                  |
| <b>ADE</b>         | 16.79 ± 0.96%                          | 16.8%                      |
| <b>Leucocitos</b>  | 8.79 ± 2.54 x 10 <sup>3</sup> /mL      | 8.57 x 10 <sup>3</sup> /mL |
| <b>Neutrófilos</b> | 1.50 ± 0.84%                           | 23.45%                     |
| <b>Linfocitos</b>  | 6.59 ± 1.90%                           | 67.20%                     |
| <b>Monocitos</b>   | 0.49 ± 0.19%                           | 6.77%                      |
| <b>Eosinófilos</b> | 0.17 ± 0.15%                           | 2.16%                      |
| <b>Basófilos</b>   | 0.04 ± 0.05%                           | 0.41%                      |
| <b>Plaquetas</b>   | 1528.88 ± 400.63 x 10 <sup>3</sup> /mL | 1580 x 10 <sup>3</sup> /mL |

\*Colonias de ratones macho CD1 de Suiza, de 8-10 semanas de edad. \*\*Colonias de ratones macho CD1 de Norte América, de 8-10 semanas de edad.<sup>(12)</sup>

## 2.9 Bio-marcadores

También en los ensayos de toxicidad se determinan marcadores biológicos o bio-marcadores, se podría definir, en sentido amplio, como la presencia de un xenobiótico (sustancia extraña o ajena al organismo) en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra fisiológica inducidas por un xenobiótico que reflejan una exposición, una respuesta celular precoz, o una susceptibilidad inherente o adquirida, proporcionando una estrategia para la resolución de estos problemas. Evidentemente, *in sensu* estricto, la palabra bio-marcador haría referencia a la respuesta biológica del organismo frente a la



agresión de un xenobiótico y no a la presencia de éste o algún metabolito de él en el organismo.

La ventaja principal del empleo de bio-marcadores estriba en que considera las variaciones interindividuales (diferencias en la absorción, biodisponibilidad, excreción o en los mecanismos reparadores del ADN) e incluso, intraindividuales como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un período de tiempo determinado. Ello conlleva una evaluación de la exposición individualizada. En este contexto, el organismo actúa como integrador de la exposición y determinados factores de tipo fisiológico modulan la dosis captada por dicho organismo. En definitiva, se puede afirmar que un colectivo no puede asimilarse a un grupo homogéneo de individuos expuestos a un xenobiótico en condiciones estándar y reproducibles.

Una de las limitaciones más importantes de los bio-marcadores radica en que no pueden aplicarse a sustancias que ejercen sus efectos tóxicos de forma instantánea (por ejemplo, gases y vapores irritantes primarios) o sustancias que tienen una tasa de absorción muy pequeña.

Puede ser un compuesto exógeno (o un metabolito) dentro del organismo que refleja la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente) o incluso aire espirado. En el caso de tóxicos acumulativos, la dosis interna puede también reflejar la cifra de agente tóxico almacenado en uno o varios compartimentos corporales.

Los bio-marcadores se dividen de acuerdo a su exposición en dos subgrupos: selectivos y no selectivos, basándose en la especificidad de las pruebas de detección. Los bio-marcadores selectivos se basan en la medida directa del tóxico o sus metabolitos en fluidos biológicos (p. ej. plomo en sangre) y los no selectivos constituyen un grupo de indicadores inespecíficos de exposición (p.ej. tioéteres en orina como indicadores de exposición a sustancias electrófilas y, por tanto, reflejo de la absorción de sustancias mutagénicas y cancerígenas).

El bio-marcador de respuesta o efecto es indicativo de cambios bioquímicos en un organismo como resultado de la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares (núcleo, membrana, etc.). A continuación se consideran algunos de los ejemplos más significativos de bio-marcadores de respuesta o efecto en hígado, riñones y corazón.<sup>(25)</sup>

### 2.9.1 Hígado

- Alanino aminotransferasa (ALT)

La ALT se encuentra de manera predominante en el hígado y en menores cantidades, en riñones, corazón y el musculo esquelético. Las lesiones o enfermedades que afectan al parénquima hepático provocan la liberación de esta enzima hepatocelular a la sangre, lo cual eleva las concentraciones

séricas de ALT. La mayor parte de los aumentos de ALT es consecuencia de disfunción hepática, por lo que esta enzima no sólo es sensible, sino muy específica de enfermedad hepatocelular. En trastornos hepatocelulares de origen no viral, la relación ALT/AST (relación de DeRitis) es  $<1$ ; en cambio en la hepatitis viral la relación es  $>1$ , la cual resulta útil para el diagnóstico de hepatitis viral.<sup>(26)</sup>

- Aspartato aminotransferasa (AST)

Esta enzima se encuentra en concentraciones muy elevadas dentro de tejidos altamente metabólicos, como el musculo cardiaco, células hepáticas, células musculo esqueléticas y en menor grado, riñones, páncreas y glóbulos rojos. En presencia de enfermedad o lesión que afecte las células de estos tejidos, las células se lisan; la AST se libera, pasa a la sangre y se incrementan sus cifras séricas. El aumento de las concentraciones de AST se relaciona con el número de células afectadas por la enfermedad o lesión. De modo adicional, el aumento depende el tiempo transcurrido desde que se produce la lesión hasta la toma de sangre. La AST se elimina del sistema en unos cuantos días. Las concentraciones de AST sérica se elevan 8 h después de la lesión celular, con un punto máximo de las 24 a 36 h después y vuelven a la normalidad entre 3 a 7 días. Si la lesión celular es de tipo crónico, las concentraciones se elevan de manera persistente.<sup>(26)</sup>

- Deshidrogenasa láctica (LDH).

