



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS
DE HIDALGO



FACULTAD DE QUÍMICO-FARMACOBIOLOGÍA

“EVALUACIÓN DE TOXICIDAD AGUDA Y SUB-CRÓNICA DE LAS
HOJAS DE BERRO (*Nasturtium officinale*)

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
QUÍMICO-FARMACOBIOLOGO

Presentado por:

p.Q.F.B. VÍCTOR MANUEL AYALA VILLANUEVA

Directora de tesis:

Doctora en Ciencias Fisiológicas
BERTHA FENTON NAVARRO

Morelia, Michoacán, Noviembre, 2014

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Glicobiología de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección de la D.C. Bertha Fenton Navarro.

Parcialmente apoyado por CIC-UMSNH 16.2-2013

COMITÉ TUTORIAL:

- M.C. Blanca Nateras Marín

- M.C. Manuel López Rodríguez

- Q.F.B. Alma Rosa García Ríos

- D.C. Ma. de los Dolores López Calvillo

- Q.F.B. Armando Ordaz Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

Primeramente agradezco a Dios por haberme permitido realizar el sueño de terminar la carrera de Químico-Farmacobiología, de brindarme salud y poner en mi camino todo lo necesario para terminar esta etapa de mi vida.

A la D.C. Bertha Fenton Navarro por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación. Por darme su apoyo, comprensión, paciencia y todos los conocimientos que fueron necesarios para la realización de mi trabajo.

A mi mamá Oliva Villanueva Villaseñor por haberme dado una carrera para mi futuro apoyándome incondicionalmente durante toda mi preparación y estar conmigo en todas mis decisiones.

A mi Tío Aldo Ayala Mora por apoyarme incondicionalmente en toda mi formación académica tanto económica como moralmente.

A todos los maestros que me ayudaron brindándome de sus conocimientos para la realización de este trabajo: M.C. Blanca Nateras Marín, Q.F.B. Judith Esmeralda Prieto Sierra, M.V.Z. Adrián Sánchez Orozco, M.C. Manuel López Rodríguez, M.C. Salvador Padilla Arellanes. Q..B. Luz María Verduzco Guzmán, L.N. Selene Tenorio Ramos.

A todo el equipo de trabajo del laboratorio de Glicobiología quienes hicieron amenos cada día durante todo este tiempo.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FÍGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
I INTRODUCCIÓN	13
1 PLANTAS MEDICINALES	13
1.1 Historia	13
1.2 Generalidades y usos	14
1.3 La medicina natural como una alternativa actual	16
1.4 Herbolaria en México	18
1.5 Definiciones de la OMS sobre la medicina tradicional	19
2 BERRO	22
2.1 Descripción de la planta	22
2.2 Clasificación Taxonómica	22
2.3 Usos en la medicina tradicional	23
2.4 Propiedades farmacológicas	25
3. TOXICOLOGÍA	26
3.1 Definición	26
3.2 Importancia de la dosis y relación dosis-respuesta	27
3.3 Toxicidad de plantas medicinales	29
3.4 Pruebas de toxicidad sistémica	31
3.5 Toxicidad aguda	32
3.6 Definición Toxicidad sub-crónica (10% de la vida del animal, de 1 a 3 meses)	33
3.7 Toxicidad crónica (3 meses a 1-2 años)	34
3.8 Método de dosis fijas OECD No. 420 y dosis repetidas por 28 días Toxicidad sub-crónica (OECD No. 407)	35
3.9 Criterio para la clasificación de sustancias tóxicas.	42
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	56
III. HIPOTESIS	57
IV. OBJETIVO GENERAL	57
V. OBJETIVOS PARTICULARES	57
VI. MATERIAL	58
VII. MÉTODOS	58
Manejo de los animales	58
Preparación del extracto	58

Pruebas de toxicidad aguda	59
Pruebas de toxicidad sub-crónica	59
Pruebas de hematología y de bioquímica clínica	60
Histología	60
Análisis estadístico	62
VIII RESULTADOS	63
IX DISCUSIÓN	87
X CONCLUSIONES	94
XI PERSPECTIVAS	95
XII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de berro (<i>Nasturtium officinale</i>)	22
Figura 2. Registro de la temperatura en toxicidad aguda.	64
Figura 3 Peso corporal en toxicidad aguda	65
Figura 4 Peso de los órganos en toxicidad aguda.	67
Figura 5 a) Bazo, b) páncreas, c) hígado y d) corazón de ratas en toxicidad aguda.	70
Figura 6 a) riñón, b) pulmón y c) cerebro de ratas en toxicidad aguda.	70
Figura 7 Corte histológico de un riñón sano.	71
Figura 8 Micrografías del análisis celular del riñón de ratas en Toxicidad aguda	71
Figura 9 Corte de un histológico de hígado sano.	72
Figura 10 Micrografías del análisis celular del hígado de ratas en Toxicidad aguda.	72
Figura 11 Corte histológico de corazón.	73
Figura 12 Micrografías del análisis celular del corazón de ratas en Toxicidad aguda.	73
Figura 13 Corte histológico del pulmón sano.	74
Figura 14 Micrografías del análisis celular del pulmón de ratas en Toxicidad aguda.	74
Figura 15 Peso corporal de ratas macho en toxicidad sub-crónica.	76
Figura 16 Peso corporal de ratas hembras en toxicidad sub-crónica.	76
Figura 17 Peso de los órganos de ratas macho en toxicidad sub-crónica.	77
Figura 18 Peso de los órganos de ratas hembras en toxicidad sub-crónica.	78
Figura 19 a) Hígado, b) riñones, c) bazo y d) corazón de ratas en toxicidad sub-crónica.	81
Figura 20 a) cerebro, b) pulmón y c) páncreas de ratas en toxicidad sub-crónica	81
Figura 21 Micrografías del análisis celular del riñón de ratas macho en Toxicidad sub-crónica	82
Figura 22 Micrografías del análisis celular del riñón de ratas hembras en Toxicidad sub-crónica	83
Figura 23 Micrografías del análisis celular del hígado de ratas macho en Toxicidad sub-crónica.	83
Figura 24 Micrografías del análisis celular del hígado de ratas hembras en Toxicidad sub-crónica.	84
Figura 25 Micrografías del análisis celular del corazón de ratas macho en Toxicidad sub-crónica	84
Figura 26 Micrografías del análisis celular del corazón de ratas hembras en Toxicidad sub-crónica	85
Figura 27 Micrografías del análisis celular del pulmón de ratas macho en Toxicidad sub-crónica	85
Figura 28 Micrografías del análisis celular del pulmón de ratas hembras en Toxicidad sub-crónica.	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Uso del berro (<i>Nasturtium officinale</i>) en la herbolaria _____	23
Tabla 2. Categorías de peligro de toxicidad aguda y estimaciones de la toxicidad aguda (ETA) que definen las categorías respectivas _____	43
Tabla 3. Conversión de un rango de valores de toxicidad aguda obtenidos experimentalmente (o categorías de peligro de toxicidad aguda) en estimaciones puntuales de toxicidad. _____	43
Tabla 4. Método de hematoxilina-eosina _____	61
Tabla 5. Registro de la temperatura en toxicidad aguda. _____	64
Tabla 6. Registro del peso corporal en toxicidad aguda _____	65
Tabla 7. Peso de los órganos en toxicidad aguda _____	67
Tabla 8. Parámetros bioquímicos en toxicidad aguda _____	68
Tabla 9. Parámetros hematológicos en toxicidad aguda _____	69
Tabla 10. Registro del peso corporal en toxicidad sub-crónica para ratas machos y hembras ____	75
Tabla 11. Peso de los órganos en toxicidad sub-crónica para ratas hembras y machos. _____	77
Tabla 12. Parámetros bioquímicos para ratas machos y hembras en toxicidad sub-crónica. _____	79
Tabla 13. Parámetros de hematología para ratas machos y hembras en toxicidad sub-crónica. _	80

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADE	Amplitud de la Distribución Eritrocitaria
ALB	Albumina
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato Aminotransferasa
AP	Amiloide P
Ca	Calcio
CAM	Medicina Alternativa Complementaria
CHCM	Hemoglobina Corpuscular Media Concentración
CREAT	Creatinina
CK	Creatin c-inasa
COL	Colesterol
DL50	Dosis Letal 50
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
ETA	Estimaciones de la Toxicidad
FA	Fosfatasa Alcalina
GDH	Glutamato Deshidrogenasa
GI	Gastrointestinal
GGT	Gama Glutamil Transpeptidasa
GLOB	Globulinas
GLC	Glucosa
HCT	Hematocrito
HGB	Hemoglobina
LEU	Leucocitos
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos
OMS	Organización Mundial de la Salud
P	Fosforo
PH	Potencial de Hidrogeno
PLQ	Plaquetas
PT	Proteínas Totales
PRONAPLAMED	Programa Nacional de Plantas Medicinales

SGA	Sistema Globalmente Aceptado para la Clasificación de Sustancias y Mezclas Químicas
SDH	Sorbito deshidrogenasa
TG	Toxicidad General
TP	Tiempo de Protrombina
VCM	Volumen Corpuscular Medio

RESUMEN

La existencia de la Medicina Natural es tan antigua como el hombre mismo, su uso a través del tiempo ha demostrado su inocuidad y eficacia para curar y aliviar enfermedades y padecimientos. En el presente trabajo se eligió una planta de nombre berro (*Nasturtium officinale*) la cual se ha utilizado para curar problemas renales, menstruales, depurativos, hipoglucemiantes e inclusive para el cáncer. Debido a su gran consumo y a que no existen reportes sobre su toxicidad se planteó el presente trabajo de investigación con el objetivo de analizar su efecto toxico. Se realizaron los ensayos de toxicidad de acuerdo a la OECD-420 (toxicidad aguda) con dosis de 5, 50, 500, 2000 y 5000 mg/Kg de peso corporal y OECD-407 (toxicidad sub-crónica) con dosis de 1000 y 5000 mg/Kg de peso corporal. Al administrar el extracto no se presentaron cambios físicos ni conductuales a dosis única ni a dosis repetidas. Durante la necropsia se realizó una observación macroscópica a los órganos donde no se ve algún daño aparente, presencia de congestión, pus o coloración fuera de lo normal, y cada uno de los órganos tenía un peso adecuado. En las pruebas de bioquímica clínica y hematología todos los parámetros se encontraron con valores dentro de los rangos indicados. Por último se realizó un estudio histopatológico, en el cual se corroboró que las células de los diferentes tejidos analizados (Riñón, Hígado, Corazón y Pulmón) no presentaron daños o alteraciones estructurales. Se concluye que el extracto es “no toxico” y se clasifica en la categoría 5 de la clasificación del sistema globalmente aceptado para la clasificación de sustancias y mezclas químicas (GHS) que corresponde a las mezclas que tienen una toxicidad aguda relativamente baja o nula. Por lo tanto se puede afirmar que el extracto de hojas de berro (*Nasturtium officinale*) es un medicamento herbolario completamente seguro para su consumo.

Palabras clave: berro, *Nasturtium officinale*. Toxicidad, aguda, sub-crónica

ABSTRACT

The existence of natural medicine is as ancient as man himself. Its use throughout time has demonstrated its safety and effectiveness to cure and relieve diseases and ailments. In this work, a plant known as watercress (*Nasturtium officinale*) was chosen, which has been used to treat problems such as renal failure, menstrual pains, hypoglycemia and even cancer. Due to its great consumption and to the fact that there aren't any reports regarding its toxicity, the main goal of this research work is to analyze the toxic effect of the aforementioned plant. Toxicity tests were performed in accordance to the *OECD-420* (acute toxicity), with doses of 5, 50, 500, 2000 and 5000 mg/Kg of body weight, and the *OECD-407* (subchronic toxicity), with doses of 1000 and 5000 mg/Kg of body weight. No physical or behavioral changes occurred when single or repeated doses were administered. During the necropsy, a macroscopic analysis of the organs was performed, in which no visible damage could be observed. There was no unusual congestion, pus or coloration, and each organ had the appropriate weight. On the clinical biochemistry and hematologic tests, all parameters had values within the specified ranges. Lastly, a histopathologic study was performed, which helped to verify that the cells of the different analyzed tissues (kidney, liver, heart and lung) didn't suffer any damage or structural modifications. Therefore, it is concluded that the extract is non-toxic and it is classified under category 5 of the globally accepted system for classification of chemical substances and mixtures (GHS). This classification corresponds to mixtures that have a relatively low or nonexistent acute toxicity. Based on these results, it can be affirmed that the watercress (*Nasturtium officinale*) leaf extract is a completely safe herbal medicine.

Key words: *Nasturtium officinale*, acute and sub-chronic toxicity.

I INTRODUCCIÓN

1 PLANTAS MEDICINALES

1.1 Historia

La medicina tradicional es la suma total de los conocimientos, habilidades y prácticas basadas en las teorías, creencias y experiencias que, pudiendo explicarse o no, se ha utilizado en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención, diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas y mentales. Basados exclusivamente en la experiencia y la observación, y transmitidos verbalmente o por escrito de una generación a otra (WHO 2013; Redrobán, 2012).

La historia de la medicina tiene su origen en los albores de la humanidad. El tratamiento de las enfermedades del ser humano comenzó probablemente en la prehistoria, en el íntimo contacto con la naturaleza, con la observación de las costumbres de otros animales y con la experiencia acumulada tras la ingestión accidental o provocada de algunas especies vegetales. Se ha observado en la actualidad como los monos consumen plantas medicinales que contienen componentes químicos que actúan como analgésicos, anti-microbianos, anti-inflamatorios, inmunoestimulantes, antidiarreicos, digestivo, y los reguladores de la fertilidad, mismas plantas que se han consumido por el ser humano desde la antigüedad con el mismo objetivo. (Jiménez, 2007; WHO, 2013).

Las plantas con atributos medicinales fueron las primeras medicinas utilizadas en forma empírica para la cura de enfermedades que padecía el hombre; con el tiempo diferenciaron las que curaban de las que mataban, estos conocimientos eran transmitidos oralmente debido la carencia de escritura. Al desarrollarse la escritura con la aparición del papiro se comenzó a recoger información, convirtiéndose las mismas en patrimonio de unos pocos dentro de las sociedades por las cuales ha atravesado la humanidad hasta nuestros días (Marinof, 2006).

En los últimos años, ha habido una explosión de interés en relación con las plantas y su valor medicinal. En 1994, se aprobó la Ley de Salud y Educación dietética permitiendo que cualquier sustancia que se puede encontrar naturalmente, puede ser vendida como un "suplemento dietético" independientemente de su concentración o peligros potenciales. Desde entonces, el interés por las plantas medicinales ha aumentado dramáticamente. Por desgracia, muchos médicos no son conscientes del potencial tóxico de muchas especies de plantas y por lo tanto, podría ponerse en riesgo la salud en lugar de promoverla (Summer, 2000).

En los siglos XII al XIII la Escuela Árabe y la Salerno de Italia fueron célebres por sus renombrados médicos, que prescribían numerosas drogas vegetales de las cuales muchas son utilizadas en la actualidad. En 1511 se publicó en Barcelona la "Concordia Pharmacopolarum" que es la primera farmacopea territorial del mundo. En 1552 fue escrito el famoso Códice De la Cruz Badiano por el indio Xochimilca Martín de la Cruz y traducido del náhuatl al latín por Juan Badiano en México, contiene el tesoro herbolario de los antiguos Mexicanos. En la Edad Media los árabes perfeccionaron la destilación de las plantas aromáticas, favoreciendo así el desarrollo de la naciente y rudimentaria Farmacia. En el siglo XIX se practican los primeros análisis químicos de esencias y otros principios activos de los vegetales, con la aplicación del microscopio y la química analítica. Nace la farmacología; en 1811 se aísla la morfina a partir del opio. Durante el siglo XX el estudio químico de la composición de los productos naturales así como sus sustancias activas, y por otra el análisis fisiológico de los mecanismos de acción, gracias a la fructífera relación entre la química y la medicina, dieron lugar al gran avance de estas ciencias, de la patología y de la clínica. En 1981 se crea la Asociación Española de Médicos Naturistas (Jiménez, 2007; Marinoft, 2006).

1.2 Generalidades y usos

El origen que se conoce de las plantas medicinales y que han formado parte importante de la historia y de la cultura de los pueblos indígenas, se refiere

su uso y aplicación como remedio de enfermedades, pues constituye un conocimiento que aun en nuestros días, se transmite de forma oral de generación en generación. Algunas de las ventajas que se tienen al utilizarlas son: se pueden conservar por mucho tiempo y la variedad en las que se puede aplicar. Entre los productos que se pueden encontrar están: pomadas, jarabes, té, jabones, shampoo, entre otros. Las plantas medicinales son aquellas que contienen en algunas de sus partes principios activos los cuales administrados en dosis suficientes producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres y de los animales en general. Se calcula que de las 26000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales, es decir, se encuentran recogidas dentro de los tratados médicos de fitoterapia modernos y de épocas pasadas por presentar algún uso (Cosme, 2008).

Casi siempre en la planta se encuentran varios principios activos, de los cuales uno de ellos determinaría la importancia de la especie para alguna aplicación. Estos principios activos, no se distribuyen en forma homogénea por toda la planta, sino preferentemente en las flores, las hojas o las raíces y a veces en las semillas, los frutos o en la corteza. Además es muy importante tener en cuenta que estos principios oscilan, según el hábitat de la planta, la recolección y la preparación (Kamal, 2011; Najera, 1983; OWH, 2001).

A las plantas medicinales se las llaman también "drogas", pero esa denominación no significa alucinógenos o similares, sino simplemente ejemplares secos y bien preparados, o partes de los mismos. Los principios activos de las plantas pueden ser sustancias simples (como alcaloides) o bien mezclas complejas (resinas, aceites esenciales, etc.). Los compuestos más comunes son los azúcares y heterósidos (azúcar más un compuesto sin azúcar) que pueden ser glicosilados, galactosidos, etc. Otros componentes activos de las plantas son alcaloides, lípidos, gomas, mucilagos, principios amargos, taninos, resinas, bálsamos, oleorresinas, taninos, aceites esenciales, resinas, ácidos orgánicos, enzimas y vitaminas (Cosme, 2008; Kamal, 2011)

1.3 La medicina natural como una alternativa actual

En la actualidad existe un reconocimiento del empleo de fuentes naturales de medicamentos y en especial de la fitoterapia, justificado en muchos casos por razones económicas, disminución de efectos tóxicos agudos o crónicos muy frecuentes en sustancias químicas puras, con una tendencia en los países desarrollados al retorno del empleo de productos naturales en el tratamiento de diversas afecciones; en lo que se destaca el importante papel de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en cuanto a la utilización de la fitoterapia dentro de los programas de salud de los distintos países, a través de la validación de efectos etnobotánicos adjudicados a las plantas durante la existencia de la humanidad. La OMS apoya el uso de la medicina tradicional y alternativa cuando está demostrado el beneficio y la existencia de mínimo riesgo para el paciente. El uso a través del tiempo demostró la inocuidad y la eficacia de la medicina tradicional, restando en la actualidad comparar lo empírico con lo científico, respetándose en la investigación y evaluación de la medicina tradicional, los conocimientos y la experiencia obtenidos en la larga historia de uso de procedimientos (Marinoff, 2006).

La existencia de la Medicina Natural es tan antigua como el hombre mismo y nadie se atreverían a negar la gran efectividad y el amplio rango de uso que la misma posee. Su diversidad en cuanto a métodos de tratamiento le ha permitido sobrevivir hasta nuestros días y en ningún momento ha sido relegada a un segundo plano ni sustituida por la medicina alopática. Su relación con la medicina occidental es tan estrecha que un grupo importante de fármacos son obtenidos a punto de partida de la sustracción de principios activos de plantas medicinales, por solo citar algunos: la aspirina es derivada del Sauce, la digoxina de la *Digitalis purpurea*, la morfina de la amapola y la penicilina, que en su momento revolucionó la medicina es obtenida del hongo *Penicillium* (Yorkis, 2014).

Los fármacos están ligados a un sistema de salud “ moderno”, que por sus características tiende a la sofisticación tecnológica, a la deshumanización, a una visión restringida del concepto de salud y enfermedad y al menosprecio de

muchos valores culturales, mientras que las plantas medicinales, en el contexto tradicional, están ligadas a una concepción distinta del ser humano y de la naturaleza; no es sólo que ellas sean menos tóxicas, o más baratas, o más fáciles de conseguir, o incluso sean más eficaces, sino que las plantas medicinales nos devuelven la mirada a la naturaleza, a la armonía del ser humano con su entorno y a una cultura donde lo vegetal, en términos de salud, también tiene algo que ofrecernos. Además, la popularidad de las plantas medicinales va en aumento, hoy en día existe más gente que descubre en la fitoterapia una vía muy eficaz y barata para cuidar su salud (Quesada, 2008).

Muchos pacientes que usan remedios CAM (Medicina alternativa complementaria) también toman antidepresivos recetados, arriesgando una interacción entre la planta y el medicamento haciéndolo potencialmente peligroso. Aunque la mayoría de los psicotrópicos son naturales generalmente seguros, no están libres de riesgos, y la idea errónea de público común que lo natural productos son inherentemente segura, ha sido refutada por las predicciones e informes de reacciones tóxicas a partir de estos agentes, que pueden ser debido a la toxicidad intrínseca, la contaminación, o la interacción con otras hierbas o medicamentos. La organización mundial de la salud (OMS) realiza esfuerzos por promover y desarrollar el uso racional de la medicina natural en todo el mundo. En muchos países se ha comprobado el aumento que hace la población del uso de esta medicina. En entrevistas realizadas en los EE.UU., Bélgica, Alemania y Austria se demostró que 60 % de los alemanes y belgas, 74 % entre los botánicos y más de un tercio de la población de los EE.UU, apelan por que se introduzcan estas técnicas en los Sistemas Nacionales de Salud. La importancia en la actualidad de la Medicina Natural se evidencia por el alto consumo de los productos recomendados por esta alternativa para el manejo de las enfermedades. En los Estados Unidos, un estudio mostró un aumento significativo de los tratamientos médicos alternativos, pasando de un 33.8% en 1990 a un 42.1% en 1997. La OMS realiza una encuesta sobre la importancia que se le da a la medicina alternativa en los institutos de investigación donde se muestra un aumento del 37% de 1999 al 2003, un 2% al 2005 y un 15 % al 2012, después de

este último el incremento es muy exponencialmente por lo que la OMSI realiza un estrategia de trabajo que será del 2014 al 2024 (CAM, 2013; Corporan, 2005, OMS, 2013).

El aumento más dramático en ese mismo país se dio con el uso de las hierbas medicinales, cuya utilización pasó de 2.5% en 1990 a un 12.1% en 1997. Otro dato encontrado revela que dentro del 44% de los adultos que reportó el uso regular de medicamentos prescritos por el médico, se encontró que el 18.4% también utilizaba al menos un producto de la medicina herbolaria. En la actualidad, los progresos de la ciencia son tales que desconocidos horizontes se abren a la fitoterapia y otras técnicas de la medicina natural, nuevos métodos científicos por descubrir en las plantas, propiedades actuales de los principios activos y formas originales de utilización en la práctica médica. Los remedios se han convertido en auténticos medicamentos y el empirismo ancestral dará lugar a la ciencia del siglo XXI. La integración de las plantas con valor demostrado ha permitido su incorporación a la terapéutica médica, de acuerdo con las necesidades de cada paciente, evitando así la automedicación. Todo tratamiento, ya sea natural o alopático, mal administrado puede ocasionar trastornos de salud. Por el hecho de ser natural no implica que no pueda causar daño. Esta es la razón para acudir a un centro de tratamiento especializado (Corporán , 2005).

1.4 Herbolaria en México

En México, el uso y conocimiento de plantas medicinales se desarrolló en las culturas prehispánicas y se acentúa esta práctica por 3 razones: la atención a sus enfermedades, la extensa flora, así como una amplitud en número de grupos indígenas que conservan sus propias tradiciones (Castro, 2014)

México, como muchos países tropicales y subtropicales, posee una gran diversidad vegetal; su amplio territorio, la variedad de suelos y los diferentes climas facilitan el crecimiento de distintas especies de plantas y proveen un ambiente propicio para el cultivo y producción de material vegetal útil. Además de

lo anterior, estos países suelen contar con un amplio conocimiento médico tradicional en el que destaca, por su frecuencia, el uso de la herbolaria. En años recientes, como parte inicial de una investigación sobre la epidemiología de los fitomedicamentos en México, se realizó un estudio que tuvo como objetivo obtener información sobre la aceptación que tienen los médicos a estos medicamentos. El estudio se realizó en clínicas de primer nivel del Instituto Mexicano del Seguro Social, y reportó que 68.8 % de los médicos aceptan esta alternativa terapéutica (Romero y Tortoriello, 2007).

En México su rica historia tradicional se remonta a las épocas del gran reinado azteca y tal vez mucho tiempo atrás; revisando como ha ido evolucionando hasta el día de hoy. México cuenta con zonas con alto potencial para la producción de hierbas finas, su creciente demanda las ha convertido en productos con un nicho de mercado rentable y en expansión, además representan una alternativa económica a los cultivos tradicionales (Juárez, 2013)

Existen varias organizaciones que realizan trabajos encaminados a la protección de estas plantas. Una de ellas es la que aplica el Programa Nacional de Plantas Medicinales (PRONAPLAMED), entre sus principales propósitos se encuentran:

- Realizar investigaciones de las plantas medicinales de México.
- Favorecer las relaciones entre empresas fitofarmacéuticas mexicanas con universidades. Actualmente existen aproximadamente quince empresas importantes dedicadas al uso de plantas medicinales.
- Buscar el desarrollo sustentable de las comunidades locales (Flores y Col, 2004).

1.5 Definiciones de la OMS sobre la medicina tradicional

Medicina tradicional: La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias

indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales (Deribe, 2006, OMS, 2014)

Medicina complementaria/alternativa: Los términos "medicina complementaria" y "medicina alternativa", utilizados indistintamente junto con "medicina tradicional" en algunos países, hacen referencia a un conjunto amplio de prácticas de atención de salud que no forman parte de la propia tradición del país y no están integradas en el sistema sanitario principal (Aédo, 2000; OMS, 2014. Peña, 2007)

Medicamentos herbarios: El concepto de medicamentos herbarios abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos (OMS, 2014).

Hierbas: comprenden materiales vegetales brutos, tales como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, madera, corteza, raíces, rizomas y otras partes de plantas, enteros, fragmentados o pulverizados (OMS, 2014; UNIDO y FAO, 2005)

Materiales herbarios: comprenden, además de hierbas, jugos frescos, gomas, aceites fijos, aceites esenciales, resinas y polvos secos de hierbas. En algunos países esos productos se pueden elaborar mediante diversos procedimientos locales, como el tratamiento con vapor, el tostado o el rehogado con miel, bebidas alcohólicas u otros materiales (OMS, 2014; Duke y col.,2002).

Preparaciones herbarias: son la base de los productos herbarios acabados y pueden componerse de materiales herbarios triturados o pulverizados, o extractos, tinturas y aceites grasos de materiales herbarios. Se producen por extracción, fraccionamiento, purificación, concentración y otros procesos biológicos o físicos. También comprenden preparaciones obtenidas macerando o calentando materiales herbarios en bebidas alcohólicas o miel o en otros materiales (OMS, 2014).

Productos herbarios acabados: se componen de preparaciones herbarias hechas a partir de una o más hierbas. Si se utiliza más de una hierba, se puede utilizar también la expresión «mezcla de productos herbarios». Los productos herbarios acabados y las mezclas de productos herbarios pueden contener excipientes, además de los principios activos. Sin embargo, no se consideran herbarios los productos acabados o en forma de mezcla a los que se hayan añadido sustancias activas químicamente definidas, incluidos compuestos sintéticos o constituyentes aislados de materiales herbarios (OMS, 2014).

Uso tradicional de medicamentos herbarios. Por uso tradicional de medicamentos herbarios se entiende un empleo prolongado a lo largo de la historia. Su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz y puede ser aceptado por las autoridades nacionales (OMS, 2014).

Actividad terapéutica. La actividad terapéutica se refiere a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento satisfactorios de enfermedades físicas y mentales, el alivio de los síntomas de las enfermedades y la modificación o regulación benéfica del estado físico y mental del organismo (OMS, 2014. Gruenwald, 2005).

Principio activo. Los principios activos son los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica. En el caso de los medicamentos herbarios cuyos principios activos hayan sido identificados, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados, para que contengan una cantidad determinada de ellos. Si no se logra identificar los principios activos, se puede considerar que todo el medicamento herbario es un solo principio activo (Hortola, 2008; OMS, 2014).

2 BERRO

2.1 Descripción de la planta

Berro (*Nasturtium officinale*) es una planta herbácea de la familia de las crucíferas (*Brassicaceae*) originaria de Europa, y recientemente cultivada en casi todo el mundo. Dispone de una relativa cantidad de vitaminas A, C y K, y una amplia gama de minerales como hierro, calcio, zinc y yodo; se comercializa en fresco y se consume en ensaladas, sopas y otras recetas. Su corta vida de almacenamiento es de casi 7 días y podría extenderse a través de la congelación, lo que permite un período más largo para la distribución y el almacenamiento (Cruz, 2011; Vásquez, 2008).

El berro se empieza a cultivar de manera intensiva debido a que representa una fuente importante de ingresos económicos. Esta hortaliza crece en hábitats acuáticos prefiriendo aguas claras y frías de corriente lenta. Su cultivo se realiza de forma manual; se recolecta y trasplanta en el cauce de los arroyos en donde previamente se instalan mallas de sombreo para disminuir la radiación solar. Sin embargo, este procedimiento representa algunas dificultades, pues en los meses de mayor radiación solar (abril-mayo) el caudal de los arroyos disminuye; por lo que la producción se ve afectada considerablemente llegando, en algunas ocasiones a no crecer (Vásquez, 2008).

2.2 Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

División: Magnoliopsida

Orden: Capparidales

Familia: Brassicaceae

Género *Nasturtium*

Especie: *officinale* R. Br.

Sinonimia: *Rorippa nasturtium-aquaticum* (L) Hayeck



Figura 1. Planta de berro (*Nasturtium officinale*)

Mide aproximadamente 10 a 50 cm de altura con tallos erguidos, gruesos, angulados, huecos, débil consistencia y ramificados. Sus hojas son pinatífidas alargadas de forma oval y con nervaduras muy marcadas de color verde oscuro o verdinegro; con disposición alterna y con bordes enteros o dentados. El tallo es rastrero con rizomas, las raíces son blancas y fibrosas que emergen de los nudos de los tallos. Sus flores son blancas pequeñas con cuatro pétalos agrupadas en racimos o en corimbos cuando se abren los capullos florales, las hojas que son pinnadas y alternadas adquieren un sabor muy purgante, y ya no pueden ser utilizadas como alimento. Los frutos son vainas entre rollizas y angulosas con abolladuras arqueadas y separadas del eje del ramillete por pedúnculos de longitud más cortos que la vaina. La semilla se ordenan en dos líneas dentro de la vaina son de color rojizo y de tamaño pequeño (un gramo contiene aproximadamente 4,000 semillas) con una duración germinativa de cinco años. El berro es una planta acuática que habita en climas semicálidos, semisecos, secos y templados donde crece de forma silvestre a orillas de ríos y arroyos (Redrobán, 2012; Vásquez, 2008).

2.3 Usos en la medicina tradicional

Aunque normalmente el berro se utiliza más como un alimento que como medicina, contiene principios activos muy importantes que le proporcionan propiedades medicinales destacadas, y aunque la gente no conoce estos principios activos utilizan los berros para curar algún malestar, ya sea en extracto, té u otros preparados, los principales usos que se le da dentro de la medicina tradicional son los siguientes:

Tabla 1. Uso del berro (*Nasturtium officinale*) en la herbolaria

USO	DESCRIPCIÓN
Aparato respiratorio	El berro posee propiedades antivirales, antibronquíticas, expectorantes, febrífugas y tónicas muy adecuadas para el tratamiento de las enfermedades respiratorias como el resfriado y, muy especialmente, aquellas que se acompañan de flemas como la bronquitis o la tos con expectoración.

Metabolismo:	La capacidad diurética, anti-artrítica, y depurativa de los berros se ha aprovechado desde la antigüedad para el tratamiento de enfermedades metabólicas que mejoran al incentivar con la eliminación de líquidos y la depuración de la sangre y de los órganos de filtrado de nuestro organismo
Retención de líquidos	El berro es una planta muy valiosa para tratar la retención de líquidos e hidropesía. Su elevada proporción de magnesio, potasio y calcio le otorgan esta propiedad, ayudando a eliminar edemas
Cálculos biliares o renales	El uso de esta planta puede ayudar a prevenir la formación de piedras en el riñón o la vesícula. Sin embargo, se utiliza más como preventivo que como curativo, dado que no debe administrarse cuando los riñones o la vesícula se encuentran inflamados pues puede aumentar la inflamación
Diabetes	Al juntarse los elementos que contiene con las vitaminas C y la niacina le confieren propiedades antidiabéticas que han sido altamente utilizadas para disminuir la cantidad de azúcar
Afecciones cutáneas	Ayuda a la cicatrización y protege contra las infecciones
Avitaminosis	La presencia de muchas vitaminas puede ayudar a prevenir o paliar problemas de avitaminosis. Desde la antigüedad se ha utilizado esta planta para el tratamiento o prevención del escorbuto que se produce por falta de vitamina
Hígado	En caso de enfermedades del hígado, como la insuficiencia hepática, los berros ayudan a limpiar este órgano y facilitan su recuperación
Antialopécico	El berro ha sido considerado tradicionalmente como uno de los mejores remedios para la mejora de la caída de cabello. Estas propiedades son debido a la presencia de Zinc y biotina, dos componentes que han demostrado ser muy eficaces en la conservación del cabello

(Vásquez, 2008; Fennel, 2006, Kendrick, 2008).

2.4 Propiedades farmacológicas

Utilizado externamente el berro constituye uno de los mejores vulnerarios que existe, capaz de ayudar a curar los posibles problemas que se producen en la piel. Esta capacidad le viene otorgada principalmente por la existencia de dos componentes que poseen propiedades antisépticas y curativas o regenerativas de la piel: Zinc y Vitamina C, mientras que el flavonoide rutina le proporciona propiedades bactericidas al mismo tiempo que ayuda a conservar la vitamina C (Redrobán,2012).

El berro alberga una fuerte cantidad de vitamina C. Un nutriente que además de su acción de la vitamina es valioso para su acción antioxidante, la estimulación del sistema inmunológico y otros problemas de salud. Durante el procesamiento, la distribución y el almacenamiento de productos congelados, el ácido ascórbico se oxida a ácido dehidroascórbico (DHAA), que conserva la actividad de la vitamina C. Después, puede ser irreversiblemente hidrolizado a ácido 2,3 - dicetogulónico, que posee ninguna actividad biológica. Este último paso es la oxidación encontrada que es mucho más sensible a la temperatura de la oxidación de ácido ascórbico a ácido (Cruz, 2008).

Depurativo de la sangre: facilita la eliminación de los residuos ácidos del metabolismo, y además por su riqueza mineral, estimula la producción de hematíes (glóbulos rojos). Conviene a artríticos, gotosos, obesos, anémicos, y a quienes padecen de eccemas y erupciones de la piel debido a autointoxicación. Tonificante: aumenta el apetito y la secreción de jugos digestivos. Es un tonificante general del organismo. Muy útil en caso de astenia (debilidad) y fatiga. Por su contenido en yodo se recomiendan los berros en caso de hipotiroidismo. Prevenir la aparición del cáncer: esta capacidad de los berros se debe a unas sustancias llamadas glucosinolatos que previenen el desarrollo de células cancerosas (Botical, 2014; Redrobán 2012; USDA, 2004).

Los Componentes químicos del berro se describen a continuación:

Valor nutricional por cada 100 g

Carbohidratos	1.29 g
Azúcares	0.2 g
Fibra alimentaria	0.5 g
Grasas	0.1 g
Proteínas	2.3 g
Retinol (Vitamina A)	160 µg
B- caroteno	1914 µg
Tiamina (Vitamina B1)	0.09 mg
Riboflavina (Vitamina B2)	0.12 mg
Ácido pantoténico (Vitamina B5)	0.31 mg
Vitamina B6	0.129 mg
Vitamina C	43 mg
Vitamina E	1 mg
Vitamina K	250 µg
Calcio	120 mg
Hierro	0.2 mg
Magnesio	21 mg
Manganeso	0.244 mg
Fosforo	60 mg
Potasio	330 mg
Sodio	41 mg

3. TOXICOLOGÍA

3.1 Definición

La toxicología es la ciencia que estudia todos los venenos. Etimológicamente se deriva de dos palabras griegas: *toxikon* (veneno) y *logos* (tratado), que es “ciencia de los venenos”. La toxicología clínica (TC) es la parte de la toxicología general (TG) que se ocupa del diagnóstico y tratamiento de las intoxicaciones en su amplio sentido (Bataller, 2004; Bello, 2001).

3.2 Importancia de la dosis y relación dosis-respuesta

Dosis es la cantidad de fármaco que se debe de administrar a una persona para obtener dicho efecto. Esta es la dosis terapéutica o efectiva que está entre la dosis terapéutica mínima (la menor dosis que es capaz de producir el efecto) y la dosis terapéutica máxima (mayor dosis tolerada sin que aparezcan dosis tóxicas). Las dosis de los fármacos están calculados para alcanzar los niveles plasmáticos necesarios para que aparezca el efecto sin llegar a niveles tóxicos. Existe una dosis mínima efectiva, por debajo de la cual no aparece efecto. También existe, para cada uno de ellos, una dosis terapéutica máxima, por encima de la cual aparece un cuadro de intoxicación. En consecuencia, la dosis que se administra al paciente se encuentra en el rango existente entre las dosis anteriores. Este rango se conoce con el nombre de margen terapéutico (Ahumada, 2002).

Para que se ejerza los efectos tienen que alcanzar una concentración determinada en el sitio de acción. Por lo general, esta relación se correlaciona con los niveles que el fármaco alcanza en sangre, de modo que, los niveles plasmáticos del fármaco dan información sobre si la dosis que se está administrando es la adecuada. Cuando los niveles estén por debajo de la concentración plasmática mínima para lograr el efecto, éste desaparece. Existe un margen terapéutico muy estrecho por lo que pequeñas variaciones de la dosis pueden provocar un cuadro tóxico (Ahumada, 2002).

Curva dosis-respuesta: Una importante manera de conocer y caracterizar el efecto de una droga es la determinación de su curva dosis respuesta. En abscisas situamos la dosis administrada, su logaritmo o el logaritmo de la concentración sanguínea. Mientras que en ordenadas situamos el efecto alcanzado, desde 0% al 100% o efecto máximo. En general el incremento de la dosis produce un aumento paralelo en la intensidad de la respuesta, hasta un determinado límite que es el efecto máximo. En biología la respuesta aumenta hasta ese punto máximo, después del cual el incremento de la dosis no va acompañado de un incremento de los efectos farmacológicos. El efecto máximo determina ante el aumento de la dosis, el plateau o la meseta de la curva. En caso de aumentar la dosis después

de la meseta pueden aparecer efectos tóxicos o la muerte sin aumentar la intensidad de los efectos farmacológicos. La curva resultante es una asíntota. Los parámetros a tener en cuenta son:

- **Pendiente o inclinación:** Significa el grado de incremento de la respuesta en relación del aumento de la dosis. La inclinación o pendiente representa habitualmente la parte central línea de la curva dosis-respuesta. Una inclinación muy vertical los indica que los efectos iniciales y los efectos máximos se pueden obtener con pequeñas variaciones de las dosis, esto significa peligrosidad en el manejo clínico de la misma con facilidad de llegar a niveles tóxicos con la droga en estudio.
- **Variabilidad:** Es muy difícil obtener efectos idénticos, con las mismas dosis aun en el mismo paciente. La mayor o menor respuesta en la curva dosis-respuesta, llevados a cabo en distintos tiempos nos indicarán el grado de variabilidad de la respuesta de la droga. Una gran variabilidad en la respuesta nos indicará la dificultad para obtener efectos regulares y peligrosidad de la droga.
- **Potencia:** La potencia de la acción farmacológica está determinada por la cantidad de la droga expresada en gramos, miligramos o microgramos, para la obtención del efecto deseado.
- **Efectos máximos:** Mediante el análisis de la curva dosis-respuesta se determina también la dosis necesaria para la obtención de los efectos farmacológicos máximos. También éste es un dato de utilidad para conocer la dosis que no debe sobrepasarse ya que no irá acompañada de un incremento de los efectos farmacológicos deseados, pudiendo en cambio producir efectos tóxicos (Malgor y Valsecia, 2006; Martínez, 2002).

3.3 Toxicidad de plantas medicinales

Así como las plantas tienen el potencial curativo de ciertas dolencias y enfermedades, también poseen el potencial de producir daño, toxicidad y muerte. Por lo tanto es de vital importancia desarrollar estudios que permitan desarrollar los efectos tóxicos y las dosis correspondientes. La efectividad de la tecnología ha permitido a los científicos detectar pequeñas cantidades de productos químicos cancerígenos y tóxicos en hierbas y reconocer o evaluar los efectos potencialmente peligrosos de las hierbas que se habían utilizado en la medicina tradicional desde hace siglos (Bussmann y Col, 2011; Villar y Mendecilla, 2001).

A pesar de la creciente demanda del mercado de las hierbas medicinales, todavía hay preocupaciones asociadas no sólo con su uso, sino también con su seguridad. Para el uso de la mayoría de estos productos, muy poco es lo que se sabe acerca de sus componentes activos y / o tóxicos. En muchos países, entre ellos U.S, los medicamentos a base de hierbas no están sometidos a las mismas normas reguladoras como medicamentos ortodoxos en términos de eficacia y seguridad. Esto plantea la preocupación sobre su seguridad y las implicaciones para su uso como medicamentos. Las pruebas de toxicidad pueden revelar algunos de los riesgos que pueden estar asociados con el uso de hierbas, evitando así los posibles efectos nocivos cuando se utiliza como medicina (Ifeoma, 2013).

La toxicidad de las plantas medicinales puede variar dependiendo de distintos factores. Las variaciones climáticas y la época del año pueden influir en la composición cualitativa y cuantitativa de sus principios activos, a la que afecta también de forma significativa la forma de preparación y la parte de la planta utilizada. Si bien es poco probable que las plantas medicinales ocasionen intoxicaciones por sí mismas, la mayoría de las veces estas ocurren por el mal uso que se hace de ellas, la mala identificación o por su contaminación (Cameán y Repeto, 2006; Ifeoma, 2013; Ríos y Repeto, 2012).

Muchas drogas se han originado a partir de productos químicos activos de plantas y sus usos medicinales se atribuyen a diversas sustancias químicas activas que se encuentran en ellos. La principal diferencia entre el uso de una planta medicinal y un fármaco químico es que la mayoría de médicos no están convencionalmente entrenados con ningún entrenamiento formal en las plantas. Las drogas sintéticas suelen consistir en un solo producto químico, mientras que las plantas medicinales pueden contener compleja mezcla de muchos productos químicos (George, 2011).

3.3.1 Dosis toxica

Es aquella cantidad de una sustancia capaz de manifestar un efecto toxico. Cuando se trata de la más baja con capacidad tóxica se le conoce con el nombre de dosis tóxica mínima. Es la cantidad de droga que puede producir daño permanente o pasajero en el individuo, el grado de toxicidad guarda relación con la naturaleza de la droga administrada, y ésta puede presentarse en forma; aguda, sub-aguda y crónica. Una sustancia potencialmente supra-tóxica necesitará concentraciones muy pequeñas para producir daño, incluso, muerte (Bello, 2001; Villar y Mendocilla, 2001).

Cuando la acción tóxica se manifieste en el sitio de aplicación o muy cerca de este, la estimación de la dosis tisular puede ser muy confiable. Sin embargo, cuando la toxina se manifieste en algún sitio remoto (por ejemplo, una célula hepática), las estimaciones de las dosis toxicológicamente significativas son mucho menos confiable. La presencia de una sustancia química en la sangre indica que hay absorción; con todo, la concentración sanguínea de una sustancia química se encuentra en estado dinámico, pues llega a niveles más elevados al aumentar la absorción, pero decrece a medida que se incrementa la distribución, el aumento tisular, la transformación metabólica y la excreción. La concentración sanguínea de una sustancia química es indicador útil de la dosis solo cuando se relaciona de manera definida con la concentración en el emplazamiento o emplazamientos de acción (órganos y tejidos) (Hickman y Thomann, 2001).

3.4 Pruebas de toxicidad sistémica

Las pruebas de toxicidad sistémica se refiere a la alteración de la fisiología, anatomía (macro o microscópica) o química clínica (incluyendo hematología) que resulta de cambios patológicos en cualquier órgano distante del sitio en el cual se ha administrado un medicamento herbario.

- Las pruebas de toxicidad aguda ayudan a determinar las manifestaciones tóxicas, de la prueba de la sustancia, que ocurren cuando se expone a los animales a una o más dosis dentro de un periodo de 24 horas.
- Las pruebas de toxicidad de largo plazo ayudan a determinar las reacciones tóxicas cuando los animales son expuestos a un tratamiento prolongado. En tales pruebas, los animales son observados en cambios de conducta así como manifestaciones anatómicas, fisiológicas y bioquímicas del daño tisular. Si los cambios patológicos se detectan durante el período de administración de la droga, y los cambios no son serios, puede ser posible determinar si tales cambios son reversibles después que la droga se retira. Así, las observaciones se hacen a periodos durante la administración continua de la droga y luego, a intervalos después que la droga ha sido retirada para determinar si tal patología es reversible (Villar y Mendocilla, 2001).

La información requerida para evaluar la toxicidad sistémica específica de órganos diana tras una exposición única se obtendrá a partir de datos en humanos, por ejemplo tras una exposición en el hogar, en el lugar de trabajo o a través del medio ambiente, o de estudios realizados con animales de experimentación. Los estudios estándar en ratas y ratones que proporcionan esta información son estudios de toxicidad que pueden incluir tanto observaciones clínicas como exámenes macroscópicos y microscópicos detallados que permiten identificar los efectos tóxicos sobre los tejidos u órganos diana. Los resultados de los estudios de toxicidad realizados en otras especies también pueden proporcionar información relevante (SGA, 2005)

3.5 Toxicidad aguda

Los métodos tradicionales para evaluar la toxicidad aguda utilizan la muerte de los animales como criterio de valoración. En 1984, un nuevo enfoque para las pruebas de toxicidad aguda fue sugerido por la Sociedad de Toxicología británica basada en la administración de una serie de niveles de dosis fija. El enfoque evita el uso de la muerte de los animales como criterio de valoración, y se basó en cambio en la observación de los signos claros de toxicidad en uno de una serie de niveles de dosis fija. Los estudios de validación *in vivo* y sus procedimientos propuestos por el Reino Unido y otros países fueron adoptados por la TG (Test Guidelines) en 1992. Posteriormente, las propiedades estadísticas del método de dosis fija han sido evaluadas mediante modelos matemáticos en una serie de estudios. Juntos, el *in vivo* y estudios de modelización han demostrado que el procedimiento es reproducible, requiere menos animales y causa menos sufrimiento que los métodos tradicionales y es capaz de clasificar sustancias de una manera similar a los otros métodos de ensayo de toxicidad aguda (directrices de examen 423 y 425) (OECD 420, 2001).

3.5.1 Definición, DL50

Definición.

Se refiere a esos efectos adversos que ocurren después de la administración oral de una dosis única de una sustancia, o múltiples dosis administradas durante un breve período de tiempo que va desde casi inmediatamente hasta varios días después de la exposición (o dosificación) (OECD 420, 2001; SGA, 2005; Wiley, 2000).

DL50 (dosis letal media)

Es la cantidad de un compuesto químico que, cuando se aplica directamente a los organismos de prueba, se estima que es fatal para el 50% de

los organismos bajo las condiciones establecidas del ensayo. El valor de la DL50 es el estándar para la comparación de Toxicidad aguda entre los tóxicos y entre especies. El valor se puede determinar gráficamente a partir de una gráfica de logaritmo de la dosis contra la mortalidad expresada en unidades de probabilidad (probits) o, más recientemente, mediante el uso de uno de los varios programas de computación disponibles (Hotdgon, 2014).

La prueba de dosis letal media era el indicador que comúnmente más se utilizaba para determinar la toxicidad, pero tras años de crítica, se permitió su determinación aproximada y el empleo del ensayo de la determinación de la toxicidad aguda por vía oral (DL50 según TG401) por sus tres alternativas *in vivo* (420, 423 y 425) propuestas por la organización europea. Estos ensayos reducen significativamente el número de animales empleados, y en muchos casos, el dolor y estrés asociado a los mismos. Tras el periodo de un año, que comenzó en julio del 2001, la comunidad reguladora no debería utilizar más el ensayo de la DL50 (Bataller, 2004; Moreno, 2003; Repeto y Zurita, 2002).

3.6 Definición Toxicidad sub-crónica (10% de la vida del animal, de 1 a 3 meses)

Toxicidad sub-crónica (por administración continuada) incluye los efectos adversos que aparecen en los animales de laboratorio cuando reciben repetidamente dosis diarias de una sustancia o cuando están expuestos diariamente a la misma durante un período de tiempo breve, en comparación con su expectativa de vida (LPR, 1998, 2002, 2006).

En el estudio de toxicidad repetida por 28 días está diseñado como una prueba de ensayo de primer nivel o de selección para detectar todo el espectro de efectos adversos sistémicos de la exposición repetida a la sustancia de ensayo, incluyendo posibles efectos neurotóxicos, inmunotoxicidad o efectos sobre los órganos sexuales. El estudio de 30 días se elige porque este periodo generalmente cubre el 10% de la vida de una rata de laboratorio. La información

obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar las dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana (Hau y Van Hoosier, 2002; LPR, 1998, 2002, 2006).