La enzima LDH se encuentra en las células de muchos tejidos celulares, en especial corazón (isoenzimas 1, 2), hígado (isoenzima 5), glóbulos rojos (isoenzima 1), riñones (isoenzima 4), musculo esquelético (isoenzima 5) y pulmones (isoenzimas 3, 2). Debido a que la LDH posee gran distribución en todo el cuerpo, el valor de LDH total no es un indicador específico de ninguna enfermedad o daño de ningún órgano. Cuando un trastorno o lesión afecta a las células que contienen LDH, las células se lisan y la LDH se libera hacia el torrente sanguíneo donde se puede identificar en concentraciones más altas de las normales.<sup>(26)</sup>

### 2.9.2 Riñones

- Nitrógeno ureico en sangre (BUN)

El BUN es una medida indirecta y general de la función renal y la tasa de filtración glomerular, también es una determinación de la función hepática. El BUN cuantifica la cantidad de nitrógeno ureico en sangre. La urea se forma en el hígado como producto final del metabolismo de las proteínas y la digestión. Durante la digestión se cortan las proteínas en aminoácido. En el hígado, estos aminoácidos se catabolizan y forman amonio libre. Las moléculas de amonio se combinan para formar urea, que después se deposita en la sangre y se transporta a los riñones para su excreción. Por lo tanto, el BUN se relaciona de manera directa con la función metabólica del hígado y la función de excreción renal.<sup>(26)</sup>

- Creatinina sérica

Mide la cantidad de creatinina en la sangre. La creatinina es un producto catabólico de la fosfocreatina, la cual se utiliza en la contracción muscular esquelética. La producción diaria de creatina y de modo subsecuente la creatinina, depende de la masa muscular, que fluctúa en escasa medida. Los riñones excretan la totalidad de creatinina, como el BUN, por lo que su presencia es directamente proporcional a la función excretora renal. Es por ello que en presencia de una función excretora renal “normal”, el valor de la creatinina debe permanecer constante y dentro de los límites de referencia.<sup>(26)</sup>

**Tabla 2. Valores de referencia de bio-marcadores de ratón CD1.**

| ratones CD1                    | AST (U/L)        | ALT (U/L)        | LDH (U/L)      | Creatinina (mg/dL) | BUN (mg/dL)     |
|--------------------------------|------------------|------------------|----------------|--------------------|-----------------|
| <b>machos suiza</b>            | 80.55 ±<br>67.29 | 45.08 ±<br>16.11 | 154 ±<br>50.03 | 11.30 ± 0.60       | 14.68 ±<br>3.99 |
| <b>machos de Norte América</b> | 78               | 47               | 136            | 0.3                | 17              |

\*Colonias de ratones macho CD1 de Suiza, de 8-10 semanas de edad. \*\*Colonias de ratones macho CD1 de Norte América, de 8-10 semanas de edad.<sup>(12)</sup>

### 3. Planteamiento de problema

En diversos mercados de México es común encontrar a la venta plantas y mezclas de las mismas que suponen un efecto terapéutico, desafortunadamente en la actualidad los estudios sobre la validación terapéutica de estas plantas aún son limitadas. Se ha probado que el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, tiene actividad hipoglucemiante y antiinflamatorio, también ésta carece de actividad antimicrobiana; también se evaluó que esta planta no tiene efecto cicatrizante en ratones; sin embargo los ratones tratados durante este ensayo presentaron pérdida de pelo en la zona de aplicación del ungüento al 4%, posiblemente causado por el bálsamo empleado, debido a que esta planta sigue siendo usada frecuentemente para una gran variedad de afecciones de salud, ignorando posibles efectos secundario y considerando que a la fecha no ha sido determinada su toxicidad; este trabajo se enfoca en la evaluación del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less., mediante ensayos de toxicidad aguda y sub-crónica. Esta información brindará elementos al perfil toxicológico de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.

¿Qué efecto tendrá una administración diaria del extracto acuoso de esta planta por 30 días a 100 mg/kg/dosis en modelo animal?

¿Qué efecto tendrá la administración del mismo extracto a la misma dosis, en intervalos de una hora por tres horas en ratones CD1?

¿Existirán alteraciones de los bio-marcadores séricos al final de cada ensayo?

¿Existirán alteraciones hematológicas al final del ensayo sub- crónico?

#### 4. Hipótesis

Al emplear el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, en modelos de intoxicación aguda e intoxicación sub-crónica utilizando ratones CD1; se espera que este extracto tenga efectos tóxicos, los cuales se podrán determinar por medio de parámetros hematológicos y/o algunos bio-marcadores de daño; esto, considerando que los órganos muestren alteraciones en sus pesos relativos.

## 5. Diseño de estudio

**Tipo de estudio:** experimental, prospectivo, longitudinal.

**Población de estudio:** ratones machos CD1

**Criterios:**

- ❖ **Inclusión:** machos de entre 30-40 gramos de peso, biológicamente sanos.
- ❖ **Exclusión:** ratones: hembras, con peso bajo <15 g, o enfermos.
- ❖ **Eliminación:** ratones que mueran, desarrollen infecciones o tumores, etc., durante el estudio.

**Variables:**

### ❖ Independiente

Contenido fitoquímico del extracto acuoso.

### ❖ Dependiente

Alteración de: bio-marcadores séricos, parámetros hematológicos, comportamiento, cambio de peso, manifestaciones de toxicidad como convulsiones, salivación, diarrea, letargo, diarrea, somnolencia, coma.

**Análisis estadístico**

Los datos se analizaron con el paquete estadístico SPSS® versión 21, por el método de comparación de medias t-de student con el 95% de confianza.



## 6. Objetivos

### 6.1 Objetivo general

Evaluar la toxicidad en ratones CD1 del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.

### 6.2 Objetivos particulares

- Obtener el extracto sólido pulverizado de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.
- Inducir una intoxicación aguda en ratones CD1, por medio de la administración intragástrica de tres dosis con intervalos de una hora, en el mismo día.
- Inducir una intoxicación sub-crónica en ratones CD1, por medio de la administración intragástrica diaria del extracto durante 30 días.

Al final del ensayo:

- Sub-crónico, determinar los parámetros hematológicos de los ratones empleados en el estudio por biometría hemática.
- Sub-crónico, obtener el peso relativo de los órganos (hígado, corazón, bazo, riñones) de cada ratón empleado en el estudio.
- Agudo y sub-crónico, determinar bio-marcadores séricos para determinar si existe una alteración funcional en los órganos que muestren alteraciones en sus pesos relativos.