Las pruebas para detectar la exposición sub-crónica

- Se trazan las curvas de dosis-respuesta (para una exposición de 30 días) en dos especies; la prueba debe utilizar la esperada ruta humana de la exposición.
- Toxicidad en los órganos de prueba; mortalidad, cambios de peso corporal, hematología y química clínica; realizar exámenes microscópicos de la lesión tisular.
- Llevar a cabo pruebas de actividad mutagénica.
- Prueba de los problemas reproductivos y defectos de nacimiento (teratología).
- Examinar la farmacocinética de la especie estudiada: la absorción, distribución, metabolismo, y la eliminación de los productos químicos del cuerpo.
- Llevar a cabo las pruebas de comportamiento.
- Prueba de sinergismo, la potenciación, y el antagonismo (Wiley, 2000).

3.7 Toxicidad crónica (3 meses a 1-2 años)

La toxicidad crónica se refiere a los efectos adversos permanentes o duraderos que se manifiestan después de la exposición a un tóxico durante un periodo largo o la mayor parte de vida de un organismo (generalmente, más del 50%). La duración de un estudio crónico es generalmente de 3 meses a 1 año o

más. Cuando se rebasa el tiempo de un año prolongándose a 1.5 o 2 años se llevan a cabo estudios de carcinogenicidad (Hotdgon, 2004; Wiley, 2000).

Las pruebas de toxicidad crónica se han diseñado para descubrir cualquiera de los numerosos efectos tóxicos y para definir los márgenes de seguridad para ser utilizados en la regulación de los productos químicos. Al igual que con la prueba sub-crónica, dos especies se utilizan generalmente, una de las cuales es ya sea una rata o una cepa de ratón. Los datos se reúnen después de 3 meses a 1 año para determinar una toxicidad crónica sin efectos potenciales. Los datos se reúnen después de 1,5 años (ratón) o 2 años (rata) para determinar el potencial carcinogénico. Las pruebas de toxicidad crónica puede implicar la administración de la comida, en el agua potable, por cápsula, o por inhalación, siendo el primero el más común (Hotdgon, 2004).

Las pruebas para detectar la exposición crónica

- Llevar a cabo pruebas de mutagénesis de mamíferos.
- Llevar a cabo una prueba de carcinogénesis de 2 años en los roedores.
- Examinar la farmacocinética en humanos.
- Llevar a cabo ensayos clínicos con humanos.
- Recopilar los datos epidemiológicos de exposición aguda y crónica (Wiley, 2000).

3.8 Método de dosis fijas OECD No. 420 y dosis repetidas por 28 días Toxicidad sub-crónica (OECD No. 407)

3.8.1 Principio de la prueba, descripción del método y procedimiento

3.8.1.1 Principio de las pruebas

Toxicidad aguda. Los grupos de animales de un mismo sexo se dosifican en una manera gradual las dosis fijas de 5, 50, 300 y 2000 mg / kg (excepcionalmente una dosis fija anual adicional de 5000 mg / kg puede considerarse). El nivel de dosis inicial se selecciona sobre la base de un estudio preliminar como la dosis esperada para producir algunos signos de toxicidad sin causar efectos tóxicos graves o la mortalidad. Signos clínicos y afecciones asociadas con el dolor, el sufrimiento y la muerte inmediata, se describen en detalle en un documento de orientación para la OCDE por separado. Otros grupos de animales se pueden dosificar en dosis altas o más bajas, dependiendo de la presencia o ausencia de signos de toxicidad o mortalidad. Este procedimiento continúa hasta que la dosis que causa toxicidad manifiesta o no más de una muerte, o cuando no se ve que hay efectos en la dosis más alta o cuando ocurren muertes a la dosis más baja (OECD 420, 2001).

Toxicidad Sub-crónica. La sustancia de ensayo se administra diariamente por vía oral en dosis graduadas a distintos lotes de animales, a razón de una dosis por lote durante un período de 28 días. Durante el período de administración a los animales se observan de cerca, cada día en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueran o sean sacrificados durante el ensayo se practicarán la autopsia y en la conclusión de la prueba, los animales supervivientes son sacrificados y se realiza necropsia. Un estudio de 28 días aporta información sobre los efectos de la exposición oral repetida y puede indicar la necesidad de realizar estudios más a largo plazo. También puede proporcionar información sobre la selección de las concentraciones para los estudios a largo plazo. Los datos derivados del uso de la TG deberían permitir la caracterización de la toxicidad de la sustancia de ensayo, para una indicación de relación de respuesta a la dosis y la determinación de la n - nivel de efecto adverso observado (NOAEL) (OECD 407, 2008).

3.8.1.2 Descripción del método

Selección de especies animales

La especie de preferencia entre los roedores es la rata, aunque otras especies de roedores se pueden utilizar. Normalmente se emplean hembras. Esto es así porque la bibliografía sobre los ensayos convencionales de DL50 muestra que normalmente hay poca diferencia de sensibilidad entre los sexos, pero en aquellos casos en que se observan diferencias, las hembras son generalmente un poco más sensibles. Sin embargo, si el conocimiento de las propiedades toxicológicas o toxicocinéticas de productos químicos estructuralmente relacionados indica que los machos son propensos a ser más sensibles se debe utilizar este sexo. Cuando el ensayo se haga con machos, deberá justificarse adecuadamente. Animales adultos jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso general se deben emplear. Las hembras deben ser nulíparas y no embarazadas. El animal, al comienzo de su administración, debe estar entre 8 y 12 semanas de edad y su peso debe estar en un intervalo de $\pm 20\%$ del peso medio de los animales previamente tratados (OECD 420, 2001; OECD 407, 2008).

Condiciones de alojamiento y alimentación

La temperatura de los bioterios debe ser de 22°C ($\pm 3^\circ\text{C}$). Aunque la humedad relativa debe ser de al menos 30% y preferiblemente no superior al 70%, salvo durante la limpieza del ambiente debe ser de 50-60%. La iluminación debe ser artificial, con una alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación, se llevan dietas convencionales de laboratorio pueden usarse con un suministro ilimitado de agua potable. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero el número de animales de cada jaula no deben interferir en las observaciones claras de cada animal (OECD 420, 2001; OECD 407, 2008).

Preparación de los animales

Los animales son seleccionados al azar, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en sus jaulas durante al menos 5 días

antes del inicio de la dosificación para permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio (OECD 420, 2001; OECD 407, 2008).

Preparación de las dosis

Para ambos ensayos, las sustancias de deben ser administradas en un volumen constante en el rango de dosis para ser probado mediante la variación de la concentración de la preparación de la dosificación. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal de ensayo. En los roedores, el volumen no debe exceder normalmente 1mL/100g de peso corporal. Con respecto a la formulación de la preparación de la dosificación, se recomienda el uso de una solución / suspensión / emulsión acuosa siempre que sea posible, seguido en orden de preferencia por una solución / suspensión / emulsión en aceite (por ejemplo, aceite de maíz) y luego posiblemente por la solución en otro vehículos. Para vehículos distintos del agua, las características toxicológicas del vehículo deben ser conocidos. Las dosis tienen que prepararse poco antes de la administración a menos que se conozca y se muestre que es aceptable la estabilidad del preparado durante el período durante el cual se va a utilizar (OECD 420, 2001; OECD 407, 2008).

3.8.1.3 Procedimiento

La administración de dosis

La sustancia de ensayo se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. Los animales deben estar en ayunas antes de la administración (por ejemplo, con la rata, la comida, pero el agua no debe suspenderse durante la noche). Tras el período de ayuno, los animales se pesarán así como las sustancia de ensayo administrado. Una vez administrada la sustancia, podrá continuarse el ayuno durante unas 3 a 4 horas. Si la dosis se administra en fracciones durante un

período de tiempo, puede ser necesario proporcionar a los animales con comida y agua dependiendo de la duración del período (OECD 420, 2001).

Para el ensayo de toxicidad crónica, los animales se dosifican con la sustancia de ensayo diariamente siete días cada semana durante un periodo de 28 días. Cuando la sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis a los animales utilizando una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen no debe superar 1ml/100gr de peso corporal. La dosis debe administrarse a la misma hora cada día (OECD 407, 2008).

Observación del estudio

El propósito del estudio preliminar es para permitir la selección de la dosis inicial adecuada para el estudio principal. El estudio preliminar se considera terminado cuando se tome una decisión sobre la dosis inicial para el estudio principal (o si se observa una muerte a la dosis fija más baja).

La dosis de partida para el estudio preliminar se selecciona a partir de los niveles de dosis fija de 5, 50, 300 y 2.000 mg / kg donde se espera que una dosis produzca toxicidad evidente, cuando sea posible, en la evidencia de *in vivo* e *in vitro* a partir de los datos de la misma. A falta de esa información, la dosis inicial será de 300mg/kg. Se permitirá un período de al menos 24 horas entre la administración de cada animal. Todos los animales deben ser observados durante al menos 14 días (OECD 420, 2001).

Excepcionalmente, y sólo cuando esté justificado por determinados imperativos legales, puede considerarse el uso de una dosis fija superior adicional de 5,000 mg / kg. Por razones del bienestar animal, pruebas de animales en la categoría 5 del SAM rangos (2000-5000mg/kg) se desalienta y se debe considerar solamente cuando hay una fuerte probabilidad de que los resultados de dicha prueba tienen una relevancia directa para proteger la salud humana o la salud animal o el medio ambiente (OECD 420, 2001; OECD 407, 2008).

En los casos en que un animal presente signos tóxicos en la de dosis fija más baja (5mg/kg) en las matrices estudio preliminar, el procedimiento normal es poner fin al estudio y asignar la sustancia a la categoría 1 del SGA (Sistema Globalmente Aceptado para la Clasificación de Sustancias y Mezclas Químicas). Sin embargo, si se requiere una confirmación adicional de la clasificación, un procedimiento complementario opcional puede llevarse a cabo, de la siguiente manera. Un segundo animal se dosifica a 5mg/kg. Si este segundo animal muere, entonces se confirmará categoría 1 del SGA y el estudio se dará por terminado inmediatamente. Si el segundo animal sobrevive, a continuación, un máximo de tres animales adicionales se dosifica a 5mg/kg. Debido a que habrá un alto riesgo de mortalidad, estos animales deben ser dosificados de una manera secuencial para proteger el bienestar animal. El intervalo de tiempo entre la dosis en cada animal debe ser suficiente para establecer que el animal anterior sea probable que sobreviva. Si se produce una segunda muerte, la secuencia de dosificación se dará por terminado de inmediato y no se dosifican más animales. Debido a la aparición de una segunda muerte (independientemente del número de animales sometidos a pruebas en el momento de terminación) corresponde al resultado (2 o más muertes), la regla de clasificación de la dosis fija 5mg/kg es seguido (Categoría 1 si hay 2 o más muertes o categoría 2, si no hay más de 1 muerte) (OECD 420, 2001).

3.8.2 Numero de animales y dosis

Para proteger a los animales, una dosis que causó la muerte en el estudio preliminar no se volverá a examinar en el estudio principal. La experiencia ha demostrado que el resultado más probable en el nivel de dosis inicial es que la sustancia se puede clasificar y no será necesario realizar más pruebas (OECD 420, 2001).

Un total de cinco animales de un sexo normalmente se utilizará para cada nivel de dosis investigado. Los cinco animales se componen de un animal del

estudio preliminar dosificado en el nivel de dosis seleccionado, junto con otros cuatro animales adicionales (salvo, excepcionalmente, si un nivel de dosis utilizado en el estudio principal no se incluyó en el estudio preliminar) (OECD 420, 2001).

El intervalo de tiempo entre la administración de cada nivel se determina según la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de los animales con la dosis siguiente debe retrasarse hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados. Se recomienda un periodo de 3 a 4 días entre la administración de cada dosis, si es necesario, para permitir la observación de la toxicidad tardía. El intervalo de tiempo se puede ajustar según sea apropiado, por ejemplo, en caso de respuestas concluyentes (OECD 420, 2001).

Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente y los datos cinéticos para el compuesto de ensayo o productos afines. El nivel de dosis superior debe seleccionarse con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero no la muerte ni un sufrimiento intenso. A partir de entonces, una secuencia descendente de dosis debe ser seleccionada con el fin de poner de manifiesto las respuestas en función de la dosis y la ausencia de efectos adversos observados en el nivel de dosis más bajo (NOAEL). Dos a cuatro intervalos de plegado con frecuencia son óptimos para establecer las dosis decrecientes y la adición de un cuarto lote de ensayo es a menudo preferible utilizar intervalos muy amplios (por ejemplo, más de un factor de 10) entre dosis (OECD 407, 2008).

En presencia de toxicidad general observada (por ejemplo, reducción de peso corporal, hígado, corazón, pulmón o riñón efectos, etc.) u otros cambios que pueden no ser las respuestas tóxicas (por ejemplo, reducción de la ingesta de alimentos, agrandamiento del hígado), observándose efectos sobre la inmunidad, extremos sensibles neurológicos o endocrinos deben ser interpretados con cautela (OECD 407, 2008).

3.9 Criterio para la clasificación de sustancias tóxicas.

Los productos químicos se clasificarán en cinco categorías de toxicidad basadas en la toxicidad aguda por ingestión. Los valores de toxicidad aguda se expresan en valores (aproximados) de la DL50 o en estimaciones de la toxicidad aguda (SGA, 2005). Lo anterior se muestra en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Categorías de peligro de toxicidad aguda y estimaciones de la toxicidad aguda (ETA) que definen las categorías respectivas

Vía de exposición	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4	Categoría 5
Oral (mg/Kg de peso corporal)	5	50	300	2000	5000

Tabla 3. Conversión de un rango de valores de toxicidad aguda obtenidos experimentalmente (o categorías de peligro de toxicidad aguda) en estimaciones puntuales de toxicidad.

Vías de exposición	Rango de valores experimentales de toxicidad aguda a categoría de clasificación para las respectivas vías de exposición. (Nota 1)	Estimación puntual obtenida de toxicidad aguda (Nota 2)
Ingestión (mg/kg de peso corporal)	$0 < \text{Categoría 1} \leq 5$	0,5
	$5 < \text{Categoría 2} \leq 50$	5
	$50 < \text{Categoría 3} \leq 300$	100
	$300 < \text{Categoría 4} \leq 2000$	500
	$2000 < \text{Categoría 5} \leq 5000$	2500

(Bulgheroni, 2009; SGA, 2005)

NOTA 1: La Categoría 5 corresponde a las mezclas que tienen una toxicidad aguda relativamente baja pero que en ciertas circunstancias pueden suponer un peligro para poblaciones vulnerables. Esas mezclas presentan un valor de DL50 de toxicidad por vía oral en el rango de 2000-5000 mg/kg de peso corporal. Teniendo la necesidad de proteger a los animales, se desaconsejan los ensayos con éstos en la Categoría 5 y sólo deberán contemplarse cuando sea muy probable que los resultados de esos ensayos proporcionen elementos de información importantes para la protección de la salud humana.

NOTA 2: Estos valores sirven para calcular la estimación de toxicidad aguda (ETA) con fines de clasificación de una mezcla a partir de sus componentes y no constituyen datos experimentales. Los valores se fijan convencionalmente en el escalón inferior de las Categorías 1 y 2, en un punto que es aproximadamente $1/10^0$ del escalón inferior de las Categorías 3 a 5.

3.10.1 Examen y comportamiento físicos

Las observaciones generales de todos los animales se hacen a diario. En las observaciones clínicas se observa que no existan mortalidades o anormalidades obvias mientras el animal permanece en su jaula. Las directrices de ensayo requieren que las observaciones clínicas más ampliadas se realicen semanalmente fuera de la jaula (Krieger, 2010).

Los signos clínicos pueden ser indicadores importantes de toxicidad en los órganos diana. Se evalúa y cuantifica el comportamiento condicionado de la función neuromuscular (marcha, postura, fuerza de agarre), función vestibular (respuesta de enderezamiento, ataxia), capacidad de respuesta sensoriomotora (respuesta a los estímulos de crudo), el estado de excitabilidad (reactividad), signos autonómicos (pupila respuesta, lagrimeo, salivación, diarrea) y temblores / convulsiones. (Marquardt y Col, 1999; Krieger, 2010)

Los signos totales que se deben incluir en los ensayos, son los cambios en la piel, el pelo, los ojos, las membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala). Los cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias (por ejemplo, preparación excesiva, recorridos circulares repetitivos) o comportamientos extraños (por ejemplo, automutilación, marcha hacia atrás) deben registrarse (OECD 407, 2008)

3.10.2 Hematología

Los exámenes hematológicos siguientes deben practicarse al final del período de ensayo: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, reticulocitos, leucocitos total y diferencial, recuento de plaquetas y medida del tiempo la sangre / la coagulación. Otras determinaciones que deben llevarse a cabo, si la sustancia de ensayo o sus metabolitos tienen o se sospecha

de propiedades oxidantes incluyen la concentración de metahemoglobina y cuerpos de Heinz. Las muestras de sangre deben tomarse de un punto indicado, justo antes o como parte del procedimiento para la eutanasia de los animales, y se almacena en las condiciones apropiadas. Los animales deben estar en ayunas durante la noche antes de la eutanasia (OECD 407, 2008).

LEUCOCITOS

Los leucocitos o glóbulos blancos son células que están principalmente en la sangre y circulan por ella con la función de combatir las infecciones o cuerpos extraños; pero en ocasiones pueden atacar los tejidos normales del propio cuerpo. Es una parte de las defensas inmunitarias del cuerpo humano. Hay diferentes tipos de leucocitos, cada uno con funciones específicas. Se pueden dividir en dos tipos principales: los granulocitos y agranulocitos (Welsch, 2006).

1. Granulocitos

Los granulocitos tienen pequeños gránulos de material dentro de sus membranas celulares, que desempeñan un papel importante en su función, ya que las células pueden liberar los gránulos para matar las bacterias, hongos y otros invasores. Hay tres tipos de granulocitos: eosinófilos, neutrófilos y basófilos.

- Eosinófilos. Están diseñados para atacar a los parásitos, y también desempeñan un papel en las reacciones alérgicas.
- Neutrófilos. Son los más abundantes y son el primer tipo de célula inmune que responde y llega al sitio de la infección.
- Basófilos. Representan menos del uno por ciento. Desempeñan un papel en la respuesta inmune.

2. Agranulocitos

Los agranulocitos carecen de gránulos en sus membranas celulares. Los agranulocitos pueden ser divididos en linfocitos y monocitos.

- Linfocitos. Constituyen alrededor del 20-40% del recuento total de leucocitos, e incluyen los linfocitos B, linfocitos T y células NK. Los linfocitos pueden defender el cuerpo contra las infecciones, ya que distinguen las células del propio cuerpo de las extranjeras.
- Monocitos. Conforman del 2 al 9% de la cantidad de glóbulos blancos, y están diseñados para presentar antígenos a los linfocitos para estimular la respuesta inmune. Estas células eventualmente maduran a macrófagos, leucocitos especializados que tragan material extraño para neutralizarlo. (Leucocitos.org, 2012)

ERITROCITOS

La principal función de los eritrocitos o glóbulos rojos es la de transportar oxígeno y dióxido de carbono, esta función está relacionada con la hemoglobina. Los eritrocitos llevan el oxígeno de los pulmones a los tejidos y el dióxido de carbono en sentido inverso. Los eritrocitos se forman a partir de la célula madre pluripotencial que se va diferenciando hasta perder el núcleo y la capacidad de síntesis de la hemoglobina. Los eritrocitos circulantes tienen una vida media de unos 120 días al cabo de los cuales son fagocitados en el bazo, el hígado, y la médula ósea, pero su actividad metabólica empieza a disminuir a partir de los 100 días (Arderiu, 2008; Núñez, 2007)

HEMATOCRITO

El hematocrito determina el porcentaje de glóbulos rojos que hay en el plasma. Es útil como recuento de hematíes solo en el caso de que la hidratación del individuo sea normal, ya que en cualquier disminución del volumen plasmático produce un aumento en el valor del hematocrito, aunque no esté aumentado el número hematíes. El hematocrito, sirve sobre todo para valor la magnitud de la pérdida de sangre (Villamor, 1994)

ÍNDICES ERITROCÍTARIOS (VCM, HCM, CHCM, ADE)

El volumen corpuscular medio (VCM) representa la media de los tamaños de los hematíes de la muestra de sangre. Lo que permite clasificar las anemias

microcítica, macrocítica y normocítica. La hemoglobina corpuscular media (HCM) es la cantidad de hemoglobina por cada hematíe y nos permite ver la gravedad y el tipo de anemia que se presenta. La concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM) expresa la cantidad de hemoglobina que contienen 100 gramos de hematíes. La amplitud de distribución eritrocitaria (ADE) es un índice que mide la variabilidad del tamaño de los hematíes y su aumento significativo se correlaciona con asinocitosis. Así pues cuando la ADE esta elevada de forma importante, el VCM es menos fiable (Arribas, 2005; Fuller, 2009; Ruíz, 2001).

PLAQUETAS

Las plaquetas son células producidas por los megacariocitos en la médula ósea mediante el proceso de fragmentación citoplasmática, circulan por la sangre y tiene un papel muy importante en la coagulación. Para ello forman nudos en la red de fibrina, liberan sustancias importantes para acelerar la coagulación y aumentan la retracción del coágulo sanguíneo. En las heridas las plaquetas aceleran la coagulación, y además al aglutinarse obstruyen pequeños vasos, y engendran sustancias que los contraen. La mitad de las plaquetas que se producen circulan, mientras que el bazo retiene la otra mitad; así, constantemente entran en el bazo una cantidad de plaquetas igual a la cantidad que lo abandona y durante siete días permanecen en el torrente circulatorio, pero si no se destruyen en los lugares donde actúan, se mueren definitivamente por apoptosis (Manascero, 2003).

Existe una escasa referencia para valores de hematología en diferentes puntos de tiempo en desarrollo para pequeños animales de laboratorio (por ejemplo, ratones y ratas), debido a los problemas técnicos asociados con la recolección de la sangre de animales. En el nacimiento, los reticulocitos son más grandes y más numerosas que las de los adultos, como indicada por el recuento de reticulocitos medios más altos y la media de los volúmenes corpuscular medio (VCM) durante el primer mes después del nacimiento. En contraste, muchos de los otros valores de hematología (neutrófilos, recuentos de linfocitos y plaquetas)

tienen valores similares desde el nacimiento hasta el desarrollo del adolescente (Hood, 2006).

El bazo de rata exhibe hematopoyesis activa durante toda la vida. En la médula ósea, la relación M: E es por lo general entre 1:1 y 1.5:1.0 Los megacariocitos son abundantes, y los linfocitos son comunes, que comprende hasta 20% de la población de células nucleadas. Los mastocitos son más prominentes en la médula ósea de la rata que en la médula ósea de otras especies de animales de laboratorio. Los recuentos de plaquetas en las ratas son muy altos, con un promedio de 1000000 / l. Los recuentos inferiores son con frecuencia debido a la agregación plaquetaria inducida por muestreo. El tiempo de tromboplastina TP y parcial en la rata son similares a otras especies (Gad, 2007).

3.10.3. Bioquímica Sanguínea

Se realizan determinaciones bioquímicas clínicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos y, especialmente, en el riñón y el hígado, con muestras sanguíneas obtenidas de todos los animales justo antes o como parte del procedimiento para la eutanasia de los animales (aparte de los moribundos y / o sacrificados antes de la finalización del estudio). Las investigaciones de plasma o suero se incluye el sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales y albúmina, al menos dos enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (tales como alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, γ -glutamyl-transpeptidasa y glutamato deshidrogenasa), y ácidos biliares. Si los datos de referencia previos son insuficientes, se debe considerar la determinación de variables hematológicas y bioquímicas antes de comenzar la dosificación o preferiblemente en un conjunto de animales no incluidos en los grupos experimentales (OECD 407, 2008).

GLUCOSA

La glucosa es una forma simple de azúcar que cumple una importante función en nuestro organismo, ya que es la responsable de brindar energía a las células de nuestro cuerpo. De vez en cuando en estudio de toxicología, los animales tratados que no logran prosperar y aumentar de peso corporal también tendrán una concentración ligeramente baja a la de los animales control independientemente de la comida (Dwyer, 2002).

COLESTEROL.

El colesterol es una sustancia cerosa, de tipo grasosa, que existe naturalmente en todas las partes del cuerpo. El cuerpo necesita determinada cantidad de colesterol para funcionar adecuadamente. Pero el exceso de colesterol en la sangre, combinado con otras sustancias, puede adherirse a las paredes de las arterias. Causando principalmente problemas cardiacos (Colpo, 2005; Maso, 2005).

UREA

La urea es el resultado final del metabolismo de las proteínas. Durante la digestión las proteínas son separadas en aminoácidos, estos contiene nitrógeno que se libera como ion amonio, y el resto de la molécula se utiliza para generar energía en las células y tejidos. El amonio se une a pequeñas moléculas para producir urea, la cual aparece en la sangre y es eliminada por la orina. Si el riñón no funciona bien la urea se acumula en la sangre y se eleva su concentración (Voet, 2006).

La urea es sintetizada por el hígado a partir del amoniaco que se absorbe en el intestino, se filtra libremente a través del glomérulo y se excreta en la orina. Se absorbe pasivamente con agua en el túbulo proximal. La azotemia (niveles elevados de compuestos nitrogenados) renal se desarrolla como resultado de enfermedades primarias o por toxicidad. La azotemia pos-renal resulta de la obstrucción del tracto urinario y se presenta en estudios de toxicidad. La urea

aumenta notablemente hasta que el 75% de las nefronas no son funcionales (Hod, 2006)

CREATININA

La creatinina es un producto de la descomposición de la creatina, que es una parte importante del músculo. La creatinina se elimina por completo del cuerpo por medio de los riñones. La creatinina también se puede medir por medio de un examen de sangre. La creatinina es un buen indicador de la función renal, pues se produce a una tasa constante, se filtra por glomérulo, se secreta en cantidad mínima por medio del túbulo contorneado proximal y no se altera por la dieta su concentración sérica aumenta a medida que disminuye el número de nefronas (Albarado, 2003; Grenvik, 2000)

ALT Y AST

Las pruebas disponibles para estudiar la función hepática valoran tres aspectos: la integridad celular del hepatocito, la síntesis de proteínas y la función excretora del hígado. La ALT y la AST nos indican la integridad celular y sus elevaciones nos marcan la existencia de una necrosis hepatocelular. La aspartato aminotransferasa (AST) se encuentra en una gran variedad de tejidos: corazón, músculo esquelético, riñón, cerebro, páncreas además de hígado. La alanina aminotransferasa (ALT) aparece localizada primeramente en el hígado. Las elevaciones mayores de transaminasas se producen en las hepatitis biliares, en las hepatopatías tóxicas y en el llamado hígado de shock. Los valores suelen ser mayores a 10 veces los normales y el cociente AST/ALT inferior a la unidad, ríos 2001 (Rustgi, 2005; Venigton, 2000).

CK

La creatina cinasa (CK) ha sido el marcador más utilizado en el diagnóstico de las alteraciones miocárdicas y del musculo esquelético. Es una enzima universal localizada en el citoplasma de la musculatura estriada (y otros tejidos) donde cataliza la fosforilación de creatinina a creatininfosfato. Ante un proceso de

necrosis miocárdica, la creatina cinasa se detecta por encima de su valor superior de referencia a partir de 4-6 horas del inicio de los síntomas isquémicos. La creatina cinasa no es específica de corazón y sus intervalos de referencia normales varían con la edad, raza, masa muscular y sexo (Mason, 2005).

FA

La fosfatasa alcalina (FA) es una enzima presente en la totalidad de los tejidos corporales, principalmente en el epitelio intestinal y en los osteoblastos, en la placenta y en el hígado, donde se haya en las membranas de sinusoides y canalículos. En un individuo sano, las formas enzimáticas halladas en el plasma proceden predominantemente del hígado y del hueso (Fuentes, 2008).

ALBUMINA Y GLOBULINA

La albumina es una proteína de origen hepático, que cumple con la función de transportar algunas sustancias, como ácidos grasos libres, calcio, algunas hormonas o bilirrubina a través de la sangre. Las globulinas son una amplia familia de proteínas, cuya función principal es el transporte de diferentes tipos de elementos plasmáticos, debido a que son capaces de unirse reversiblemente a ellos. Cuando se presenta un daño toxico el nivel de proteínas descienden, en especial la albumina (Cadiel, 2009).

En los adultos jóvenes, las concentraciones de nitrógeno de urea y creatinina en suero tienen referencia de rangos estrechos. Con la edad, sin embargo, la ocurrencia común de la nefropatía crónica progresiva, especialmente en los hombres, afecta a los rangos. Numerosas enzimas hepáticas se han estudiado y diversamente abogado por el estudio de la hepatotoxicidad en la rata. En, la ALT sérica general, las actividades SDH, y GDH han sido los mejores indicadores de lesión hepatocelular. Debido a que la actividad de la ALT es el más simple de determinar, ha sido en general adoptada por la mayoría de los laboratorios como la enzima hepática normal. En la rata, el colesterol, bilirrubina total y los niveles de nitrógeno de urea en suero disminuyen notablemente con la

edad. Sin embargo, la alanina aminotransferasa (ALT) aumenta notoriamente a partir de 2 a 5 semanas de edad (Gad, 2007; Hood, 2006).

Ha habido un considerable debate sobre los méritos relativos de suero AP, GGT, y 5'N actividades para la evaluación hepatobiliar. Se ha argumentado que la actividad de suero AP no es específico o sensible en la rata y que los cambios en la actividad de suero se deben a la isoenzima intestinal. La experiencia de este autor es que la actividad del suero AP se aumenta en la rata en asociación con algunas lesiones heptobiliares y en ausencia de visibles participación del GI histológico. Sin embargo, la actividad del suero AP no parece ser tan sensible a la colestasis en la rata. La actividad de GGT sérica es esencialmente inexistente en ratas normales, pero algunos estudios han demostrado una mayor actividad, pero unos pocos han demostrado una mayor actividad secundaria a toxinas hepatobiliares. Hallazgos de electrolitos no son notablemente diferentes en la rata. Al igual que los eritrocitos de ratones y los seres humanos, sin embargo, los eritrocitos de rata tienen alta concentración de potasio y hemólisis rendirán los valores de potasio falsamente séricos elevados (Gad, 2007).

3.10.4 Orina

El análisis de orina se ha considerado tradicionalmente parte de la base de datos de laboratorio mínimo para evaluar a los pacientes. Aunque el análisis de orina proporciona información específica sobre el tracto urogenital y la información general con respecto a algunas condiciones sistémicas, no es especialmente adecuado para la mayoría de los estudios de toxicología (Gad S, 2007; Hayes, 2008).

Si un artículo de prueba se conoce o se sospecha que produce daño en el sistema urinario, a continuación, se pueden tomar medidas para proporcionar muestras apropiadas para el análisis de orina (por cateterismo, cistocentesis o cuidadosamente recogidos muestras frescas anulados) (Hayes, 2008).

El análisis de orina estándar incluye la medición de las propiedades físico-químicas y la evaluación microscópica del sedimento urinario. Las propiedades físico-químicas incluyen el volumen (para las colecciones cronometradas), el color, la claridad, la gravedad o la osmolalidad específica, y pruebas incluidas en las tiras de reactivos (pH, proteína, glucosa, cetonas, bilirrubina, urobilinógeno, y de sangre). Algunas tiras de reactivo tienen prueba adicional para el nitrito (indica la presencia de bacterias productoras de nitrito) y esterasa de leucocitos, pero estos no son particularmente valiosos para especímenes de animales, especialmente para las recolecciones durante la noche (Hayes, 2008).

3.10.5. Necropsia

Todos los animales sometidos al ensayo, incluidos los que mueren durante su realización y los que se eliminan del estudio, se someterán a necropsia macroscópica. Se registrarán los cambios patológicos macroscópicos de cada animal. Podrá considerarse también la realización del examen microscópico de los órganos que presenten huellas de patología macroscópica, en los animales que sobrevivan un mínimo de 24 horas, ya que este examen puede proporcionar información útil (LPR, 1998, 2002, 2006).

Los órganos recomendados a estudiar es el hígado, glándulas suprarrenales, testículos, próstata, epidídimo, vesículas seminales más glándulas coagulantes en su conjunto, timo, bazo, cerebro y corazón. Éstos deben limpiarse de los tejidos adherentes, según convenga, y pesarse lo antes posible tras la disección para evitar su desecación. Los tejidos deben conservarse en el medio de fijación más adecuado según sea el tejido que se vaya a analizar histopatológicamente. La fijación rápida de los tejidos nos ayuda a evitar la autólisis (Fariñas y Col, 2005; OECD 407, 2008; Suckow, 2006).

Si la necropsia se realiza correctamente reduce el número de errores observados en los tejidos. Los errores pueden ser producidos por un número de condiciones, incluyendo la manipulación excesiva de tejido, técnica de disección

inadecuada, mala instrumentación, fluidos humectantes osmóticamente perjudiciales, autólisis, y mala fijación (Moreland, 2009; Suckow, 2006).

El examen de necropsia, incluyendo la recolecta de tejidos y conservación, representa una de las fases más importantes para la evaluación de estudios en ratas. La mayoría de las necropsias en ratas se llevan a cabo debido a las siguientes etapas:

- la necropsia de diagnóstico para la determinación de la causa de los resultados clínicos.
- vigilancia de la salud de los roedores.
- necropsia completa con fines experimentales, y
- la recolección o la evaluación de órganos diana.

Generalmente, la función de la necropsia macroscópica es para identificar las lesiones presentes en el animal y para recoger el tejido de una manera ordenada para las evaluaciones experimentales microscópicas y otras posteriores (Suckow, 2006).

3.10.6 Histopatología

La histopatología es la prueba auxiliar primaria asociada a la necropsia y es a menudo la prueba que proporciona las respuestas definitivas en muchos casos. La obtención de muestras de histopatología debe de llevarse a cabo en todas las necropsias (Moreland, 2009).

Un examen completo histopatológico debe realizarse en los órganos y tejidos conservados de todos los animales en los grupos de dosis alta y control. Estos exámenes deben ampliarse a animales de todos los demás grupos de dosis, si se observan los cambios relacionados con el tratamiento en el grupo de dosis alta (OECD 407, 2008).

Es de vital importancia para el que realiza la necropsia observar, describir y registrar todas las anomalías macroscópicas que podrían influir en la interpretación de los estudios de la histopatología. En la mayoría de los casos, sólo los tejidos frescos son adecuados para el análisis toxicológico (Jacobson, 2007).

Las muestras para histopatología deben ser recogidas de todos los órganos principales. Estos incluyen el corazón, pulmón, hígado, bazo, riñones, vejiga, páncreas, estómago, intestino delgado, intestino grueso, tiroides, ganglios linfáticos mesentéricos, glándulas suprarrenales y el cerebro. Cuando las lesiones obvias están presentes en estos tejidos deben por supuesto ser muestreados, sin embargo, cuando no es factible tomar muestras de todos los órganos importantes, y no hay lesiones evidentes, se debe dar prioridad a los órganos y tejidos que se correlacionan más con los signos clínicos primarios observados o con el objetivo del experimento. Todas las muestras deben ser fijadas inmediatamente en formalina tamponada al 10%. La formalina detiene la autólisis y endurece el tejido para ser cortado finamente. Las muestras no deben ser más que 1.5 cm de espesor. El tejido colectado debe ser colocado en un volumen de formol que es 10 veces el volumen de tejido para asegurar la fijación correcta. El examen histopatológico comprende la tinción de hematoxilina-eosina, coloraciones especiales de Van-Giesson, PAS, Oil Red, Orseína (Fariñas, 2005; Jacobson, 2007).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con el paso del tiempo se ha hecho uso de las plantas como una alternativa terapéutica, suele usarse por razones económicas, aunque principalmente se cree que éstas no tienen efectos adversos, pero las plantas contienen compuestos que pueden ser igual o más perjudiciales que los medicamentos sintéticos, pudiendo causar cualquier tipo de intoxicación, alergia o daño a órganos como es el hígado o riñones. Estos efectos tóxicos agudos o crónicos de sustancias químicas herbolarias suelen ser más frecuentes de lo que parece (Marinoft, 2006). Estos son los motivos por lo que estudiar la toxicidad de las plantas se vuelve tan importante y de este modo hacer llegar la información adquirida a centros de salud y a la población en general.

El berro es una de las plantas utilizadas como alimento y que se encuentra entre las utilizadas en la medicina tradicional para curar o atenuar alguna enfermedad, pero de igual manera no se sabe acerca de sus efectos adversos y/o toxicológicos, por lo que se le da la importancia de estudio y de este modo poder determinar qué tan seguro o no es su consumo.

III. HIPOTESIS

La administración oral de los extractos acuosos de las hojas de berro (*Nasturtium officinale*) no genera efectos tóxicos.

IV. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la toxicidad aguda y sub-crónica de los extractos de las hojas de berro (*Nasturtium officinale*)

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar el intervalo de concentraciones requeridas para provocar la mortalidad.
- Evaluar la toxicidad aguda de los extractos acuosos de las hojas de berro a dosis de 5, 50, 500, 2000 y 5000 mg/kg de peso corporal.
- Evaluar la toxicidad sub-crónica de los extractos acuosos de las hojas de berro a dosis de 1000 y 5000 mg/kg de peso corporal.

VI. MATERIAL

- Ratas Wistar de 250 a 350 gramos
- Hojas de berro (*Nastutium officinale*)
- Química Automatizado ES-218
- Contador de células Celldyn 1700
- Procesador de tejidos (Histokinette-STO120).
- Micrótopo
- Reactivos de grado analítico

VII. MÉTODOS

Manejo de los animales

Los animales experimentales utilizados en este estudio fueron ratas Wistar de ambos sexos pesando de 250 a 350g. Fueron alojadas en condiciones ambientales estándar con un ciclo de luz/obscuridad 12h/12h, temperatura ambiente 23°C y con alimento y agua *ad-libitum*, y distribuidos aleatoriamente en cajas de polipropileno con libre exceso al agua y alimento. El cuidado de los animales y la manipulación fue de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999)

Preparación del extracto

Las hojas fueron desinfectadas con alcohol 96% con ayuda de un algodón y se pesó una cantidad en relación al peso de la rata (100 mg/Kg de peso corporal). Se maceraron en un mortero con agua estéril en una relación de 1 ml/100mg, la solución obtenida se filtró y se centrifugo a 3500rpm durante 15 min, se recolecto el sobrenadante manteniéndose en refrigeración hasta el momento de su administración.

Pruebas de toxicidad aguda

La toxicidad aguda de los extractos acuosos de las hojas de berro se llevó a cabo basándonos en la OECD 420. Las ratas se pesaron y se calculó la dosis con referencia al peso del cuerpo. Posterior a un ayuno de 16hrs se administró un volumen del extracto de 1ml/100mg de peso corporal. Los grupos estaban conformados de 6 ratas por cada dosis las cuales eran de 5, 50, 500, 2000, 5000 mg/Kg y un grupo control el cual recibió solución salina. Antes de la administración se midió la temperatura de cada rata y después a la administraron se tomó nuevamente 15, 30 60, 120, 180 y 280 minutos. Se pesó cada animal al inicio de la prueba a los 7 días y finalmente a los 15 días. Se observaron los animales después de la administración por lo menos una vez durante los primeros 30 minutos, periódicamente durante las primeras 24 horas, con especial atención las primeras 4 horas, ya continuación diariamente, para un total de 15 días. La observación incluyeron cambios en la piel, ojos, membranas, mucosas, presencia de excreciones y secreciones, piloerección, tamaño de pupila, respiración anómala, cambios en la marcha, postura, respuesta a manipulación, presencia de convulsiones crónicas y tónicas, movimientos estereotípicos o conductas anómalas, Los animales fueron sometidos a necropsia para una revisión macroscópica y microscópica de cada órgano, y se recolecto la sangre por punción cardiaca para análisis bioquímicos y pruebas de hematología.

Pruebas de toxicidad sub-crónica

La toxicidad sub-crónica de los extractos acuosos de las hojas de berro se llevó a cabo basándonos en la OECD 407. Los animales se dividieron en grupos de seis los cuales recibieron una dosis de 1000 y 5000 mg/Kg de peso corporal y a un grupo control se le dio solución salina. Al comienzo de la prueba todos los animales se pesaron y cada semana hasta los 28 días (cuarta semana). Durante todo este periodo se observaron por lo menos dos veces todos los días. El día 29

estando en ayuno los animales se sacrificaron realizando una observación macroscópica, y se recolectó la sangre por punción cardiaca para realizar análisis de hematología y bioquímica clínica, de igual manera se obtuvieron los órganos conservándose en solución de formol al 10% para realizar pruebas de histopatología.

Pruebas de hematología y de bioquímica clínica

En el día de la necropsia se extrajo la sangre a través de punción cardiaca y se recolectó en tubos con anticoagulante (EDTA) y en tubos sin anticoagulante. Las muestras de los tubos con EDTA se utilizaron para medir la hematología la cual consta de leucocitos (LEU), eritrocitos (ERIT), hemoglobina (HGB), hematocrito (HCT), hemoglobina corpuscular media concentración (CHCM), ADE (Ancho de distribución eritrocitaria), plaquetas (PLQ), la medición se llevó a cabo con un contador de células Celldyn 1700. De Las muestras de los tubos sin anticoagulante se recolectó el suero que fue utilizado para medir la bioquímica clínica utilizando un equipo automatizado (An. Química Automatizado ES-218) y se midieron los analitos tales como glucosa (GLUC), colesterol (COL), Urea, creatinina (CREAT), alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), creatina cinasa (CK), fosfatasa alcalina (FA), proteínas totales (PT), albumina (ALB), globulinas (GLOB), calcio (Ca) y fosforo (P).

Histología

Los órganos obtenidos durante la necropsia como fue el hígado, riñón, corazón, pulmón, páncreas, bazo y cerebro se fijaron en formol al 10%. Se recolectó una porción de cada órgano no mayor a 0.5 centímetros los cuales se deshidrataron en un equipo procesador de tejidos (Histokinette-STO120). Una vez deshidratados fueron embebidos en parafina tomando la forma de cubos. Con ayuda de un micrótopo se realizaron cortes delgados de 5µm y fueron recolectados en

portaobjetos. Se realizó la tinción usando la técnica de hematoxilina-eosina y finalmente se llevó a cabo la observación al microscopio.

Tabla 4. Método de hematoxilina-eosina

PASO	REACTIVO	TIEMPO	FUNCIÓN
1	XILOL	5 Minutos	Desparafinar
2	XILOL	5 minutos	Desparafinar
3	XILOL	5 Minutos	Desparafinar
4	ALCOHOL ABSOLUTO	3 Minutos	Hidratar
5	ALCOHOL 96%	3 Minutos	Hidratar
6	ALCOHOL 80%	3 Minutos	Hidratar
7	ALCOHOL 50%	3 Minutos	Hidratar
8	AGUA DESTILADA	Pases 3	Hidratar
9	HEMATOXILINA	7 Min.	Colorear núcleos
10	AGUA DESTILADA	Pases 3	Enjuagar
11	AGUA AMONACAL	1.5 Minutos	Fijar colorante al núcleo
12	ALCOHOL ÁCIDO	Pases 3	Eliminar excedente de colorante del citoplasma
13	ALCOHOL 70%	Pases 3	Deshidratar
14	ALCOHOL 96%	Pases 3	Deshidratar
15	EOSINA ALCOHOLICA	3 Minutos	Colorear el citoplasma
16	ALCOHOL 96%	3 Minutos	Deshidratar
17	ALCOHOL 96%	3 Minutos	Deshidratar
18	ALCOHOL ABSOLUTO	3 Minutos	Deshidratar
19	XILOL	8 Minutos	Hacer miscible el tejido a la resina
20	XILOL	8 Minutos	Hacer miscible el tejido a la resina

Análisis estadístico

De los datos obtenidos se calcularon la media, desviación estándar y el error estándar. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con prueba de Dunnett, el cual nos ayuda a comparar las muestras con el grupo control. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativo. Todos los análisis estadísticos fueron llevados a cabo con el software GraphPad Prism 6 y Office Excel 2013.

VIII RESULTADOS

Determinación de toxicidad aguda con extractos de hojas de berro (*Nasturtium officinale*)

Se realizó la determinación de toxicidad aguda del extracto crudo de hojas de berro, para este método se siguieron los métodos de dosis fijas de acuerdo a las directrices 420 de la OCDE. Como se describió en la metodología se formaron seis grupos de ratas Wistar macho con una n de seis en cada uno. La administración oral con cánulas de alimentación 16G se realizó con las siguientes dosis únicas control negativo: solución salina y las siguientes concentraciones 5, 50, 500, 2000 y 5000 mg/Kg de peso corporal. En todos los grupos se administró una dosis de 1ml de cada dosis/100g de peso corporal.

SIGNOS CLÍNICOS

Desde el tiempo basal (administración de las distintas dosis) hasta la fecha final de la prueba de toxicidad aguda (14 días) no se encontró ningún cambio en los parámetros a observar cómo; la piel, el pelo, los ojos, las membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala). Cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, estereotipias (por ejemplo, preparación excesiva, recorridos circulares repetitivos) o comportamientos extraños (por ejemplo, automutilación, marcha hacia atrás).

TEMPERATURA CORPORAL

Al administrar las distintas dosis se midió la temperatura de los animales al inicio del ensayo a los 15, 30, 60, 120, 180 y a los 240 minutos para evaluar si el berro contiene algún elemento pirógeno. La mayoría de las dosis tienen variación de hasta 1 grado, sin embargo, al realizar la estadística se observó que no hay variación significativa ($p > 0.05$) (ANOVA).

Tabla 5. Registro de la temperatura en toxicidad aguda.

Minutos	Temperatura					
	Control	Extracto (mg/Kg)				
		5	50	500	2000	5000
0	32.95 ± 0.2	33.3 ± 0.3	33.1 ± 0.5	33.1 ± 0.3	32.8 ± 0.3	32.5 ± 0.4
15	33.5 ± 0.4	33.1 ± 0.5	33.3 ± 0.8	32.7 ± 0.3	32.9 ± 0.3	33.3 ± 0.9
30	33.2 ± 0.8	33.7 ± 0.4	33.1 ± 0.5	32.5 ± 0.3	33.4 ± 0.5	33.4 ± 0.8
60	33.3 ± 0.8	33.5 ± 0.3	33.3 ± 0.9	33.0 ± 0.4	33.2 ± 0.4	34.1 ± 0.5
120	33.2 ± 0.5	32.7 ± 0.3	33 ± 0.4	34.4 ± 0.7	34.0 ± 0.4	33.8 ± 0.4
180	33.3 ± 0.5	32.6 ± 0.3	32.5 ± 0.3	33.6 ± 0.3	34.0 ± 0.4	34.3 ± 0.5
240	33.6 ± 0.8	33.6 ± 0.8	33.5 ± 0.8	34.4 ± 0.2	34.4 ± 0.4	34.3 ± 0.6

Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (ANOVA, seguida de una prueba post-hoc de Dunnett)

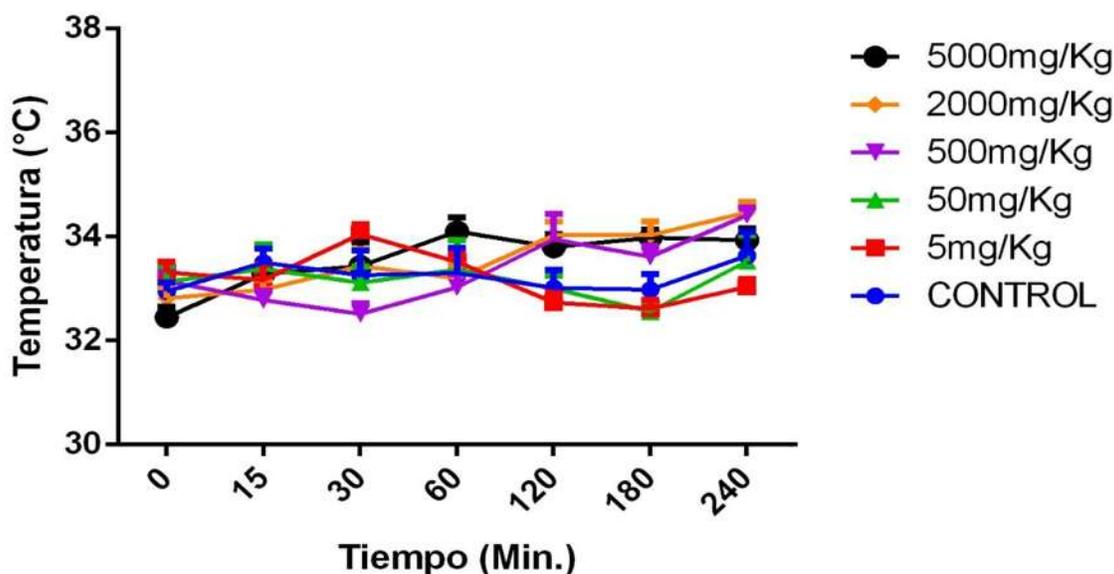


Figura 2. Registro de la temperatura en toxicidad aguda.