## 7. Material y equipo.

| Reactivos                               | Sustancias  | Reactivo biológico    |
|---|---|-----------------------|
| Etanol (J.T. Baker <sup>®</sup> )       | Solución salina isotónica<br>0.85% (HYCEL <sup>®</sup> )      | 33 ratones machos CD1 |
| Éter etílico (J.T. Baker <sup>®</sup> ) | Extracto acuoso de<br><i>Verbesina crocata</i> (Cav)<br>Less. |                       |

| Material   | Equipo e instrumentos                                       |
|--|---|
| Jaulas   | Sonicador Vibra cell (Sonics <sup>®</sup> )                 |
| Tijeras de disección   | Centrifuga Vanguard V6500 (Hamilton Bell <sup>®</sup> )     |
| Bisturí  | Balanza analítica (æ Adam <sup>®</sup> )                    |
| Pinzas de mosco  | Campana de extracción                                       |
| Tubos Eppendorf 1 mL   | ILab <sup>600</sup> <sup>®</sup>                            |
| Pipetas automáticas de 100 y 1000 µL                                   | Cell Dyn 3700 <sup>®</sup>                                  |
| Puntillas para pipeta automática de<br>100 y 1000 µL                   | Rotary Evaporator RE300 <sup>®</sup> (Yamato <sup>®</sup> ) |
| Papel PARAFILM <sup>®</sup>  | Bomba para vacío Koblenz <sup>®</sup>                       |
| Gradillas  | Balanza granataria (OHAUS <sup>®</sup> )                    |
| Tubos de 3 mL K <sub>2</sub> EDTA 7.2 mg (BD Vacutainer <sup>®</sup> ) |   |
| Sonda gástrica de 20x32 mm (YALE <sup>®</sup> )                        |   |
| Matraz Erlenmeyer de 4 L   |   |
| Vaso de precipitados de 200 mL   |   |
| Varilla de vidrio  |   |
| Vidrio de reloj  |   |

## 8. Métodos

### 8.1 Obtención del extracto

Se obtuvo el extracto a partir de 316 g de *Verbesina crocata* (Cav.) Less. (Capitaneja), se maceró y se colocó en suficiente agua destilada por 24 horas, se filtró al vacío, posteriormente se eliminó la mayor cantidad de agua en el rota vapor, se dejó secar a 60 °C, se pulverizó en un procesador, finalmente se obtuvo el rendimiento total de la extracción.<sup>(27)</sup>

### 8.2 Preparación del extracto

Se formaron cuatro grupos de ratones, dos para cada ensayo (control y tratado), se separaron en jaulas diferentes, se pesaron, a partir de esto se determinó la posología para cada ratón y para cada ensayo, con base en ello se preparaba la disolución del extracto, se pesaba una cantidad determinada de polvo seco de *V. crocata* (Cav.)Less, se disolvía en agua destilada con ayuda de un Sonicador, para obtener una concentración final de 100 mg/Kg de peso, ajustando la dosis cada tercer día.<sup>(27,28)</sup>

### 8.3 Manejo de animales experimentales

Se emplearon cuatro grupos de ratones machos de la cepa CD1 (ensayo agudo y sub-crónico) de 2 meses de edad, de 29-36 g de peso, se mantuvieron en el laboratorio de trabajo, con cambio de viruta de madera diaria y con libre acceso a alimento y agua las 24 h.

El manejo, cuidado y tratamiento de los animales durante el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de la

Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).<sup>(29)</sup>

#### 8.4 Modelo de toxicidad agudo de tres dosis

1. A un grupo de 6 ratones CD1 (grupo tratado), se le administró por sonda gástrica tres dosis de 100 mg/kg/día (0.2 mL/30 g) del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, en intervalos de 1 hora entre cada dosis.
2. Un segundo grupo de 4 ratones CD1 (grupo control), se le administró por sonda gástrica tres dosis de 0.2 mL de salina isotónica al 0.85%, con intervalos de 1 hora entre cada dosis.<sup>(30)</sup>
3. En la espera de una y otra administración se observó si los ratones del grupo tratado presentan signos de toxicidad.
4. Después de 30 min de la última administración se sacrificó a los animales y se obtuvo la sangre en tubos Eppendorf sin anticoagulante por un corte axial para determinar los bio-marcadores séricos.<sup>(31,32)</sup>

#### 8.5 Modelo de toxicidad subcrónico

1. Se administró por sonda gástrica 100 mg/kg/día (0.2 mL/30 g) del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, a un grupo de 14 ratones CD1, durante 30 días, se ajustó la dosis cada tercer día con base en la variación de peso de cada uno de estos.
2. Se observó a los ratones diariamente, para identificar alguna posible manifestación de efecto tóxico.
3. Después de los 30 días, se pesaron por última vez y se sacrificaron todos los animales.

4. Se recolectó dos muestras de sangre: una, en tubos BD Vacutainer<sup>®</sup> con K<sub>2</sub> EDTA para biometría hemática; otra, en tubos Eppendorf sin anticoagulante donde se obtuvo suero.
5. Se extrajeron los órganos hígado, corazón, bazo y riñones, se pesaron y se obtuvo la relación de peso relativo con la siguiente fórmula.

Fórmula 1:

$$\text{peso relativo} = \frac{\text{peso del órgano}}{\text{peso del ratón}} \times 100$$

6. Grupo control. Se administró por sonda gástrica dosis únicas de 0.2 mL de salina isotónica 0.85%, a un grupo de 8 ratones CD1 y se realizó el mismo procedimiento que el grupo tratado.<sup>(31,33,34)</sup>

#### 8.6. Determinación de bio-marcadores y biometría hemática.

Las determinaciones de los bio-marcadores séricos, para los dos ensayos, se realizaron en un equipo automatizado ILab<sup>600®</sup>. Por otro lado, se determinó la biometría hemática en un equipo automatizado Cell-Dyn 3700<sup>®</sup>, para los dos grupos en el ensayo sub-crónico, esto para comprobar si existe alguna alteración hematológica después de la administración continua por 30 días del extracto.