La figura muestra las temperaturas durante los primeros 240 minutos después de la administración de extracto, no se observa ningún cambio significativo ($p < 0.05$ ANOVA seguida de post-test de Dunnett)

PESO CORPORAL

Otro de los parámetros principales para evaluar la toxicidad de un compuesto es medir variaciones del peso para analizar si el berro contiene algún compuesto que altere la fisiología de los organismos. A los 0, 7 y 14 días

posteriores a la administración se evaluó el peso de los animales. Como se puede observar en la Tabla 6 y Fig. 3, el incremento del peso fue constante en todos los animales. El análisis estadístico arrojó que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) (ANOVA) entre los grupos entre las dosis en los días de evaluación; siendo el incremento de peso constante entre los grupos

Tabla 6. Registro del peso corporal en toxicidad aguda

Semana	Peso Corporal (mg/Kg)					
	Control	Extracto				
		5	50	500	2000	5000
0	342.1 ± 32.1	333.6 ± 29.4	372.5 ± 23.7	356.3 ± 16.6	390.8 ± 17.4	288.3 ± 22.7
7	360.5 ± 37.2	372.6 ± 28	393.5 ± 26.4	369.5 ± 14.4	409.5 ± 19.3	330.8 ± 17.4
14	374.1 ± 42.1	400 ± 28.4	406.3 ± 28.2	393.6 ± 14.9	425 ± 20	340.5 ± 19.6

Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (ANOVA, seguida de una prueba post-hoc de Dunnett)

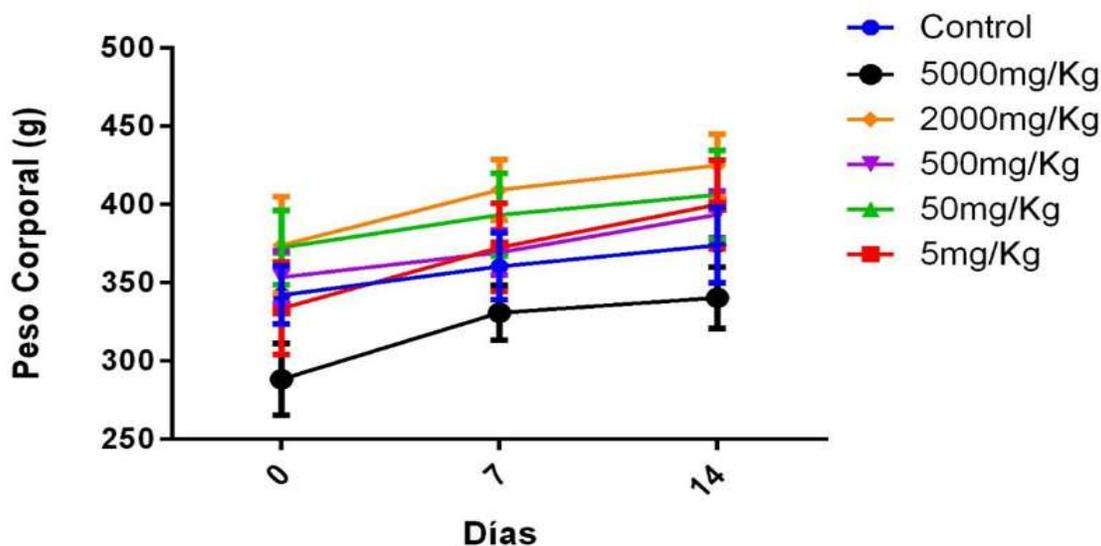


Figura 3 Peso corporal en toxicidad aguda

En la gráfica se observa como el peso de las ratas administradas aumentan cada semana al igual que el grupo control, no mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA seguida de post-hoc de Dunnett) en las dosis analizadas.

PESO DE ÓRGANOS

Durante la necropsia se recolectaron algunos de los órganos de las ratas como son el bazo, hígado, riñón, páncreas, pulmón, cerebro y corazón, antes de colocarse en fijador se pesaron inmediatamente para evaluar variaciones significativas. Un aumento o disminución del peso de algún órgano es un indicador de alguna patología además de que se puede identificar un órgano diana.

Al registrar el peso de cada uno de los órganos de las ratas tratadas de forma sub-crónica en las distintas dosis y al realizar la estadística no se presenta variación significativa ($p > 0.05$) (ANOVA) manteniéndose los pesos en un rango igual al de las ratas del grupo control.

Tabla 7. Peso de los órganos en toxicidad aguda

Órgano	Peso de órganos					
	Control	Extracto mg/Kg				
		5	50	500	2000	5000
Hígado	9.5 ± 0	9 ± 0	9 ± 1	10 ± 0	9.5 ± 1.5	9.5 ± 0.5
Riñón	2 ± 0	1.5 ± 0.5	2 ± 0	1.5 ± 0.5	2 ± 0	1.5 ± 0.5
Cerebro	2 ± 0	2 ± 0	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	2 ± 0	2 ± 0
Bazo	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Pulmón	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0.5	2 ± 0	2.5 ± 0.5	2 ± 0
Corazón	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Páncreas	1 ± 0	1 ± 0	1.5 ± 0.5	1.5 ± 0.5	1 ± 0	1 ± 0

Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las dosis empleada para cada uno de los órganos ($p > 0.05$) (ANOVA, seguida de una post-hoc de Dunnett)

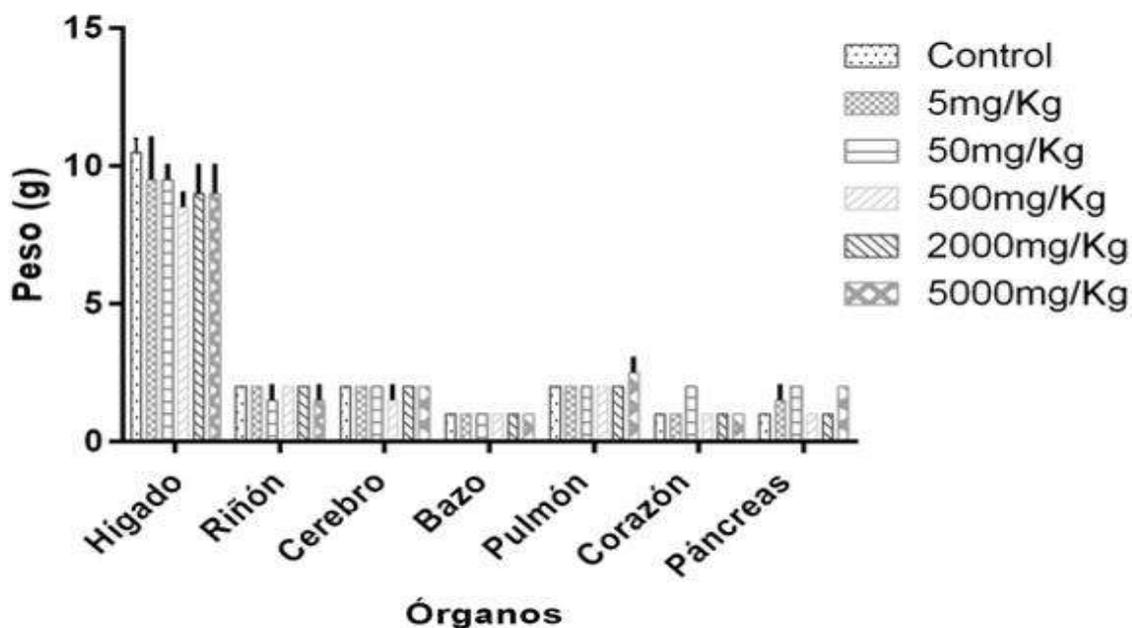


Figura 4 Peso de los órganos en toxicidad aguda.

En la gráfica se muestra que no se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA seguida de post-hoc de Dunnett) en los órganos de las ratas tratadas con las distintas dosis.

BIOQUÍMICA CLÍNICA

La sangre que se obtuvo durante la necropsia se utilizó para la estimación de los parámetros bioquímicos que se muestran en la tabla 8. Al realizar el análisis estadístico se observa que los parámetros no muestran variación significativa ($p > 0.05$) (ANOVA).

Tabla 8. Parámetros bioquímicos en toxicidad aguda

PARAMETROS	Bioquímica Clínica		
	Control mg/Kg	Extracto mg/Kg	
		2000	5000
Glucosa (mg/ml)	223.8 ± 103.1	153.1 ± 5.9	131.5 ± 36
Urea (mg/dl)	302.4 ± 25.2	194.6 ± 63	229.6 ± 8.4
Creatina (mg/dl)	8.3 ± 1.5	7 ± 1.1	9.3 ± 3.4
AST (U/L)	216.2 ± 29.15	189.8 ± 18.3	153.6 ± 43.6
ALT (U/L)	138.5 ± 34.6	66.1 ± 10.2	94.6 ± 45.5
FA (U/L)	283.5 ± 12.3	302.2 ± 36.2	299.9 ± 39.3
Albumina (g/dl)	32.3 ± 1.5	30.1 ± 1.2	29.5 ± 0.5
Globulinas (g/dl)	37.3 ± 1.5	36 ± 1.1	35.6 ± 1.7
A/G	8.6 ± 0.05	8.3 ± 0.1	8.8 ± 0.2
Proteínas Totales (g/dl)	69.7 ± 3	66.1 ± 2.3	65.2 ± 2.3
Colesterol (mg/dl)	73 ± 3.8	73 ± 0	78.2 ± 1.9
CK (U/L)	498.4 ± 44.5	331.7 ± 72.8	448.2 ± 228.3
Calcio (mg/dl)	115 ± 13	106 ± 2	120 ± 16
Fosforo (mg/dl)	179 ± 81	140.8 ± 17	128.4 ± 35.6

Parámetros bioquímicos: ALT (Alanina aminotransferasa), AST (Aspartato aminotransferasa), CK (Creatina cinasa), FA (Fosfatasa alcalina). Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (ANOVA, seguida de una prueba post hoc de Dunnett)

HEMATOLOGÍA

Durante la necropsia se recolectó una muestra de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA 7.2 %). En los resultados obtenidos de la hematología para las ratas tratadas de forma aguda se observa que en los parámetros no se ve alguna diferencia significativa ($p > 0.05$) (ANOVA).

Tabla 9. Parámetros hematológicos en toxicidad aguda

PARÁMETROS	HEMATOLOGÍA		
	Control mg/Kg	Extracto mg/Kg	
		2000	5000
Leucocitos	5.8 ± 0.7	13.15 ± 1.55	6.05 ± 0.15
Eritrocitos	6.63 ± 0.3	6.40 ± 0.43	7.04 ± 0.56
HGB	12.7 ± 0.8	12.85 ± 0.45	13.55 ± 0.95
HCT	36.35 ± 2.45	42.55 ± 0.05	43 ± 0.5
VCM	55 ± 1	61.5 ± 0.35	61.5 ± 4.5
HCM	19.15 ± 0.35	20.1 ± 0.6	19.2 ± 0.2
CHCM	34.9 ± 0.1	30.2 ± 1.1	31.4 ± 1.9
ADE	12.6 ± 0.1	19.75 ± 1.75	19 ± 1.8
Plaquetas	8.6 ± 0.28	6.28 ± 0.28	5.95 ± 0.21
VPM	6.6 ± 0	7.45 ± 0.15	7 ± 0.1
Neutrófilos	25.25 ± 0.15	24.05 ± 8.65	27.15 ± 2.15
Linfocitos	69.35 ± 0.75	71.5 ± 9.2	67.3 ± 2.1
Monocitos	3.35 ± 0.15	3.35 ± 0.55	4.55 ± 0.15
Eosinófilos	1.75 ± 0.65	0.7 ± 0	0.6 ± 0.1
Basófilos	0.3 ± 0.1	0.4 ± 0	0.4 ± 0.1

Parámetros de hematología: HGB (Hemoglobina), HCT (Hematocrito), VCM (Volumen corpuscular medio), HCM (Hemoglobina corpuscular media), CHCM (hemoglobina corpuscular media concentración), ADE (Ancho de distribución eritrocitaria), VPM (Volumen plaquetario medio). Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0.05) (ANOVA, seguida de una prueba post-hoc de Dunnett)

NECROPSIA

Una vez terminado el análisis de toxicidad aguda (14 días) los animales fueron sacrificados con solución de cloroformo al 72.12%, se realizó la necropsia para realizar un análisis anatómico-patológico, esto es observar macroscópicamente todos los órganos y evaluar si existe algún daño, absceso o una coloración fuera de lo normal, los órganos a evaluar fueron el corazón, páncreas, pulmón, cerebro, hígado, riñón, bazo.

Al realizar el análisis anatómico-patológico en los distintos órganos durante la necropsia no se observaron anomalías en los distintos órganos analizados, todos presentaron una coloración dentro de lo normal, no se observó ningún absceso

adherido a los órganos, algún derrame o presencia de pus, y todos los órganos mantenían un tamaño normal.

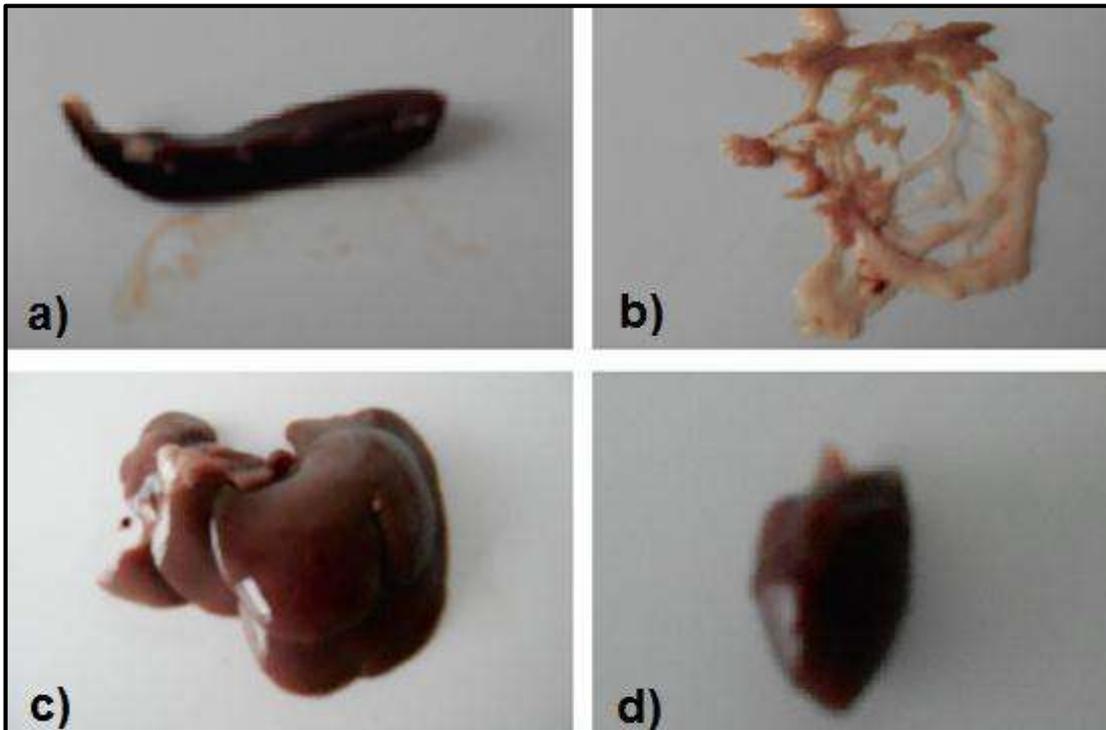


Figura 5 a) Bazo, b) páncreas, c) hígado y d) corazón de ratas en toxicidad aguda.
La imagen muestra como los órganos de toxicidad aguda a dosis de 5000 mg/Kg se ven en perfecto estado fuera de alguna anomalía.

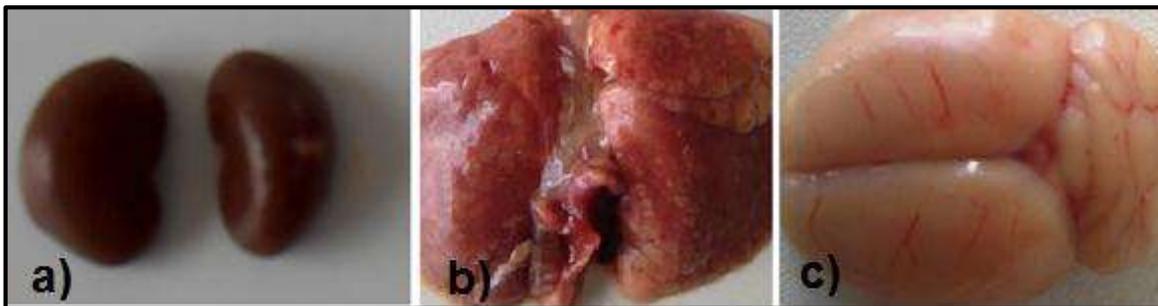


Figura 6 a) riñón, b) pulmón y c) cerebro de ratas en toxicidad aguda.
La imagen muestra como los órganos de toxicidad aguda a dosis de 5000 mg/Kg se ven en perfecto estado fuera de alguna anomalía.

ANÁLISIS HISTOPATOLOGICO

Posterior a la fijación de los distintos órganos se procedió a realizar el análisis histopatológico de acuerdo a la norma OECD 420. Se realizaron cortes de

5 μm y fueron teñidos con la tinción de Hematoxilina-Eosina y se observaron al microscopio con un aumento de 100X.

Riñón.

En las distintas dosis analizadas no se observa ningún daño en las nefronas ni en túbulos proximales (figura 8) al ser comparadas con nuestro grupo control y un corte de riñón sano donde se muestra su estructura (figura 7)

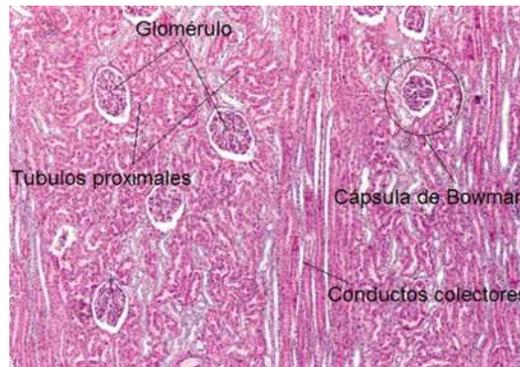


Figura 7 Corte histológico de un riñón sano.

Tomado de: histología (podología): practicas microscópicas.
<http://www.uv.es/~histomed/podologia/01-rinon-esof-intgrueso.htm>

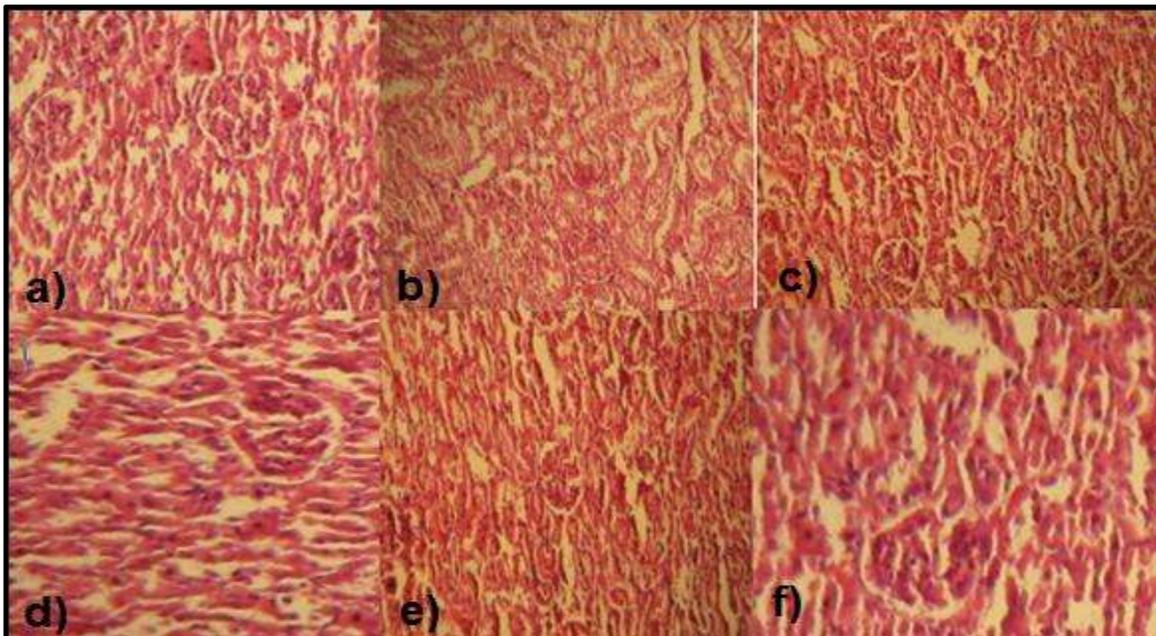


Figura 8 Micrografías del análisis celular del riñón de ratas en Toxicidad aguda

Las imágenes muestran los cortes del riñón (100x) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 5 mg/kg, c) 50 mg/kg, d) 500 mg/kg, e) 2000 mg/kg, f) 5000 mg/kg. Se observa que no existe daño en nefronas o en túbulos renales

Hígado

En las distintas dosis analizadas no se observa ningún daño en los hepatocitos ni en los espacios sinusoides (figura 10) al ser comparadas con el grupo control y con un corte de hígado sano donde se muestra su estructura (figura 9)

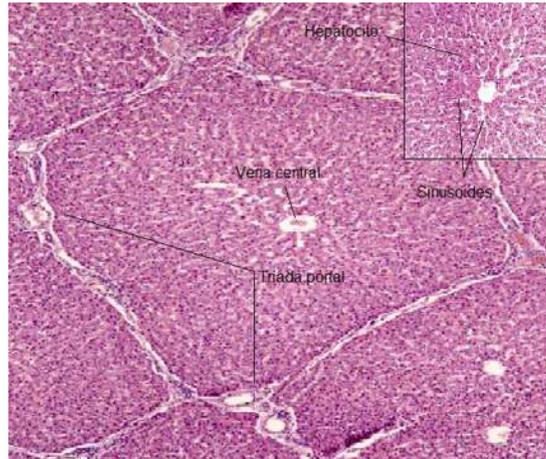


Figura 9 Corte de un histológico de hígado sano.

Tomado de histología (podología): practicas microscópicas <http://www.uv.es/histomed/practicas/11-digestivo/11-digestivo.htm>

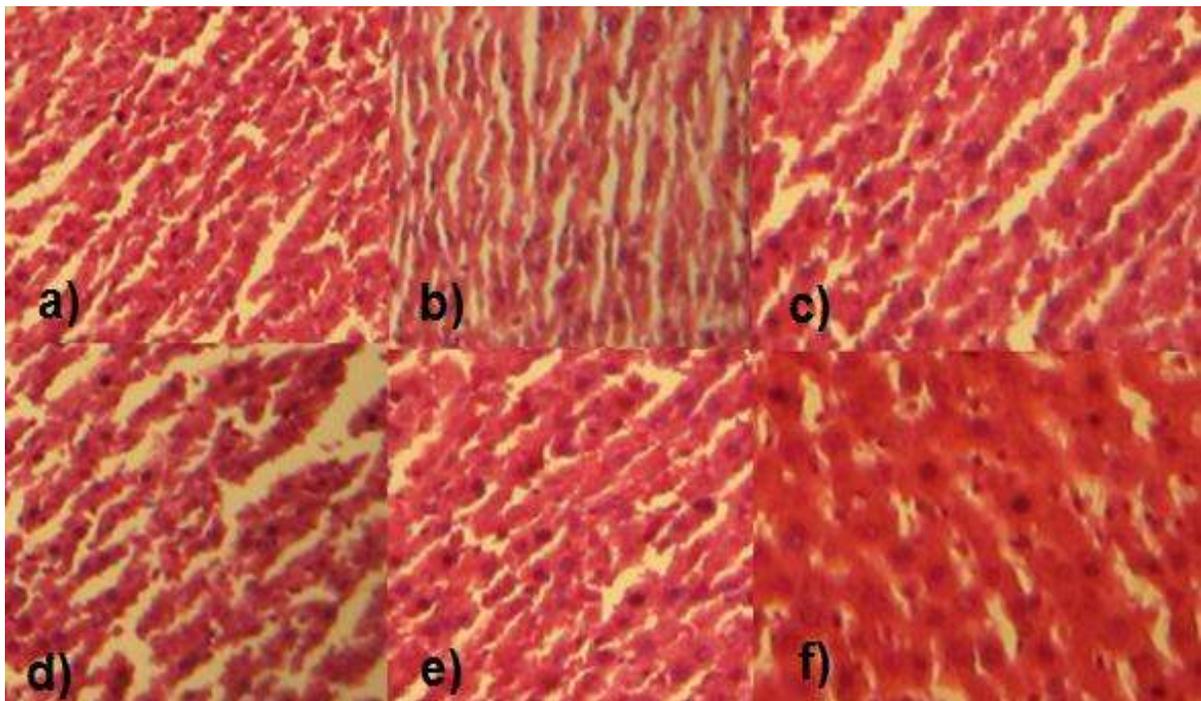


Figura 10 Micrografías del análisis celular del hígado de ratas en Toxicidad aguda.

La imagen muestra los cortes del hígado (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 5 mg/kg, c) 50 mg/kg, d) 500 mg/kg, e) 2000 mg/kg, f) 5000 mg/kg. Se observa que no existe daño en los hepatocitos

Corazón

En las distintas dosis analizadas no se observa ningún daño en el músculo estriado del corazón (figura 12) al ser comparadas con el grupo control y con un corte de corazón sano donde se muestra su estructura (figura 11)

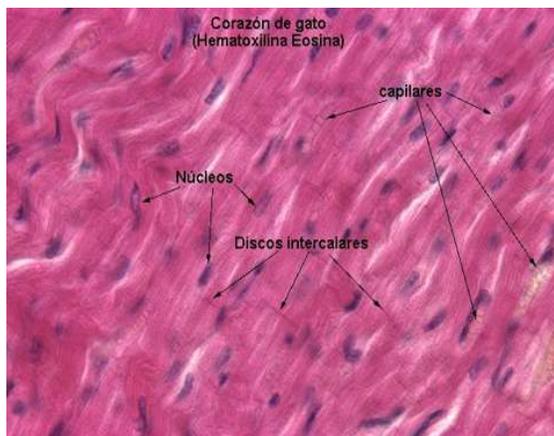


Figura 11 Corte histológico de corazón.

Tomado de histología (podología): practicas microscópicas.
<http://www.uv.es/histomed/practicas/06-muscular/06-muscular.htm>

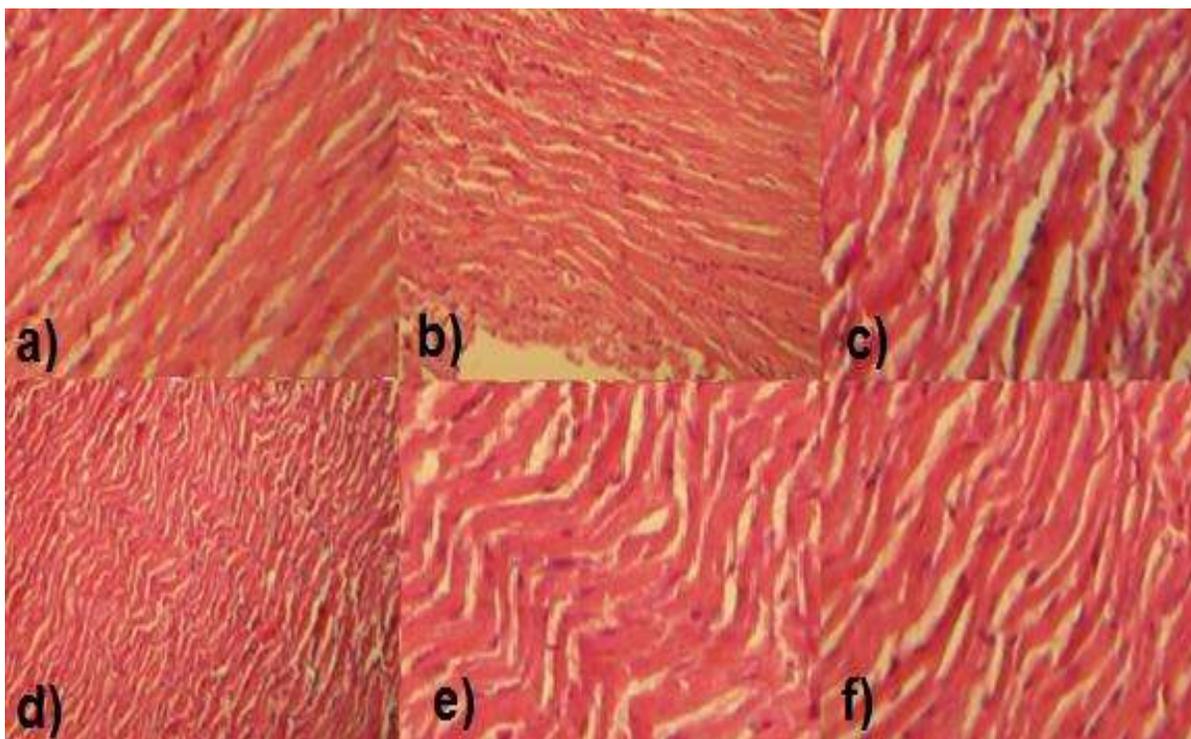


Figura 12 Micrografías del análisis celular del corazón de ratas en Toxicidad aguda.

Las imágenes muestran los cortes del corazón (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 5 mg/kg, c) 50 mg/kg, d) 500 mg/kg, e) 2000 mg/kg, f) 5000 mg/kg. No se observan daños en el músculo estriado en las distintas dosis.

Pulmón

En la figura 13 se muestra la imagen de un corte histológico con la estructura de un pulmón sano. En el estudio histopatológico del pulmón se puede observar un proceso de congestión vascular. En la imagen a) de la figura 14 se puede notar que las ratas del grupo control también presentan este daño.

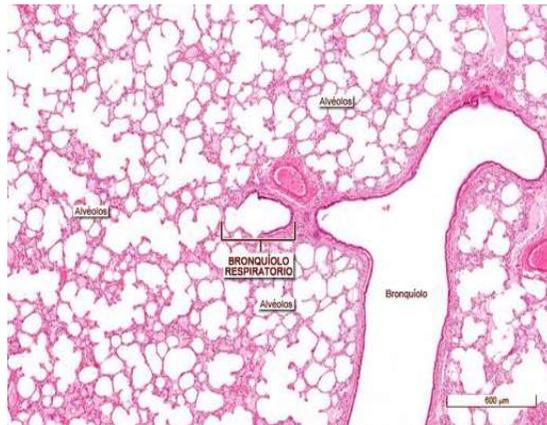


Figura 13 Corte histológico del pulmón sano.

Tomado de histología (podología): practicas microscópicas.
<http://www.uv.es/histomed/practicas/12-organos/12-organos.htm>

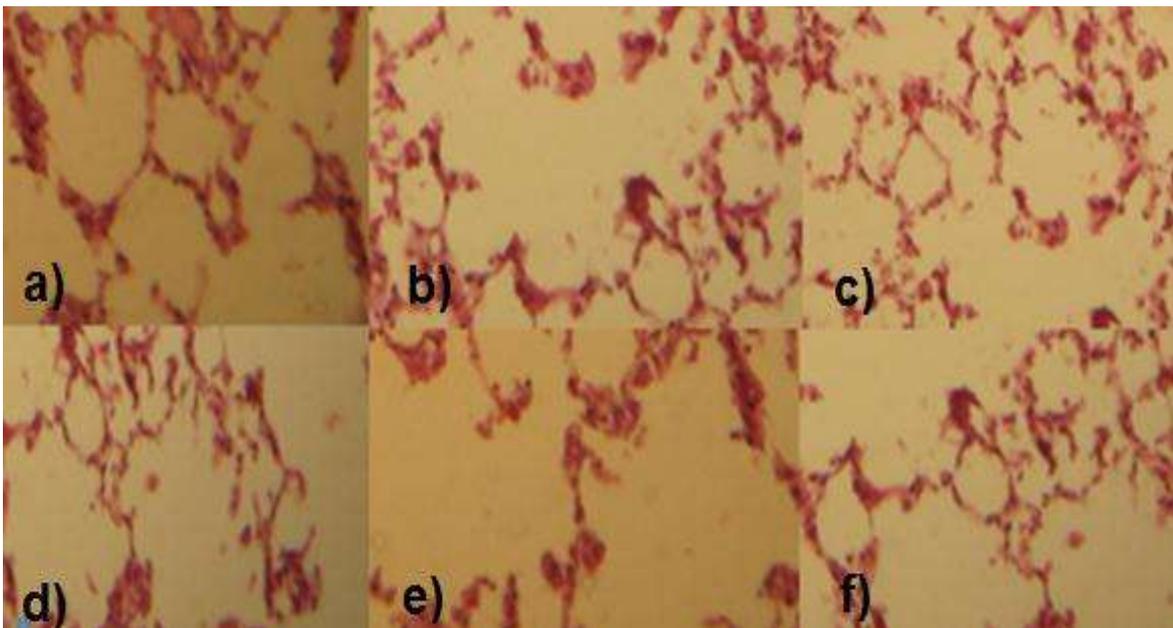


Figura 14 Micrografías del análisis celular del pulmón de ratas en Toxicidad aguda.

La imagen muestran los cortes del pulmón (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 5 mg/kg, c) 50 mg/kg, d) 500 mg/kg, e) 2000 mg/kg, f) 5000 mg/kg. En las distintas dosis y en el grupo control se puede observar un ligero proceso de congestión

Ensayo de toxicidad sub-crónica con extractos de hojas de berro (*Nasturtium officinale*)

La prueba de toxicidad sub-crónica de los extractos de hojas de berro (*Nasturtium officinale*) se llevó de acuerdo a la directriz OECD-407 que consta de una administración repetida-oral durante 28 días. Se conformaron 2 grupos de 6 ratas Wistar, con dosis de 2000 mg/Kg y 5000 mg/Kg y un grupo control que recibió solución salina al 0.9 %

Durante los 28 días del ensayo de toxicidad sub-crónica se pesaron los animales cada semana. Como se puede observar en la Tabla 10 y Fig. 15-16, el incremento del peso fue constante en todos los animales. El análisis estadístico arrojó que no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) (ANOVA) entre los grupos entre las dosis en los días de evaluación; siendo el incremento de peso constante entre los grupos

Tabla 10. Registro del peso corporal en toxicidad sub-crónica para ratas machos y hembras

Semana	Peso Corporal mg/Kg (Machos)			Peso Corporal mg/Kg (Hembras)		
	Control	Extracto		Control	Extracto	
		1000	5000		1000	5000
0	208 ± 2	240.3 ± 5.9	278.5 ± 25.2	302.5 ± 12.5	260.5 ± 15.5	308.6 ± 29.1
7	249.5 ± 3.5	257.5 ± 7.5	286.1 ± 26.7	310 ± 25	266 ± 16.2	308.6 ± 46.3
15	273.5 ± 6.5	273.1 ± 6.1	292.5 ± 24	315.5 ± 18.5	272.3 ± 14.6	321 ± 18.5
21	289 ± 1	293.8 ± 6.2	294.3 ± 12.9	316 ± 14	274.1 ± 17.3	330.5 ± 18.7
28	306 ± 4	314 ± 5.2	308 ± 12.9	316 ± 14	275.6 ± 17.5	230.8 ± 35.7

Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (ANOVA, seguida de una prueba post-hoc de Dunnett)

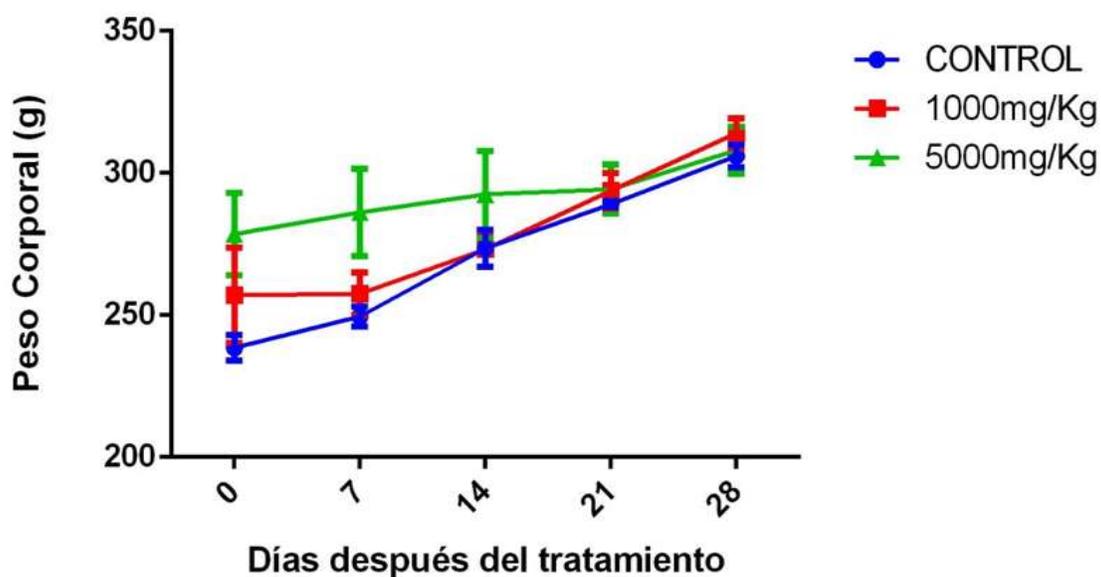


Figura 15 Peso corporal de ratas macho en toxicidad sub-crónica.

En la gráfica se observa como el peso de las ratas administradas aumenta desde el inicio de la prueba hasta el día último no mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA seguida de post-hoc de Dunnett) en las dosis analizadas comparadas con el grupo control.

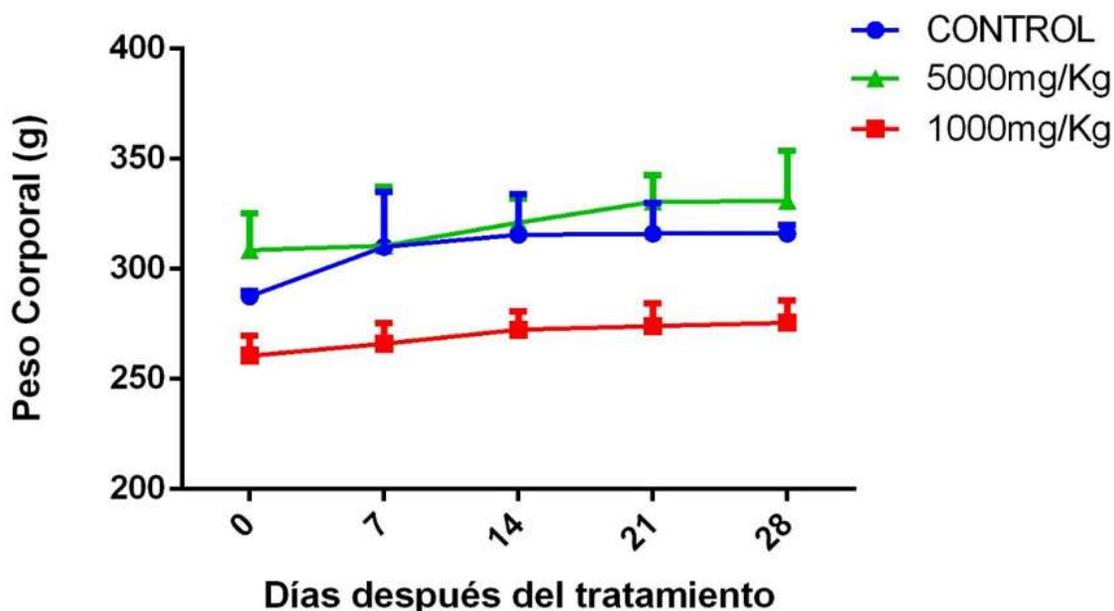


Figura 16 Peso corporal de ratas hembras en toxicidad sub-crónica.

En la gráfica se observa como el peso de las ratas administradas aumenta desde el inicio de la prueba hasta el día último no mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$ ANOVA seguida de una prueba post-hoc de Dunnett) en las dosis analizadas comparadas con el grupo control.

PESO DE LOS ÓRGANOS

Al registrar el peso de cada uno de los órganos de las ratas machos y hembras tratadas de forma sub-crónica en las distintas dosis; al realizar la estadística no se presenta variación significativa ($p>0.05$) (ANOVA) manteniéndose los pesos igual que las ratas del grupo control.

Tabla 11. Peso de los órganos en toxicidad sub-crónica para ratas hembras y machos.

Órgano	Peso de órganos mg/Kg (Machos)			Peso de órganos mg/Kg (Hembras)		
	Control	Extracto		Control	Extracto	
		1000	5000		1000	5000
Hígado	11.5 ± 0.5	9.5 ± 1.5	9.5 ± 0.5	8.5 ± 0.5	9 ± 1	9 ± 1
Riñón	2 ± 0	2 ± 0	1.5 ± 0.5	2 ± 0	2 ± 0	1.5 ± 0.5
Cerebro	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	1.5 ± 0.5	2 ± 0	2 ± 0
Bazo	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Pulmón	2.5 ± 0.5	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2 ± 0	2.5 ± 0.5
Corazón	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0
Páncreas	1 ± 0	1.5 ± 0.5	2 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0

Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, $n=6$ (número de animales por grupo). No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) (ANOVA, seguida de una prueba post-hoc de Dunnett)

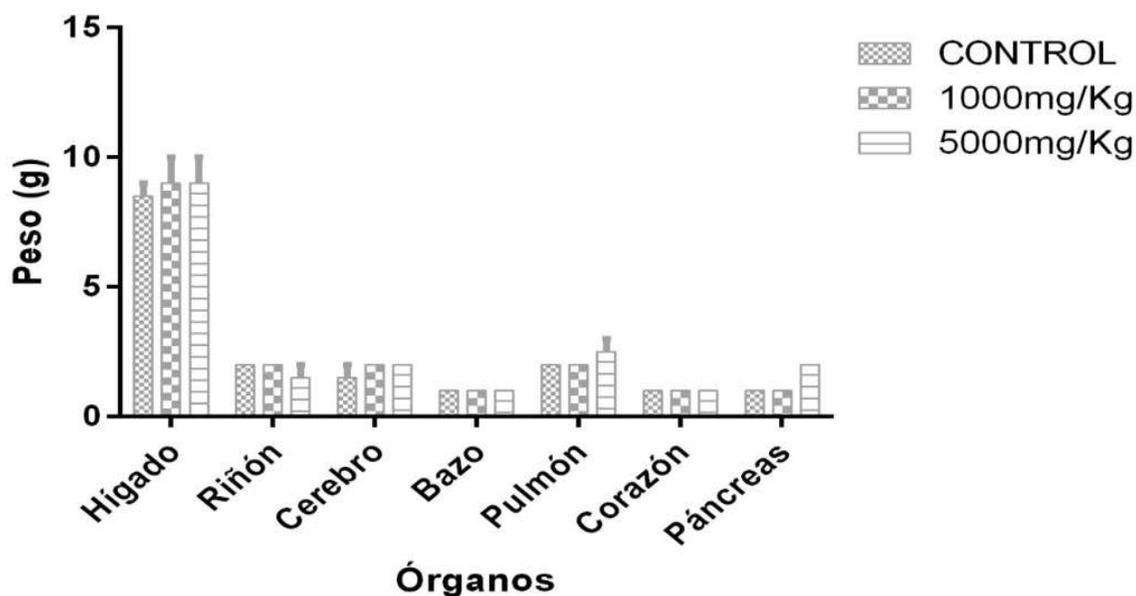


Figura 17 Peso de los órganos de ratas macho en toxicidad sub-crónica.

En la gráfica se muestra que no existe diferencia significativa ($p<0.05$ ANOVA seguida de post-Hoc de Dunnett) en los órganos de las ratas tratadas con las distintas dosis.

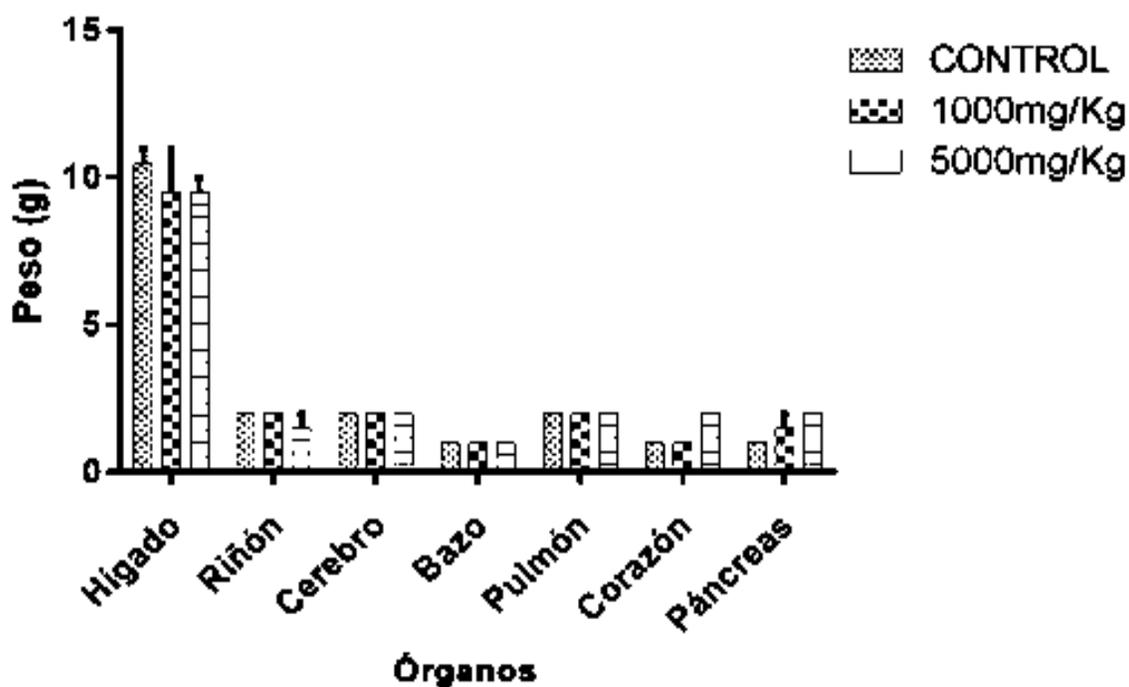


Figura 18 Peso de los órganos de ratas hembras en toxicidad sub-crónica.

En la gráfica se muestra que no existe diferencia significativa ($p < 0.05$ ANOVA seguida de una post-Hoc de Dunnett) en los órganos de las ratas tratadas con las distintas dosis.

BIOQUÍMICA CLÍNICA

La sangre obtenida durante la necropsia se utilizó para la estimación de los parámetros bioquímicos que se observan en la tabla 12. Los parámetros medidos en las ratas machos se observa que la enzima hepática AST es la única que presenta variación a una dosis de 5000 mg/Kg. En las ratas hembras se observa que los parámetros de las distintas dosis no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$) (ANOVA) comparadas con el grupo control.

Tabla 12. Parámetros bioquímicos para ratas machos y hembras en toxicidad sub-crónica.

PARÁMETROS	Bioquímica Clínica mg/Kg (Machos)			Bioquímica Clínica mg/Kg (Hembras)		
	Control	Extracto		Control	Extracto	
		1000	5000		1000	5000
Glucosa (mg/ml)	141 ± 17.4	141 ± 17.4	50.4 ± 5.4	183.7 ± 1.8	71.1 ± 11.7	92.7 ± 17.1
Urea (mg/dl)	147.1 ± 34.3	247.1 ± 34.3	306.7 ± 35	217 ± 4.2	392.1 ± 2.8	410.3 ± 7
Creatinina (mg/dl)	10.6 ± 1.2	10.6 ± 1.2	8.3 ± 0.8	10 ± 0.4	9.0 ± 0.7	9.3 ± 0.5
AST (U/L)	198.5 ± 29.6	198.5 ± 29.6	323.8 ± 8.5*	158.2 ± 17.3	277.6 ± 69.5	171.4 ± 1.6
ALT (U/L)	121.1 ± 13.1	121.1 ± 13.1	101.1 ± 27.1	83.6 ± 4.1	83.9 ± 10.55	78.5 ± 0.7
FA (U/L)	277.9 ± 21.9	277.9 ± 21.9	354.7 ± 1	171.5 ± 15.2	107.4 ± 16.8	154.6 ± 39.1
Albumina (g/dl)	29.5 ± 1.4	29.5 ± 0.6	29.1 ± 0.4	30.2 ± 1.9	37.4 ± 2.2	33.3 ± 1.05
Globulinas (g/dl)	35.7 ± 2	36.8 ± 0.3	36.9 ± 0.2	36.9 ± 1.9	37.4 ± 1.2	37.8 ± 0.5
A/G	8.2 ± 0.6	7.5 ± 0.0	7.8 ± 0.1	8.2 ± 0.9	8.4 ± 0.4	8.8 ± 0.4
Proteínas Totales (g/dl)	65.2 ± 1.4	65.2 ± 1.4	66 ± 0.2	67.2 ± 0	69.2 ± 5.7	71.1 ± 0.5
Colesterol (mg/dl)	71.1 ± 1.9	71.1 ± 1.9	63.4 ± 1.9	80.7 ± 7.6	76.9 ± 0	78.8 ± 5.7
CK (U/L)	349.9 ± 56.4	349.9 ± 56.4	397 ± 103.8	245.5 ± 161.4	432.2 ± 84.1	212 ± 89.3
Calcio (mg/dl)	122 ± 22	122 ± 22	110 ± 10	102 ± 2	120 ± 4	108 ± 4
Fosforo (mg/dl)	140 ± 30.2	140 ± 30.2	133.1 ± 6.2	75.8 ± 17	111.4 ± 6.2	89.7 ± 3.1

Parámetros bioquímicos: ALT (Alanina aminotransferasa), AST (Aspartato aminotransferasa), CK (Creatina Cínasa), FA (Fosfatasa alcalina). Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) (ANOVA, seguida de una prueba post-hoc de Dunnett)

HEMATOLOGÍA

Durante la necropsia se obtuvo una muestra de sangre en tubos con anticoagulante (EDTA al 7.2 %) que se utilizó para realizar los estudios de hematología. Al obtener los resultados de las ratas macho se puede observar que en los parámetros no se muestra variación significativa ($p > 0.05$) (ANOVA) mientras que en los parámetros para ratas hembras se observa una variación en el HCT (Hematocrito) en la dosis de 5000 mg/Kg.

Tabla 13. Parámetros de hematología para ratas machos y hembras en toxicidad sub-crónica.