Los resultados obtenidos se analizaron con ayuda del paquete estadístico SPSS<sup>®</sup>, se determinó la diferencia significativa entre los pesos relativos de los órganos del grupo control contra los pesos relativos de los órganos del grupo tratado con el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.)Less.<sup>(35)</sup>

## 9. Resultados

### ❖ Obtención del extracto

Se procesó 316 g de *Verbesina crocata* (Cav.)Less, de la cual se extrajo 55.3 g (peso seco) con un rendimiento total de 17.5%.

#### 9.1 Ensayo agudo

Los ratones del grupo tratado mostraron comportamiento inusual a partir de la segunda administración, con respecto al control; las manifestaciones fueron: respiración agitada, se exhibían ausentes, ensimismados y después de 30 minutos se postraban. Al realizar el análisis estadístico de los resultados de los marcadores séricos de daño renal y hepático de este ensayo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado con el extracto acuoso y el grupo control.

#### 9.2 Ensayo sub-crónico

##### a) Comparación de peso por ratón (final-inicial)

Los ratones empleados en el ensayo sub-crónico se pesaron al inicio, cada tercer día y al final del tratamiento con la finalidad de calcular la dosis que se les administraría y también para observar si existía diferencia de peso después de los 30 días de administración con respecto al inicio del estudio (gráfico 1).

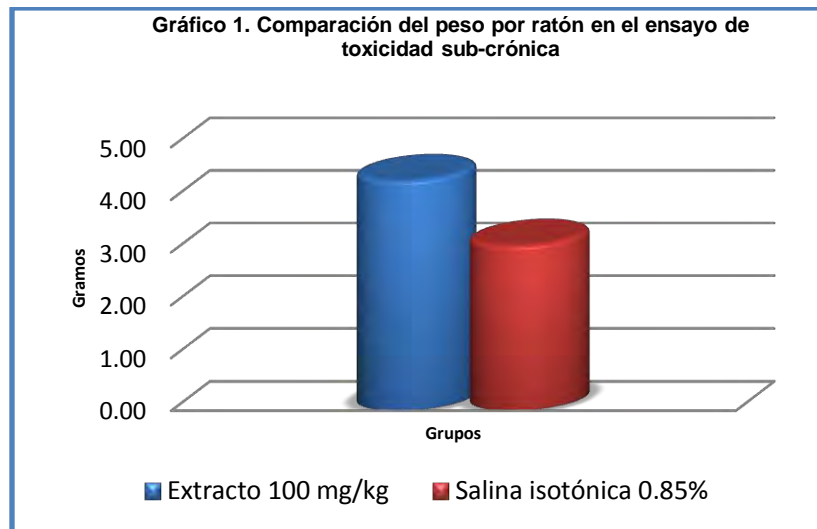


Gráfico 1. Representación de la ganancia neta de peso después de los 30 días de tratamiento.

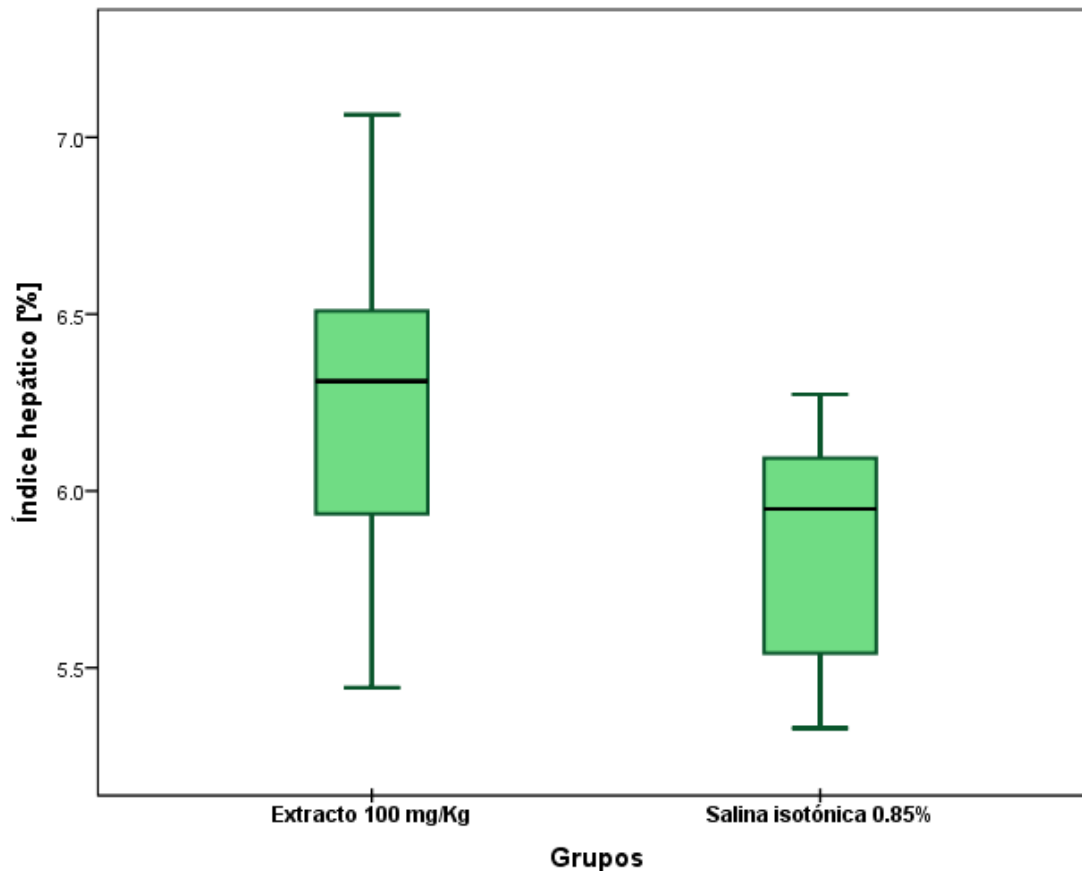
### b) Peso relativo de cada órgano

Para determinar el peso relativo de corazón, bazo, riñones e hígado, se pesó cada ratón, previo al sacrificio, después se pesó por separado cada uno de los órganos extirpados, se empleó la fórmula 1, de la cual se obtuvo el porcentaje relativo como se muestra en la tabla 3; de los cuales, no hubo diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ) en corazón, bazo y riñones; sólo en hígado, con una  $p = 0.046$ , con el valor mayor, para el promedio del extracto, tal como se muestra en la gráfica 2.

**Tabla 3. Peso relativo de cada órgano, para el ensayo de toxicidad sub-crónico.**

| Órgano  | Extracto 100 mg/kg | Salina isotónica 0.85% |
|---------|--------------------|------------------------|
| Hígado  | 6.245 ± 0.45%      | 5.845 ± 0.35%          |
| Corazón | 0.465 ± 0.47%      | 0.458 ± 0.04%          |
| Riñones | 1.369 ± 0.12%      | 1.420 ± 0.13%          |
| Bazo    | 0.452 ± 0.7%       | 0.455 ± 0.12%          |

### Peso relativo



Gráfica 2. Índice hepático de los dos grupos. La gráfica representa la media y el error estándar del índice hepático en porcentaje, por cada columna (prueba T de Student,  $p=0.046$ ).

### c) Perfil hepático

El perfil hepático se determinó a partir del suero extraído de los dos grupos de ratones del ensayo sub-crónico en el equipo ILab<sup>600</sup>. En los valores de AST y ALT, no hubo diferencias significativas ( $p>0.05$ ); sólo en LDH, con una  $p=0.002$ , con el valor mayor para el promedio del control, esto se muestra en la gráfica 3.



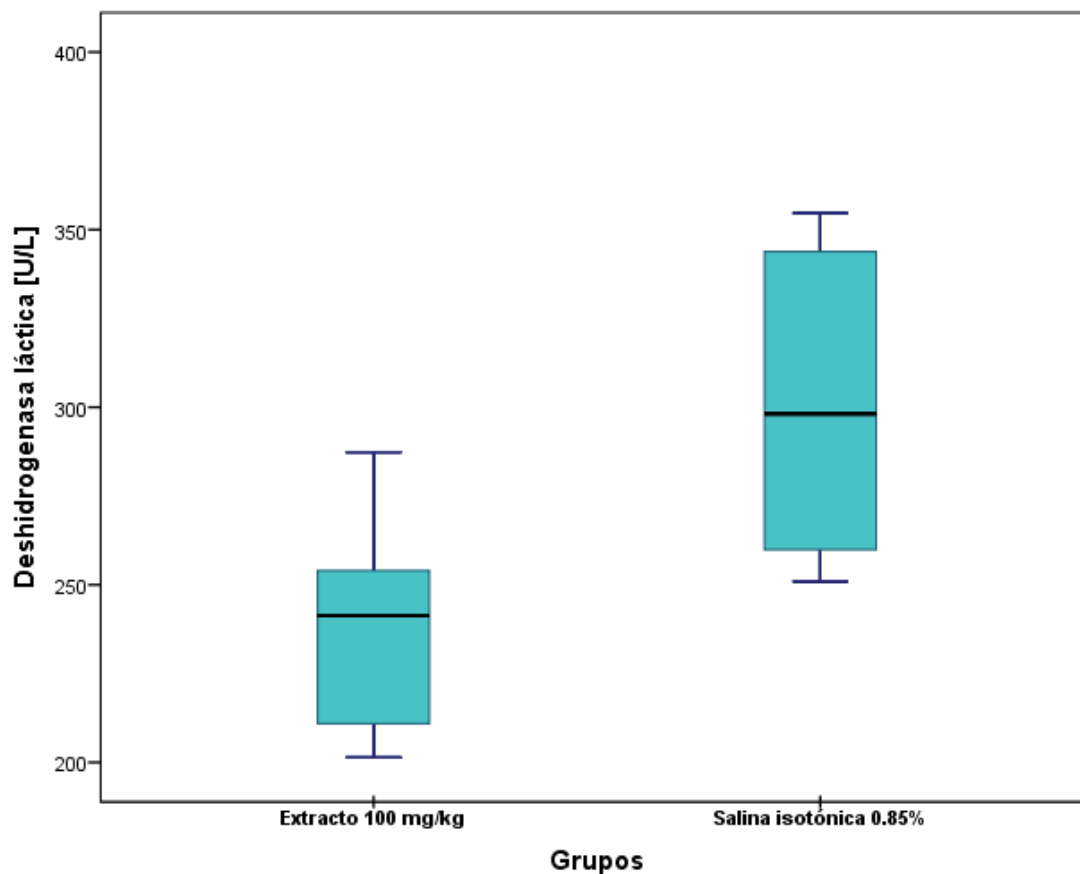
**Tabla 4. Resultado de bio-marcadores, para el ensayo sub-crónico**

| Bio-marcador | Extracto 100 mg/kg** | Salina isotónica 0.85%** |
|--------------|----------------------|--------------------------|
| AST          | 157.71 ± 17.98 U/L   | 185.75 ± 49.99 U/L       |
| ALT          | 62.93 ± 11.24 U/L    | 67.38 ± 13.75 U/L        |
| *LDH         | 238.72 ± 18.25 U/L   | 301.16 ± 22.50 U/L       |
| Creatinina   | 0.364 ± 0.07 mg/dL   | 0.363 ± 0.04 mg/dL       |
| BUN          | 30.710 ± 5.39 mg/dL  | 32.25 ± 5.33 mg/dL       |

\*LDH, significancia estadística  $p=0.002$ .

\*\*14 ratones empleados para el grupo tratado y 8 ratones para el grupo control.

### Deshidrogenasa láctica



Gráfica 3. Niveles de la enzima deshidrogenasa láctica (LDH), para los animales tratados y el control. La gráfica representa la media y el error estándar de la concentración de LDH en UI/L, por cada columna (prueba T de Student,  $p=0.002$ ).

#### d) Biometría hemática

Para la determinación de BH completa, se obtuvieron muestras sanguíneas en tubos de 3 mL K<sub>2</sub>EDTA, 7.2 mg (BD Vacutainer<sup>®</sup>), se analizó cada una de estas en el equipo Cell Dyn 3700<sup>®</sup>, los parámetros tabla 5, no mostraron diferencias estadísticas significativas ( $p > 0.05$ ).