PARAMETRO	Hematología mg/Kg (Machos)			Hematología mg/Kg (Hembras)		
	Control	Extracto		Control	Extracto	
		1000	5000		1000	5000
Leucocitos	9.75 ± 0.75	3.6 ± 0.6	11 ± 9.6	4.05 ± 0.25	5.08 ± 3	7.8 ± 0.5
Eritrocitos	11.77 ± 0.77	9.56 ± 1.41	5.96 ± 4.93	7.66 ± 0.14	8.17 ± 0.93	11.12 ± 1.26
HGB	21 ± 0.6	17.6 ± 2.9	11.65 ± 9.45	14.15 ± 0.25	16.15 ± 1.45	19.6 ± 2.1
HCT	62.45 ± 3.65	49.7 ± 7.2	57.1 ± 0.14	39.75 ± 1.15	44.2 ± 4.8	56.2 ± 5.7*
VCM	53 ± 0	52 ± 0	54.5 ± 0.5	51.5 ± 0.5	54 ± 0	50.5 ± 0.5
HCM	17.9 ± 0.7	18.4 ± 0.3	20.4 ± 1	18.5 ± 0	19.85 ± 0.45	17.65 ± 0.15
CHCM	33.75 ± 1.05	35.35 ± 0.65	37.3 ± 2	35.8 ± 0.3	36.65 ± 0.65	34.9 ± 0.2
ADE	14.9 ± 1.3	10.9 ± 0.3	11.25 ± 1.45	9.35 ± 0.65	11.3 ± 0	10.15 ± 0.15
Plaquetas	59.15 ± 13.05	77.6 ± 9.5	70.45 ± 17.55	69.1 ± 12.1	79 ± 3.8	83.8 ± 6.82
VPM	8.2 ± 0.6	7.15 ± 0.05	6.6 ± 0.2	7.3 ± 0.2	7.2 ± 0.4	6.7 ± 0.2
Neutrófilos	5.6 ± 0.1	7.65 ± 1.45	13.75 ± 6.95	7.4 ± 0.8	7.2 ± 1.6	7.4 ± 0.2
Linfocitos	92.2 ± 0.7	91.75 ± 1.65	81.1 ± 5.3	91.8 ± 0.8	86.65 ± 2.55	91.4 ± 0.8
Monocitos	0.45 ± 0.15	0.15 ± 0.05	0.1 ± 0.1	0.25 ± 0.05	0.35 ± 0.25	0 ± 0
Eosinófilos	0.1 ± 0	0.05 ± 0.05	1.5 ± 1.5	0.25 ± 0.05	0.05 ± 0.05	0.07 ± 0.05
Basófilos	1.65 ± 0.75	0.2 ± 0.1	3.55 ± 3.05	0.3 ± 0.1	5.3 ± 4.9	1.05 ± 0.65

Parámetros de hematología: HGB (Hemoglobina), HCT (hematocrito), VCM (Volumen corpuscular medio), HCM (hemoglobina corpuscular media), CHCM (Hemoglobina corpuscular media concentración), ADE (Ancho de distribución eritrocitaria), VPM (Volumen plaquetario medio). Los datos representan la media ± E.E para cada grupo de ratas, n=6 (número de animales por grupo). Los asteriscos representan las diferencias estadísticamente significativas (p>0.05) (ANOVA, seguida de una prueba post-hoc de Dunnett)

NECROPSIA

Al realizar las observaciones en los animales de ensayo no se observaron anomalías en los distintos órganos analizados, todos tenían una coloración dentro de lo normal, no se observó ningún absceso adherido a los órganos, algún derrame o presencia de pus, y todos los órganos mantenían un tamaño normal.

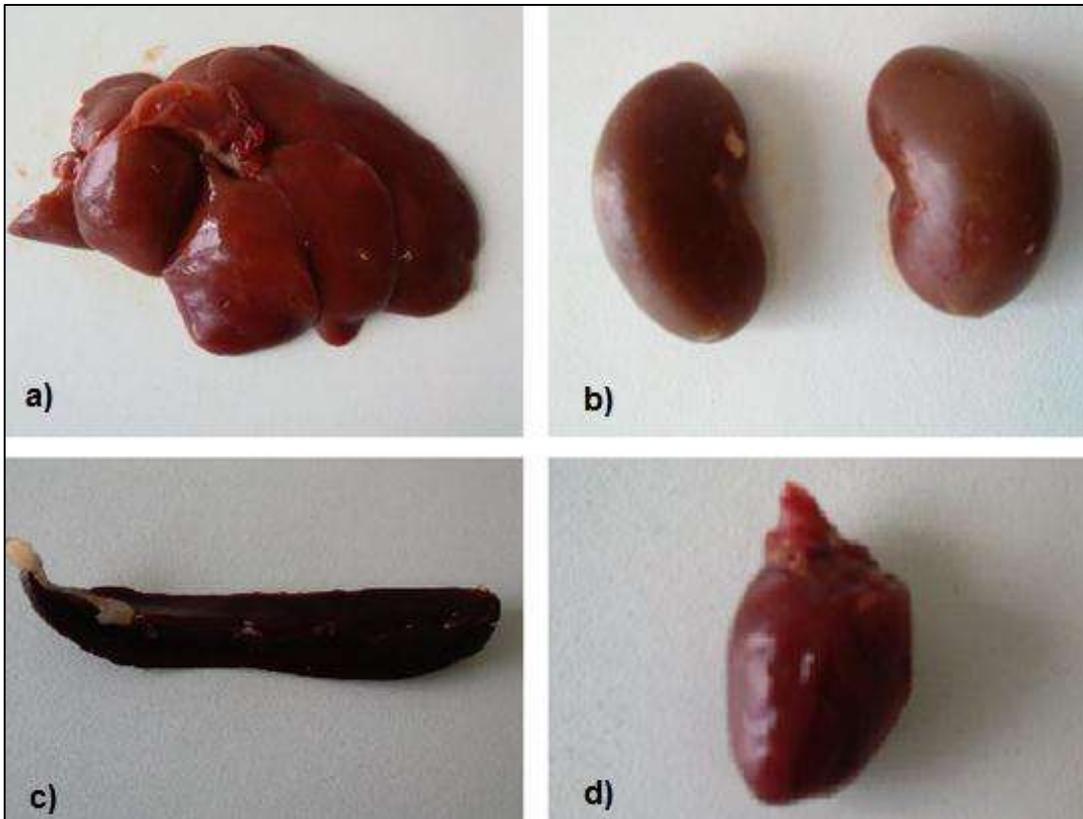


Figura 19 a) Hígado, b) riñones, c) bazo y d) corazón de ratas en toxicidad sub-crónica.
 La imagen muestra como los órganos de toxicidad sub-crónica a dosis de 5000 mg/Kg se ven en perfecto estado fuera de alguna anomalía.

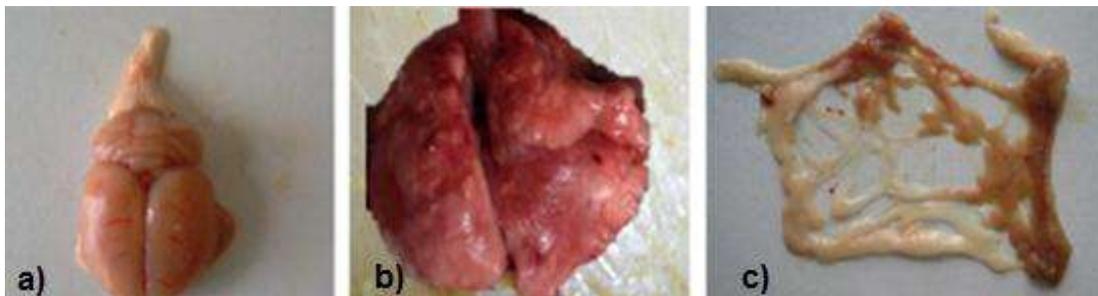


Figura 20 a) cerebro, b) pulmón y c) páncreas de ratas en toxicidad sub-crónica
 La imagen muestra como los órganos de toxicidad sub-crónica a dosis de 5000 mg/Kg se ven en perfecto estado fuera de alguna anomalía.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Posterior a la fijación de los distintos órganos se procedió a realizar el análisis histopatológico de acuerdo a la norma OECD 407. Se realizaron cortes de 5 μm y fueron teñidos con la tinción de Hematoxilina-Eosina y se observaron al microscopio con un aumento de 100x.

Como se muestra en las figuras 21, 22 y 23, se puede notar que no hay daños a nivel celular en el riñón, hígado y corazón. En el riñón las nefronas y los túbulos proximales mantienen sus estructuras dentro de lo normal, así como los hepatocitos del hígado junto con los espacios sinusoides.

En la figura 17 se observa el pulmón con una ligera autólisis en las paredes de los alveolos, consecuencia de una congestión vascular.

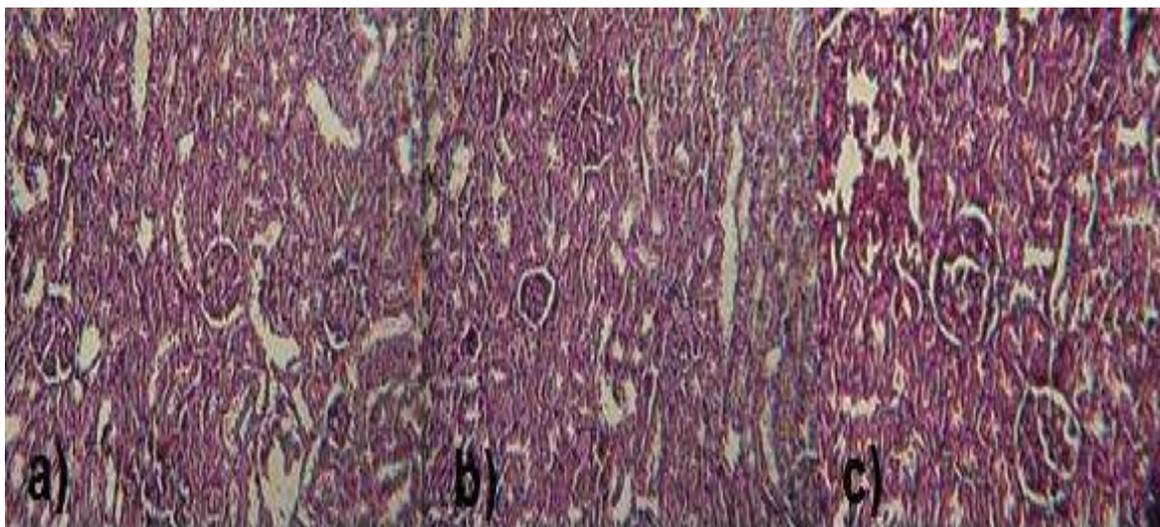


Figura 21 Micrografías del análisis celular del riñón de ratas macho en Toxicidad sub-crónica

La imagen muestra los cortes del riñón (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. Se observa que no existe daño en nefronas y en túbulos renales

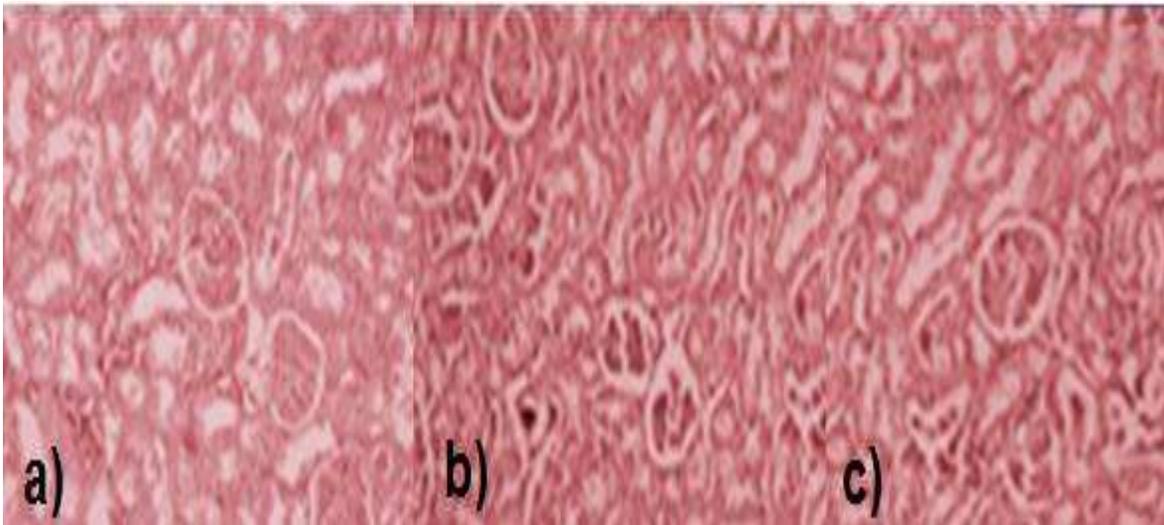


Figura 22 Micrografías del análisis celular del riñón de ratas hembras en Toxicidad sub-crónica

La imagen muestra los cortes del riñón (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. Se observa que no existe daño en nefronas ni en túbulos renales

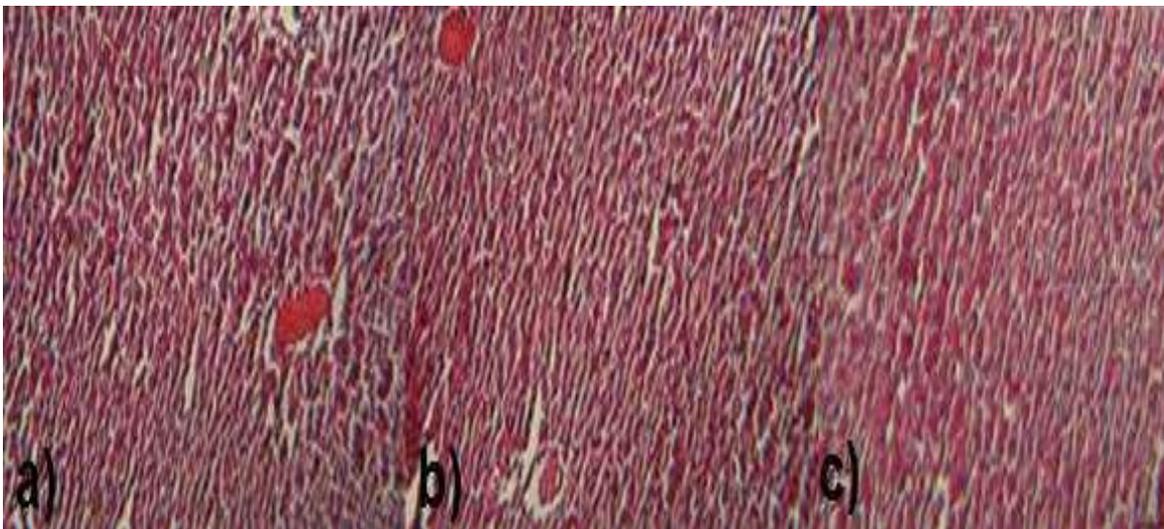


Figura 23 Micrografías del análisis celular del hígado de ratas macho en Toxicidad sub-crónica.

Las imágenes muestran los cortes del hígado (10X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. Se observa que no existe daño en los hepatocitos

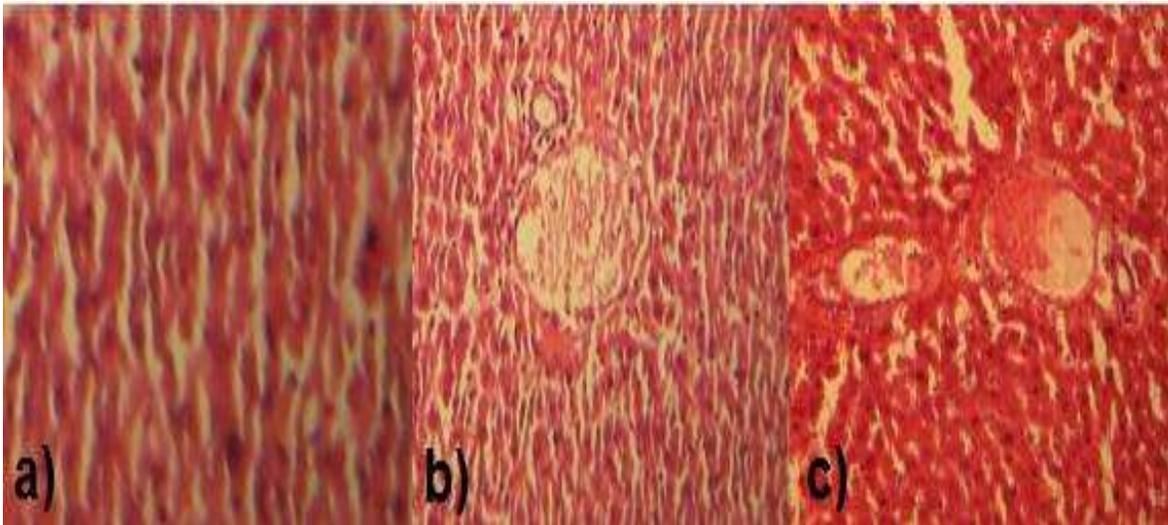


Figura 24 Micrografías del análisis celular del hígado de ratas hembras en Toxicidad sub-crónica.

Las imágenes muestran los cortes del hígado (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. Se observa que no existe daño en los hepatocitos ni en sinusoides.

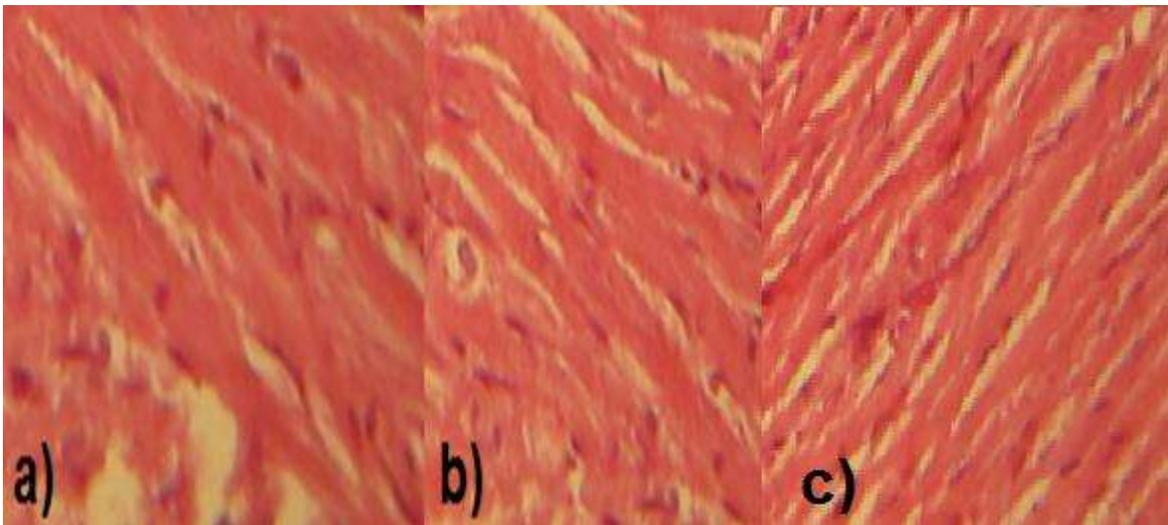


Figura 25 Micrografías del análisis celular del corazón de ratas macho en Toxicidad sub-crónica

Las imágenes muestran los cortes del corazón (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. No se observan daños en el musculo estriado en las distintas dosis.

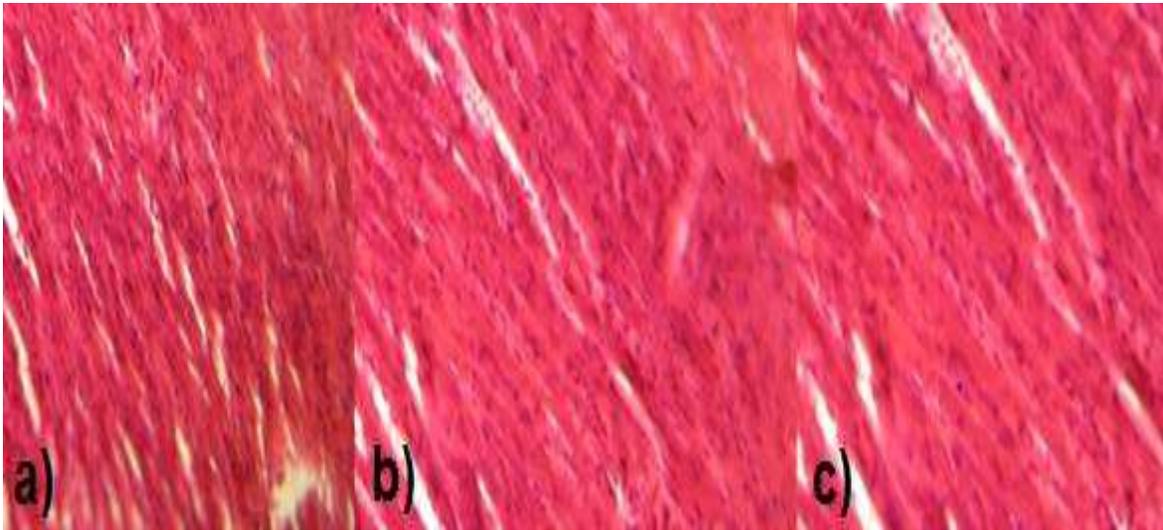


Figura 26 Micrografías del análisis celular del corazón de ratas hembras en Toxicidad sub-crónica

Las imágenes muestran los cortes del corazón (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. No se observan daños en el musculo estriado en las distintas dosis.

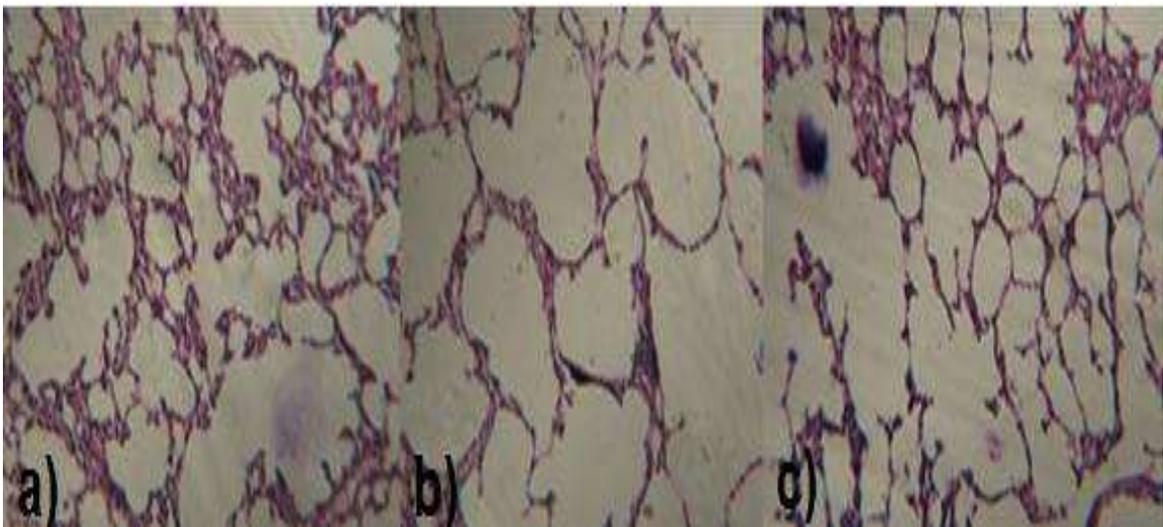


Figura 27 Micrografías del análisis celular del pulmón de ratas macho en Toxicidad sub-crónica

Las imágenes muestran los cortes del pulmón (100X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. En las distintas dosis se puede observar un ligero proceso de congestión

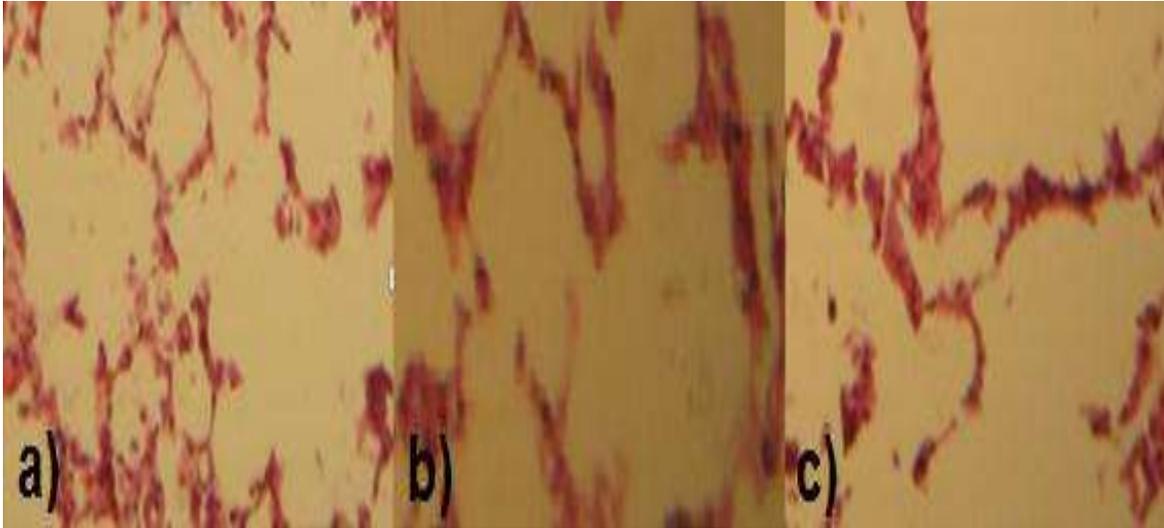


Figura 28 Micrografías del análisis celular del pulmón de ratas hembras en Toxicidad subcrónica.

Las imágenes muestran los cortes del pulmón (10X) de los grupos correspondientes; a) Solución salina 0.9%, b) 1000 mg/kg, c) 5000 mg/kg. En las distintas dosis se puede observar un ligero proceso de congestión.