**Tabla 5. Resultados de biometría hemática para el ensayo sub-crónico.**

| <b>Parámetro</b> | <b>Extracto 100 mg/kg*</b>              | <b>Salina isotónica 0.85%*</b>          |
|------------------|---|---|
| Eritrocitos      | $8.25 \pm 2.42 \times 10^6 / \text{mL}$ | $8.13 \pm 3.30 \times 10^6 / \text{mL}$ |
| Hemoglobina      | $14.43 \pm 3.32 \text{ mg/dL}$          | $14.63 \pm 3.21 \text{ mg/dL}$          |
| Hematocrito      | $49.53 \pm 3.06\%$                      | $49.75 \pm 2.25\%$                      |
| VCM              | $60.03 \pm 1.30 \text{ fL}$             | $61.19 \pm 1.29 \text{ fL}$             |
| HCM              | $17.49 \pm 0.08 \text{ pg}$             | $17.99 \pm 0.28 \text{ pg}$             |
| CMHC             | $29.13 \pm 0.25 \text{ g/dL}$           | $29.40 \pm 0.47 \text{ g/dL}$           |
| ADE              | $15.94 \pm 0.15\%$                      | $16.05 \pm 0.22\%$                      |
| Leucocitos       | $8.07 \pm 0.53 \times 10^3 / \text{mL}$ | $8.04 \pm 0.18 \times 10^3 / \text{mL}$ |
| Neutrófilos      | 24.03%                                  | 24.45%                                  |
| Linfocitos       | 66.54%                                  | 66.66%                                  |
| Monocitos        | 6.86%                                   | 6.08%                                   |
| Eosinófilos      | 2.30%                                   | 2.45%                                   |
| Basófilos        | 0.27%                                   | 0.36%                                   |
| Plaquetas        | $1554 \pm 0.42 \times 10^3 / \text{mL}$ | $1549 \pm 0.49 \times 10^3 / \text{mL}$ |

\*14 ratones empleados para el grupo tratado y 8 ratones para el grupo control.

## 10. Discusión

### 10.1 Ensayo agudo

Para este ensayo se administró por sonda gástrica el extracto acuso a 100 mg/kg/día en un volumen de (0.2 mL/36 g de peso), en intervalos de una hora, durante 3 horas, observando el patrón de comportamiento entre cada administración; al grupo control se le administró salina isotónica 0.85% del mismo modo que al grupo tratado.<sup>(36)</sup>

El grupo tratado mostró comportamiento inusual a partir de la segunda administración, respecto al control. Los ratones presentaron respiración agitada (alteración cardiovascular), se exhibían ausentes y ensimismados (alteraciones neurológicas); posiblemente sea por la actividad de las lactonas sesquiterpénicas ya que estas presentan acciones tales como: citotoxicidad, antiinflamatorias, antibacterianas, anticancerígenas, antivirales, anti-fúngicas, efectos en el sistema nervioso central (SNC) y cardiovascular; entre otras y debido a que la actividad de cada lactona sesquiterpénica dependen de las diferencias en el número de alquilaciones, lipofilicidad, geometría molecular de estos elementos y su entorno químico, tomando como blanco los grupos tioles, resulta aventurado sospechar de una lactona específica.<sup>(5)</sup> Sin embargo, siendo que este principio activo es característico de la familia *Asterace*,<sup>(4)</sup> no se descarta su participación en las alteraciones al SNC y cardiovascular<sup>(37)</sup> exhibidas por los ratones después de la segunda administración, durante 50 minutos posteriores a la misma y también después de la tercera administración.

Una vez terminado el ensayo se sacrificaron los dos grupos para determinar sus bio-marcadores séricos (los perfiles hepático y renal)<sup>(38)</sup>, los resultados no mostraron diferencia significativa con una confiabilidad del 95%, analizado estadísticamente.<sup>(31)</sup>

Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el comportamiento que presentaron los ratones en el ensayo de toxicidad aguda a tres dosis, no pudo ser sustentado por ningún resultado tangible, tal como alteración en los bio-marcadores; por lo tanto éstas observaciones deberían de estudiarse a fondo, debido a que pueden ser ambiguas como señales de toxicidad.

## 10.2 Ensayo sub-crónico

Para realizar el ensayo sub-crónico también se le administró vía enteral la misma dosis (100 mg/kg/día) a dos grupos (tratados y control), una vez al día, durante 30 días, determinando su dosis de acuerdo a su peso cada tercer día. Al término de este periodo se obtuvo dos muestras sanguíneas, una para determinar biometría hemática y otra para determinar los bio-marcadores séricos<sup>(18)</sup>.

La diferencia de peso inicial y peso final de los ratones entre tratados vs. control fue de 1.23 g, siendo el incremento neto en el grupo tratado, tal como se muestra en la Gráfica 1, la ganancia de peso por parte del grupo tratado se debió al incremento de apetito, debido a su ansiedad y/o estrés y al existir más estrés los ratones se alimentaban en exceso<sup>(39)</sup>, lo que podría verse reflejado en el aumento de las transaminasas; por otro lado, determinar los pesos relativos de los órganos extirpados (ver tabla 3), se encontró que sólo el hígado presentó diferencia

significativa ( $p=0.046$ ); lo que indicaría que el extracto aumentó la actividad microsomal hepática.<sup>(37,40)</sup>

Partiendo de lo anterior se procedió a determinar los bio-marcadores, ver tabla 4, ya que estos resultados demostrarían si existió una alteración fisiológica del hígado debido a una lesión hepatocelular o citólisis; asimismo, se realizó la cuantificación de la enzima lactado deshidrogenasa total (LDH); de estos parámetros se obtuvo que sólo la LDH estaba aumentada en el grupo control (salina isotónica 0.85%), presentando diferencia significativa ( $p= 0.002$ ); debido a que esta enzima es intracelular de diversos tejidos no es un indicador específico de ninguna enfermedad o daño en algún órgano<sup>(22,40,41)</sup>, sólo se puede suponer que el extracto contiene ácido ascórbico<sup>(26)</sup> y este sea el posible responsable de la disminución de esta enzima en el grupo tratado.

Por otra parte, se determinó también el hemograma de los dos grupos (tabla 5); el volumen corpuscular medio (VCM) resultando el grupo tratado el valor menor, y como este parámetro es un promedio del tamaño de un eritrocito, lo que significa que presentan microcitosis. El valor de VCM se relaciona con anemia por deficiencia de hierro o con talasemia<sup>(26,40,42)</sup>, sin embargo, la concentración de hemoglobina (Hb), prueba que indica la cantidad total de Hb en la sangre, y además es una parte integral en la valoración de anemias, estaba dentro de rango, lo que descarta una anemia por parte del grupo tratado; por otro lado la amplitud de distribución eritrocítica (ADE) indicador de la variación del tamaño de los eritrocitos, parámetro que puede ser de utilidad para clasificar ciertos tipos de

anemia<sup>(24)</sup>, se encontraba dentro de rango<sup>(43)</sup>; por lo que se descarta variación en el tamaño, anisocitosis, igualmente por el grupo tratado. El conteo total de eritrocitos no presentó diferencias significativas y dichos valores se encuentran dentro de los valores de referencia, por lo tanto, al no existir un indicativo del valor disminuido de VCM<sup>(44)</sup>, se puede inferir que fue un problema aislado durante la determinación de este parámetro debido a la elevada desviación estándar entre los valores obtenidos.

## 11. Conclusión

- Los resultados obtenidos mostraron que el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, administrada a 100 mg/kg/día, no produce efectos evidentes de toxicidad en los órganos extirpados, ni alteración en los índices hematológicos y bio-marcadores en ratones CD1.
- No presento toxicidad el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, administrada a 100 mg/kg/día en el ensayo agudo de 3 dosis
- No presento toxicidad el extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less, administrada a 100 mg/kg/día en el ensayo sub-crónico

## 12. Recomendaciones

- Realizar estudios de fitoquímica para determinar los principios activos específicos que contiene esta planta y comprobar si la responsable de la disminución del LDH fue de la disminución del extracto en el grupo tratado.
- Determinar la curva dosis-respuesta ( $LD_{50}$ ,  $LD_{100}$ .) para este extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav.) Less.
- Realizar nuevamente estudios de toxicidad aguda de tres dosis pero, empleando dosis por debajo y encima de la utilizada en este estudio.



### 13. Referencias

1. OMS. Nuevas directrices de la OMS para fomentar el uso adecuado de las medicinas tradicionales [Internet]. Organización Mundial de la Salud. World Health Organization; 2004 [citado 22 de febrero de 2016]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2004/pr44/es/>
2. Osorio D EJ. Aspectos básicos de farmacognosia. Universidad de antioquia; 2009.
3. Cortez-Gallardo V, Macedo-Ceja J, Arteaga-Aureoles G. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. Rev Biomed. Xalapa, México; 2004;15(2):123-36.
4. Del Vitto LA, Petenatti EM. Asteráceas de importancia económica y ambiental: Primera parte. Sinopsis morfológica y taxonómica, importancia ecológica y plantas de interés industrial. Multequina. San Luis, Argentina: Mendoza (Provincia). Dirección de Recursos Naturales Renovables de Mendoza; Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Aridas (IADIZA-CONICET); 2009;18(2):87-115.
5. Ruiz-Reyes E, Suarez M. Lactonas sesquiterpénicas. Diversidad estructural y sus actividades biológicas. CENIC Ciencias Biológicas [Internet]. La Habana, Cuba; 2015 [citado 16 de febrero de 2016];46(1):9-24. Recuperado a partir de: [http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB\\_21-14\\_M.pdf](http://revista.cnic.edu.cu/revistaCB/sites/default/files/articulos/CB_21-14_M.pdf)
6. Rojas Chávez S, Vibrans H, Tenorio Lezama P. *Verbesina crocata* (Cav.) Less. [Internet]. 2011 [citado 10 de febrero de 2016]. Recuperado a partir de: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/verbesina-crocata/fichas/ficha.htm>

7. Mexicana B digital de la medicina tradicional. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Capitaneja. [Internet]. CDMX, México; 2009 [citado 15 de febrero de 2016]. Recuperado a partir de: [http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbesina a crocata&id=7043](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Verbesina%20a%20crocata&id=7043)
8. Arizaga S. Estudio y Colección Viva de Plantas Medicinales Nativas y Formación de un Banco de Germoplasma del Estado de Michoacán [Internet]. UNAM. Morelia; 2007 [citado 20 de febrero de 2016]. p. 1-64. Recuperado a partir de: [http://www.inecc.gob.mx/descargas/con\\_eco/2007\\_plantas\\_medicinales.pdf](http://www.inecc.gob.mx/descargas/con_eco/2007_plantas_medicinales.pdf)
9. Klassen CD. Principles of toxicology. En: Casarett & Doull's, Toxicology, the basic science of poisons. 6.<sup>a</sup> ed. New York: McGraw-Hill Professional; 2001. p. 1-83.
10. Ronco A, Consuelo D B M, Pica G Y. Conceptos generales. En: Castillo G, editor. Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas. México: Instituto Mexicano de Tecnología del Agua; 2004. p. 17-22.
11. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. Biomedicina. Montevideo, Uruguay; 2006;2(3):252-6.
12. Research Models. Vol. 1, Charles River. 2011.
13. Universities Federation for Animal Welfare. The design of animal experiments. En: UFAW, Trevor PB, editores. The UFAW Handbook on the care and the management of laboratory animals. 8.<sup>a</sup> ed. New York: Wiley-Blackwell; 2010. p. 256-75.