IX DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis tuvo como objetivo analizar la toxicidad aguda y subcrónica de los extractos de las hojas de berro (*Nasturtium officinale*) administrando por vía oral. El berro es una planta que tiene un papel importante en el uso de la medicina tradicional por lo cual se han realizado algunos estudios de investigación como es la determinación de la vitamina C (Rui, 2006), comprobación del efecto cicatrizante de los extractos hidroalcohólicos de berro (*Nasturtium officinale*) (Redrobán, 2012) principalmente sobre el efecto hipoglucemiante (Giner, 2003; Castro, 2014), pero no existe ningún trabajo reportado acerca de la toxicidad por lo que el presente trabajo de investigación es el primer reporte de éste tipo.

Este trabajo se basa en los ensayos de toxicidad de acuerdo a la OECD 420 y 407. La norma 420 trata sobre toxicidad de una sola administración, y se usa un lote de 6 ratas por cada dosis analizadas, las cuales fueron de 5, 50, 500, 2000 y 5000 mg/Kg de peso corporal, y la norma 407 trata de la administración de dosis repetidas durante 28 días, las dosis usadas en este ensayo fue de 1000 y 5000 mg/Kg de peso corporal. Las ratas utilizadas son de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 350 gramos. La administración fue por medio de una sonda gástrica a la misma hora y el volumen era de 1ml/100gr de peso corporal. Se considera la administración a una dosis de 5000 mg/Kg ya que una vez que si no se encuentran efectos la sustancias se clasifica en la categoría 5 de la SGA (Sistema Globalmente Armonizado) que corresponde a las mezclas que tienen una toxicidad aguda o es relativamente baja o nula (SGA, 2005).

En el presente trabajo primero se evalúa la toxicidad aguda de los extracto de las hojas de berro (*Nasturtium officinale*).

Durante el tiempo de la prueba a todos los animales en las distintas dosis se les registro el peso corporal, el cual se realiza una vez cada semana. Este parámetro es uno de los indicadores más sensibles de la condición de un animal

si es supervisado con frecuencia y cuidadosamente durante el estudio (Wilson y col, 2001). En el ensayo se observa como el peso sube constantemente desde el inicio hasta el final en las distintas dosis. Este aumento es algo que se espera debido a que las ratas eran jóvenes y al crecer van adquiriendo un mayor tamaño y por ende un mayor peso. Una pérdida rápida de peso corporal suele ser un indicador de mala salud causando incluso la muerte. Cuando es una pérdida rápida de peso puede deberse a una disminución de la alimentación, del agua, enfermedad o el efecto tóxico específico (Wilson y col, 2001).

En ensayos de toxicidad aguda se mide la temperatura con la finalidad de descartar que el extracto contenga algún compuesto pirógeno. Estas mediciones son durante las primeras 4 horas. Al realizar la medición se observa como la temperatura varía hasta 1 grado; cuando se presenta esta variación se considera fiebre (Barrios, 2010); sin embargo, las ratas del grupo control también tienen las mismas variaciones de temperatura por lo que podemos decir que el extracto no es el causante de la fiebre.

Durante el inicio del ensayo hasta el día final los animales se mantienen en constante observación para registrar cualquier cambio físico, como es en la piel, las mucosas, excreciones y secreciones, de igual manera es importante registrar los cambios en la marcha, en la postura, cambios de la pupila y comportamientos anómalos; estos son consecuencia de algún daño a nivel cerebral (Krieger, 2010). Nuestros animales no presentaron ningún cambio conductual considerándose como el primer parámetro para poder decir que el extracto no es tóxico. Las observaciones se realizaron prestando mayor atención las primeras cuatro horas, ya que es dosis única los efectos suelen manifestarse inmediatamente o pocas horas después, y a continuación se realizaban a diario durante los 14 días para descartar un efecto tardío.

Una vez terminada la prueba todos los animales fueron sacrificados para realizar un estudio macroscópico y microscópico de los órganos, siguiendo las recomendaciones de la norma oficial mexicana NOM - 062, así como registrar el peso de los mismos. También se extrajo la sangre por medio de punción cardiaca

la cual se recolecto en dos tubos, uno con anticoagulante que se utiliza para una hematología, y el otro tubo sin anticoagulante de manera que podamos separar el suero que es utilizado para realizar una bioquímica clínica. Cabe mencionar que la eutanasia se realizó en cámara de inducción con cloroformo. En el artículo "*Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del cloroformo*" (INSH, 2007) se realiza un estudio de toxicidad el cual menciona que una dosis única usada en eutanasia no ocasiona daños tóxicos, esto nos da la seguridad de que el químico de la eutanasia no intervendrá en los resultados obtenidos.

Durante la necropsia se observó que los órganos estaban en buen estado, fuera de cualquiera anomalía, daño o lesión, esto se realiza ya que en el caso de encontrar un daño en algún órgano lo podemos clasificar como un órgano diana y se da más importancia para el estudio microscópico. Otro parámetro es la medición del peso del órgano ya que un aumento o disminución de estos es consecuencia de una patología.

La bioquímica clínica se realiza con el propósito de obtener información para la prevención, diagnóstico y el tratamiento de enfermedades, y tiene una gran importancia para evaluar el funcionamiento del hígado y del riñón. En nuestro ensayo no se observa ningún parámetro que esté fuera de los rangos comparados con en el grupo control. Las enzimas ALT, AST Y FA son enzimas que se encuentran en el citosol de los hepatocitos y se liberan al dañarse la membrana celular, por lo tanto son indicadoras de un daño hepatotóxico. En un episodio agudo de hepatotóxicidad las enzimas se elevan en sangre después de 1 hora dependiendo de la lesión, su actividad alcanza su punto máximo 1 o 2 horas y enseguida se disminuyen. Los estudios agudos diseñados de manera que las pruebas de patología clínica son de 14 días después de una administración única de material de ensayo, es probable que cambie la cantidad de enzimas en suero, incluso si el ensayo es marcado como hepatotóxico (Fannel, 2006). Lo que ocurriría si se tratara de un compuesto nivel 1 (tabla 3), como se describió en la

sección 3.8.1.2 pp 41. Debido a que no se observó mortalidad se siguió la norma descrita 14 días después (OECD 420).

Para detectar un daño nefrotóxico se requiere de los analitos de urea y creatinina, dos moléculas que se encuentran principalmente en el glomérulo, cuando este es dañado libera la urea y creatinina manifestándose en niveles altos en suero (Albarado, 2003; Grenvik, 2000). Al realizar la bioquímica de las ratas tratadas de forma aguda no se ven alteradas las enzimas hepáticas ni la urea ni la creatinina por lo que podemos descartar la posibilidad de algún daño en estos órganos, para confirmar se realiza el ensayo de histopatología.

Se realizan pruebas de hematología para evaluar la función hematopoyética. La hematopoyesis es el proceso de la formación de las células de la sangre como son los eritrocitos, leucocitos y trombocitos (Gad, 2007). En nuestro ensayo los valores de las distintas dosis están dentro de los valores referenciados con el grupo control por lo que podemos decir que no hay daño inmunotóxico. Los eritrocitos ayudan a estimular el sistema inmunológico y las plaquetas ayudan a proteger los vasos sanguíneos del daño endotelial, así como iniciar la reparación de estos vasos, por lo tanto, sugiere una fuerte actividad inmunomoduladora, antioxidante y de protección endotelial (Welsch, 2006; Arderiu, 2008).

La histopatología es el último paso para confirmar si un compuesto es tóxico o no lo es. En los parámetros analizados como fueron evaluaciones físicas, estudios de bioquímica clínica y hematología no se encontraron anomalías que den un diagnóstico de intoxicación por lo que se espera que al hacer el estudio microscópicamente no encontremos una alteración. Al observar los cortes de los tejidos de cada órgano que se recolecto se observa que no existe ningún daño a nivel celular, resultado ya mencionado que se esperaba. Los principales órganos en un ensayo de toxicidad es el hígado y el riñón, en el hígado se observa que todos los hepatocitos se encuentran en perfecto estado mostrando su núcleo centrado, en el riñón se observan las nefronas sin daño de autólisis al igual que en los túbulos proximales. Durante el estudio macroscópico se observa en el pulmón

un aparente proceso de congestión motivo por el cual se da la importancia para el estudio celular, en el que se confirma que efectivamente es un proseo congestivo, esto no es un daño a causa del extracto, ya que fue ocasionado por las condiciones húmedas del habiente.

Una vez realizada la prueba de toxicidad aguda se continuó con la realización del ensayo de toxicidad sub-crónica basado en la OECD-407, este se realizó en ratas macho y ratas hembras.

Un ensayo de toxicidad sub-crónico proporciona información sobre los posibles peligros que pueden aparecer durante una exposición repetida durante un período de tiempo, incluyendo los efectos sobre el sistema nervioso, inmunológico y endocrino. También puede proporcionar datos sobre los productos químicos que afectan a los órganos reproductores masculinos y/o femeninos, y pueden dar una indicación de los efectos inmunológicos (OECD, 2008).

En el ensayo de toxicidad sub-crónica se evalúa el peso corporal durante 4 semanas realizando la medición una vez cada semana. Las mediciones en nuestras ratas del ensayo se observa como el peso aumenta constantemente en las dosis analizadas durante los 28 días. Esto nos dice que durante este tiempo los animales no padecieron de alguna enfermedad o en todo caso el componente no afecto la fisiología al administrar el extracto en dosis repetida.

Se realizan observaciones clínicas generales por lo menos una vez al día y a la misma hora. Los principales signos que se observan son cambios en la piel, el pelo, los ojos, las membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala), cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de movimientos clónicos o tónicos, y estereotipias (por ejemplo, preparación excesiva, recorridos circulares repetitivos) o comportamientos extraños (por ejemplo, automutilación, marcha hacia atrás). En la cuarta semana se realizan exámenes sensoriales frente a estímulos de distintos tipos como auditivos, visuales y propioceptivos, fuerza de prensión y actividad motriz. Al

realizar dichas observaciones no se observaron cambios en los animales del ensayo, lo que indica que la muestra no presenta ningún efecto tóxico o perjudicial para la salud de los animales.

Al concluir el ensayo se sacrifican los animales para realizar el estudio macroscópico y microscópico, anterior a esto por medio de punción cardiaca se obtiene una muestra de sangre para pruebas de bioquímica clínica y de hematología

Durante la necropsia se pesaron los órganos y se observó que mantenían un peso igual o similar al del grupo control lo que ayuda a descartar una patología en un órgano específico. Junto con esto se examinaron los órganos notándose que estaban libres de cualquier absceso, presencia de pus, derrame o coloraciones fuera de lo normal.

Al realizar la bioquímica clínica se observa que los datos están dentro del valor indicado comparado con los datos de las ratas del grupo control. La urea y la creatinina al estar en rangos adecuados nos dice que no hay daño en los riñones y por lo tanto la muestra no es nefrotóxica. Para ver la capacidad hepatotóxica se requieren las enzimas ALT, AST Y FA, y en el ensayo encontramos a la AST en concentraciones altas en la dosis de 5000 mg/Kg en hembras; a pesar de la elevación de la enzima y siendo que es indicadora de daño hepático, no podemos considerar que se está presentando un daño tóxico ya que estas enzimas por sí solas no se consideran indicativas y se requiere que todas las enzimas muestren una alteración ya que actúan en conjunto. Y solo para descartar completamente un daño se realiza la histopatología del hígado

En el examen de hematología solo encontramos una variación en el parámetro de hematocrito (HCT). Como ya se mencionó, un examen de hematología nos ayuda principalmente para observar algún daño a nivel de la hematopoyesis pero también podemos encontrar algún dato para otra patología, al estar el hematocrito en concentraciones altas se puede correlacionar como consecuencia de la congestión que se presenta en pulmones; este daño pulmonar

está en todas las ratas de estudio por lo que no se le atribuye esta elevación a la congestión. El motivo de que solo se eleve el HCT en la dosis de 5000 mg/Kg en ratas macho y no en las demás con daño pulmonar puede ser a que el HCT también se eleva por cardiopatías, deshidratación, cicatrización entre otras y por lo tanto este grupo de ratas posiblemente tenían una deshidratación o sufrieron un daño en el corazón ocasionado al momento de realizar la punción cardiaca.

En el estudio histológico se confirma la ausencia de algún daño a nivel celular ya que no se encontró alteración en los órganos. El único órgano que presenta anomalías es el pulmón. En el estudio de toxicidad aguda se presentó el mismo problema y nos dimos cuenta que era un daño congestivo, al realizar la histopatología del pulmón para el ensayo sub-crónico, encontramos que de igual manera era una congestión pulmonar, lo que podemos descartar con mayor seguridad un efecto toxico a causa al extracto de berro.

Se analizaron distintas dosis de extracto de las hojas de berro (*Nasturtium officinale*) en los ensayos de toxicidad aguda y sub-crónica, la dosis más alta fue de 5000mg/Kg de peso corporal, no presentándose signos conductuales, los parámetros bioquímicos y de hematología resultaron normales y por último en el estudio de histopatología los tejidos estaban dentro de lo normal, por lo que determinamos que el extracto es “no toxico” y se clasifica en la categoría 5 de la SGA que corresponde a las mezclas que tienen una toxicidad aguda relativamente baja o nula. Por lo tanto podemos afirmar que el extracto de hojas de berro (*Nasturtium officinale*) es un medicamento herbolario completamente seguro para su consumo.

X CONCLUSIONES

- El extracto de las hojas de berro (*Nasturtium officinale*) no provocó cambios conductuales en ninguna de las dosis analizadas
- Los parámetros de hematología y bioquímica clínica en los animales con las distintas dosis analizadas presentaron intervalos iguales a los animales del grupo control (Solución salina 0.9%)
- En los órganos utilizados para el estudio histopatológico, no presentaron daño a nivel celular, así como sin alteraciones en la estructura funcional de cada órgano
- El extracto de berro (*Nasturtium officinale*) se clasifica en la categoría 5 según la SGA (Sistema Globalmente Aceptado para la Clasificación de Sustancias y Mezclas Químicas) y se determina como “no tóxico”

XI PERSPECTIVAS

- Analizar la toxicidad crónica (3 a 12 meses) del extracto de las hojas de berro (*Nasturtiu officinale*).
- Realizar ensayos de toxicidad con la fracción sin pigmentos y con pigmentos del berro (*Nasturtium officinale*)
- Realizar ensayos de Carcinogénesis, teratogenia, fertilidad y de mutagénesis

XII REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abdul, M.M. 2011. Selected medicinal plants of chittagong hill tracts. Bangladesh: International Union for Conservation of Nature (IUCN) 2(21): 12-14.
- Abubakar, A., Ogbadoyi, E. O., Okogun, J. I., Gbodi, T. I., Tifin, U. F. 2012. Acute And Sub Chronic Toxicity Of *Tridax procumbens* In Experimental Animals. Journal Of enviromental Ciences, Toxicology and food. Tecnology1(6): 19–27.
- Aédo, F.J, Granados, J.C. 2000. La medicina complementaria en el mundo. Revista Mexicana de Medicina Física y Rehabilitación. 12: 91-99.
- Asadi, M. S., Mirvaghefi, A. R., Nematollahi, M. A., Banaee, M., Ahmadi, K. 2012. Effects of Watercress (*Nasturtium nasturtium*) extract on selected immunological parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Open Veterinaria Journal 2: 32–39.
- Barker, D. J. 2009. Pacific Northwest Aquatic Invasive Species Profile :U.S.A: *Nasturtium officinale*. 395: 2-8
- Bello, G.J.,López, S. A. Fundamentos de ciencia toxicológica.: DIAZ de SANTOS. España. 2001. 3-4
- Bulgheroni, A., Kinsner-Ovaskainen, A., Hoffmann, S., Hartung, T., Prieto, P. 2009. Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology : RTP. 53(1): 16–9.
- Briz, T.; Briz, Escribano, J. Las plantas medicinales de Perú. Perú: CATARATA. 2020. 33-50.
- Calderón, C. A., Guzmán, G. M., Sarmiento, J. C., Gómez, D. L., Joya, A. Y., Ríos, L. F., Soler, J. N. 2010. Nefrotoxicidad inducida por medicamentos, 24(1): 65–85.
- Vázquez, V.L. 2008. Efecto de las Soluciones Nutritivas y Sombreo en la Producción y calidad del Berro . Hidropónico en la Sierra Norte de Oaxaca.

Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional CIIDIR-IPN Unidad Oaxaca. Mexico. 4-20

- Coolborn, A. F., Bolatito, B., Clement, A. F. 2012. Study of Acute and Sub Chronic Toxicity of *Spathodea campanulata*. P Beav Leaf, 41(76): 76–80.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos. 2002. Fundación Española de Ciencia y Tecnología. 404(8): 1–15.
- Cosme, P. I. 2008. El uso de las plantas medicinales. Revista intercultural. 17(32): 23–26.
- Cruz, R. M. S., Vieira, M. C., Silva, C. L. M. 2004. Effect of heat and thermosonication treatments on watercress (*Nasturtium officinale*) vitamin C degradation kinetics. 3-6
- Deribe, K. Amberbir, A. Getachew, B. Mussema, Y. 2006. A historical overview of traditional medicine practices. Ethiop.J.Health Dev. 20(2): 127-134
- Diallo, A., Eklugadegkeku, K., Aklikokou, K., Creppy, E. E. 2010. Acute and Sub-chronic (28-day) Oral Toxicity Studies of Hydroalcohol Leaf Extract of *Ageratum conyzoides* L (*Asteraceae*). Tropical Journal of pharmaceutical Research october. 9: 463–467.
- Duke, J.A., Godwin, M.J.B., DuCellier, J., Duke, P.A.K., Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press. E.E.U.U. 2002. 7(23): 234-239
- Ellingson, D. Matthew, K. God's Healing Herbs. Ladach. E.E.U.U. 2010
- Asociación española de toxicología. 2003. Toxicología. 20(2): 101-123
- Fennel, JFM. Potential for Watercress Production in Australia Australia: Rural Industries Research and Development Corporation. Australia. 2006. 13-29
- Figueroa, J. L. 2009. Reflexiones Respecto a Plantas Medicinales y su Enseñanza En Medicina. Revista Digital Universitaria. 10(9): 2-12
- Gad, S., Gruenwald, J., Brendler, T., Jacnicke, C.C. Animal Models in Toxicology. Taylor and Francis Group. 2007. 420-510
- Gruenwald, J., T., Jacnicke, C. PDR for Herbal Medicines. Compañy ME. U.S.A.. Thomson. 2000. 123-143

- González, O., Carrillo, M., Médico, P., Aguilera, S., Diplomada, G. del tratamiento farmacológico de la diabetes mellitus tipo 2. IT del Sistema Nacional de Salud. 2008. 32(1): 3-16
- Halim, S. Z., Abdullah, N. R., Afzan, A., Rashid, B. A. A., Jantan, I., Ismail, Z. 2011. Acute toxicity study of *Carica papaya* leaf extract in Sprague Dawley rats. *Journal of Medicinal Plants Research* . 5(20): 1867–1872.
- Hau, J., Hoosier, G. L. *Handbook of Laboratory Animal*. CRC PRESS. E.E.U.U. 2002. 85-107.
- Hood, R.D. *Developmental and Reproductive Toxicology*. Taylor and Francis Group. 2006. 90 -98
- Hodgson, E. A. *Textbook of Modern Toxicology*. Wiley-Interscience. E.E.U.U. 2004. 154-189
- Hortola D. *Farmacología para fitoterapeutas*. Panamericana. Madrid. 2008. 322-367
- Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. (2007) Documentación toxicológica para el establecimiento del límite de exposición profesional del cloroformo. 26: 1-3
- Kassaye, K. D., Amberbir, A., Getachew, B., Mussema, Y. (2006). A historical overview of traditional medicine practices and policy in Ethiopia. *Ethiop. T. Health Dev.* 20(2): 2-6
- Kendrick T, Drost D. *Watercress in the Garden*. Utah State University. 2008. 3: 6-9
- López, M. T. 2006. Plantas medicinales con actividad hipoglucemiante. *Ambito Farmacéutico-Fitoterapia*, 25(5): 82-88.
- Lewington, A. 1993. *Medical Plants and Plant Extracts*. Inglaterra Traffic International. 6(23): 21-33
- López, S. M. 2012. *Manual de Plantas Medicinas Paragüines Ecuatorial*. España: Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID). 22(8): 34-45
- Leonard, E. M., Wood, C. M. 2013. Acute toxicity, critical body residues, Michaelis-Menten analysis of bioaccumulation, and ionoregulatory

disturbance in response to waterborne nickel in four invertebrates: *Chironomus riparius*, *Lymnaea stagnalis*, *Lumbriculus variegatus* and *Daphnia pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology*. 158(1), 10–21.

- Luján, C. G., Estela, B., Hernández, P., Romero, A. M., Barraza, F. C. 2009. El Control Glucémico De La Diabetes. *Revista Chapingo Serie Zonas Aridas*. 8: 229–239.
- Malgor, L.A ., Valsecia M.E. *Farmacometria: Caracterización de los efectos de las drogas. Factores que modifican la acción de las drogas*. México. 2009. 49-56
- Marinoff, M, A.(2006). Las plantas medicinales desde la Biblia a la actualidad [Resumen]. *Comunicaciones Científicas y Tecnológicas*: E-053
- Mason, R. (2012). *Lower Cholesterol Without Drugs a Practical Guide to Using Diet*. International published medical research. 12-76
- Medina, M. F., Francisco, D., Arrebola, A., López, Y., Rivero, D. D., Rodríguez, S. S., Bourzac, I. 2003. Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay . *Retel*. 31: 40–54.
- Schloithe, A.C., Woods, C.M., Sacone, T.P. 2011. An Isloted rat pancreas preparation for studying pancreatic spinal mechanosensitive and chemosensitive afferent activity.
- Fuentes, F.M., Mendoza, R.A., Rosales, A.L., Cisneros, R.A. 2008. *GUÍA DE Manejo y Cuidado de Animales de Laboratorio*. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.7-47
- Mwale, M. Masika, P.J. 2012. Toxicological studies on the leaf extract of *Aloe ferox* Mill. (Aloaceae). *Scientific Research and Essay*, 7(15): 1605-1613
- Peña, E., Font, G., 2003. Órgano Oficial de la Asociación Española de Toxicología. *Revista de Toxicología*, 20 (2) , 59-152
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. *Guideline for the Testing of Chemicals 420 on Acute Oral Toxicity – Fixed*

- Dose Procedure. Paris, France. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL420.pdf
- United Nations Industrial Development Organization, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2005). Herbs, spices and essential oils. Vieba. 11-36
 - Patiño, N. M., Rodríguez, J. D. L., Figueroa, J. L. 2002. Herbolaria. Diccionario de especialidades Farmacéuticas. Actualidades Farmacológicas. Departamentos de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. 2-3
 - Peña, A., Paco, O., Skrabanek, P. 2007. Medicina alternativa : intento de análisis Anales de la Facultad de Medicina. 68(1): 87–96.
 - Property, I. 2008. Intellectual Property and Traditional medical knowledge. World Intellectual Property Organization. (134): 1–4.
 - Quesada, H.A. 2008. Las plantas medicinales. Revista Biocenosis. 21(1-2): 20-23.
 - Redrobán, K. F. 2012. Comprobación del Efecto Cicatrizante de los Extractos Hidroalcohólicos De Berro (*Nasturium officinale*) y Llantén (*Plantago major*) en ratones (*Mus musculus*). Tesis de grado. Tesis de Licenciatura inédita. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. 22.32
 - Sociedad Española de Fitoterapia. 2003. Fitoterapia y diabetes. Fitoterapia. 3(2): 113-122.
 - Social, S. 2006. fitomedicamentos entre médicos del segundo nivel de atención. Centro de Investigación Biomedica de Sur, IMSS. 45(5): 453–458.
 - Tan, A. S.C. 2001. A rapid and reliable 7-deletion multiplex polymerase chain reaction assay for alpha -thalassemia. Blood, Med. J. Malaysia 98(1): 250–251.
 - Tarkang, P.A., Agbor, G.A., Rachel, T.L., David, K, Mengue, Y.S. 2012. Acute and Chronic Toxicity Studies of the aqueous and ethanol leaf extracts of *Carica papaya Linn* in Wistar rats. Scholars Research Library, 2(5): 617-627.

- UNECE. 2000. Parte 3-peligros para la salud [Versión Electrónica].México:(. Recuperado el 14 de Septiembre de 2014 de: http://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev00/Spanish/GHS-Part3-Spanish.pdf
- Universidad Juarez Autonoma Tabasco (2010).Manual para el manejo de animales con fines de experimentación y enseñanza [Versión electrónica].México: División Academia de Ciencias Biológicas. Recumerado el 10 de Septiembre de 2014 de: http://www.archivos.ujat.mx/dacbiol/docencia/lineamientos/manejo_animales.pdf
- Muñoz, J.J, Saldivar, S., Maldonado, C.C., Muñoz, C.Y., Moreno, M.A. 2011. La habilidad para sujetar y manejar laboratorio no se adquiere fácilmente animales de laboratorio, 12: 1–11.
- World Health Organization (2007). WHO monographs on selected medicinal plants. Canada: WHO Library Cataloguing-in-Publication Data
- Word Health Organization WHO. Traditional Medicine Strategy 2014-2023. Suiza. 2014. 24-34
- Williams, P.H., James, R. C. 2000. Principles of Toxicology Environmental and Industrial Edited by. U.S.A: A Wiley-International Publication: 111-12