14. FDA/CDER/CBER. Product Development Under the Animal Rule - Guidance for Industry. FDA. New Hampshire; 2015.
15. Lister L. Sub-acute , Sub-chronic and Chronic Systemic Toxicity Testing of Medical Devices Applying Drug and Chemical Test Methodologies to Biocompatibility Testing. Bedford; 2013.
16. OECD. Organization for Economic Co-operation and Development. Test No. 423: Acute Oral toxicity. Acute Toxic Class Method. OECD Publ. Paris; 2002;(December):1-14.
17. FDA. International Conference on Harmonisation; Guidance on the Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Nonrodent Toxicity Testing); Availability. Vol. 64, Federal Register. 1999.
18. OECD. Test No. 452: Chronic Toxicity Studies. OECD Guidel Test Chem. Paris; 2009;(September):1-16.
19. Fink NE. Automatización en hematología. REVISIÓN Hematol N°. 2005;9(1):4-16.
20. Fink N, Carbina N, Lazarowski A. Automatización del Hemograma. 2015.
21. FDA. Substantial equivalence determination decision summary. 2015.
22. Bishop ML. Química clínica: principios, procedimientos y correlaciones. 5.ª ed. D.F., México: McGraw-Hill Professional; 2006.
23. Instituto de Bioquímica Clínica. Hemograma Electrónico (Automatizado) &quot;Su Evaluación&quot;; [Internet]. 2015 [citado 21 de marzo de 2016]. Recuperado a partir de:

- <http://www.ibcrosario.com.ar/articulos/HemogramaElectronicoSuEvaluacion.html>
24. Ruiz Argüelles GJ. Fundamentos de hematología. 4.<sup>a</sup> ed. Buenos Aires: Panamericana médica ; 2009. 13-24 p.
  25. Gil Hernández F. El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana. Rev Toxicol [Internet]. Granada, España; 2000;17(1):19-26. Recuperado a partir de: <http://www.citeulike.org/group/16364/article/10691829>
  26. Pagana K, Pagana T. Biometría hemática, Función renal, Función hepática. En: Laboratorio clínico. 1.<sup>a</sup> ed. México: Manual Moderno; 2015. p. 16-45, 75-115.
  27. Rodríguez Arreguin LH. Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav). Less. (capitaneja) en ratón CD1. Universidad Nacional Autónoma de México; 2014.
  28. García Peralta AM. Evaluación del efecto cicatrizante y antimicrobiano del extracto acuoso de *Verbesina crocata* (Cav). Less. en ratón CD1. [CDMX, México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
  29. SAGARPA. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [Internet]. Diario Oficial de la Federación. 2001. Recuperado a partir de: <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743>
  30. Han C-T, Kim M-J, Moon S-H, Jeon Y-R, Hwang J-S, Nam C, et al. Acute and 28-Day Subacute Toxicity Studies of Hexane Extracts of the Roots of *Lithospermum erythrorhizon* in Sprague-Dawley Rats. Toxicol Res. Miryang, Korea; diciembre de 2015;31(4):403-14.
-

31. Marroquín-Segura R, Calvillo-Esparza R, Mora-Guevara JLA, Tovalín-Ahumada JH, Aguilar-Contreras A, Hernández-Abad VJ. Increased acetylcholine esterase activity produced by the administration of an aqueous extract of the seed kernel of *Thevetia peruviana* and its role on acute and subchronic intoxication in mice. *Pharmacogn Mag. D.F., México*; enero de 2014;10(Suppl 1):S171-5.
32. CDER (Center for Drug Evaluation and Research). Single Dose Acute Toxicity Testing for Pharmaceuticals. *Guid Ind.* 1996;1(August):3.
33. Carreón-Sánchez R, Marroquín-Segura R, Mora G JLA, Valdez-Sánchez CS, Flores-Cabrera Y, Flores-Pimentel M, et al. Estudio del extracto etanólico de *Eryngium heterophyllum* (hierba del sapo) para comprobar su actividad hipoglucemiante y antiinflamatoria. *Rev Mex Ciencias Farm. CDMX, México*; 2013;44(2):41-5.
34. Marroquín-Segura R, Maurilio Flores P, Mercedes García MB, Mora G JLA, Sánchez R JF, Aguilar C AA. Efecto Antihiper glucémico de un extracto acuoso de colubrina elíptica. *Rev Mex Ciencias Farm. Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C.*; 2005;36(3):27-32.
35. Vargas Ángeles CA. Evaluación de la toxicidad subaguda y efecto hipoglucemia del extracto acuoso de *Montanoa tomentosa* en un modelo de ratones CD1. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
36. Okonkwo COJ, Ehileboh AD, Nwobodo E, Dike CC. The effects of acute gasoline vapour inhalation on some haematological indices of albino Wistar rats. *J Acute Dis.* 2016;5(2):123-5.
37. Barrett K, Barman S, Boitano S, Brooks H. *Fisiología médica*. 24.<sup>a</sup> ed. D.F.: McGraw

- Hill Professional; 2012.
38. Bermúdez T D, Monteagudo J E, Boffill C M, Díaz C LE, Roca S A, Betancourt M E, et al. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. REDVET Rev Electrónica Vet [Internet]. Veterinaria Organización; 2007 [citado 30 de marzo de 2016];VIII(3):1-7. Recuperado a partir de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613302006>
  39. Laurence BL, Blumenthal DK, Buxton ILO, Parker KL. Farmacología - Goodman & Gilman.Pdf. 11.<sup>a</sup> ed. Michigan: McGraw Hill Professional; 2007.
  40. Bernard JH, Frederick DR, Herman CJ, Richard M. El laboratorio en el Diagnóstico Clínico: Homenaje a Todd-Sanford & Davidsohn. New York: Marbán; 1991. 325-520 p.
  41. García Martín M, Zurita Molina A. Transaminasas: Valoración y significación clínica [Internet]. Hospital Universitario Virgen Macarena. Madrid, España; 1998 [citado 3 de marzo de 2016]. p. 267-75. Recuperado a partir de: <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>
  42. Robert HS. Manual de hematología. En: 2.<sup>a</sup> ed. Santafé de Bogotá: Manual Moderno; 1999. p. 3-142.
  43. River C. CD-1 Mouse Hematology CD-1 and Mouse Biochemistry. Vol. 1. 2011.
  44. Basurto-Alcántara FJ, Mondragón V RL, Atilano-López D, Montaraz-Crespo JA, Marques DS MJ, Marroquín-Segura R. Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigótico et /+ y desnudo et/et. Medicina Veterinaria. [D.F., México]: Universidad Nacional Autónoma de México; 2000.
-