



Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo



FACULTAD DE QUÍMICO
FARMACOBIOLOGÍA

Evaluación de la toxicidad oral aguda de un extracto polifenólico de *Quercus crassifolia* en ratas Wistar

TESIS

Para obtener el título de
Químico Farmacobiólogo.

Presenta:

PQFB. Leonardo Iván Ignacio Figueroa

Directora:

D.C. Martha Estrella García Pérez

Morelia, Michoacán, México. Septiembre, 2017

Dedicatoria:

La presente investigación está dedicada a mi familia.

A mi padre, por ese esfuerzo y apoyo constante, por el apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de todo este tiempo para cumplir las metas que me he propuesto, dándome herramientas para superarme.

A mi madre, por guiarme en el camino correcto de la vida, por sus palabras, sus consejos.

A mis hermanas, porque sin juzgar ni criticar, siempre están al pendiente de mí y de mis planes.

Agradecimientos:

A mi asesora DC Martha Estrella García Pérez a quien admiro mucho. Gracias por creer en mí, por estar siempre pendiente de mi trabajo. Gracias por su apoyo y dedicación, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación, pero sobre todo, gracias por ser un ejemplo de inspiración como persona y como profesionalista.

Al DC Héctor Martínez por permitirme desarrollar la investigación en el Laboratorio de Investigación de Alimentos de la Facultad de Químico Farmacología.

A la MC Eréndira Valencia Avilés, gracias por la paciencia y los conocimientos brindados, por permitirme ser parte de su proyecto.

A mis sinodales, por tomarse el tiempo para evaluar esta investigación. Gracias por su dedicación e interés.

A todos los Profesores que han sido parte de mi crecimiento profesional, a los Químicos que han compartido su conocimiento.

A mi padre Rodolfo Ignacio Barbosa por apoyarme a cumplir mis metas, por hacer lo posible para darme lo que ha estado en sus posibilidades para cumplir este objetivo.

A mi madre Tulia Figueroa Flores. Gracias por el apoyo, cariño, confianza e inspiración, gracias porque tus palabras y tu presencia me dan la fortaleza para seguir superándome.

A mis hermanas Esmeralda Nohemy Ignacio Figueroa y Perla Ivonne Ignacio Figueroa. porque sé que a pesar de la distancia, siempre puedo contar con ustedes y a mis amigos. Gracias por coincidir, por formar parte de mi vida.

Título: Evaluación de la toxicidad oral aguda de un extracto polifenólico de Quercus crassifolia en ratas Wistar

ÍNDICE

Glosario:.....	1
Resumen:.....	4
Abstract:.....	6
1. INTRODUCCIÓN.....	7
2. MARCO TEÓRICO.....	10
2.1 EL DESARROLLO FARMACÉUTICO.....	10
2.1.1 Fases del desarrollo farmacéutico	12
2.1.2 Importancia de la toxicología preclínica para el desarrollo farmacéutico	16
2.1.3 Métodos toxicológicos experimentales regulados.....	16
2.1.4 Toxicidad aguda: pruebas clásicas y alternativas.....	22
2.1.5 Metabolitos de plantas y desarrollo farmacéutico en la actualidad	26
2.2 LA PSORIASIS	28
2.2.1 Clasificación de la psoriasis.....	29
2.2.2 Severidad de la psoriasis.....	33
2.2.3 Tratamientos antipsoriásicos actuales	34
2.2.4 Tratamientos antipsoriásicos en fase de desarrollo	36
2.2.5 Importancia del desarrollo farmacéutico en la psoriasis	37
2.3 LOS POLIFENOLES.....	40
2.3.1 Clasificación.....	41
2.3.2 Vías biosintéticas para los polifenoles en las plantas	44
2.3.3 Métodos de extracción y purificación de polifenoles	45
2.3.4 Polifenoles estudiados para el tratamiento de la psoriasis	49
2.4 EL GÉNERO QUERCUS	50
2.4.1 Distribución del género Quercus en México	50
2.4.2 Importancia medicinal de las especies del género Quercus	54
2.4.2 Polifenoles identificados dentro del género Quercus	55
2.4.4 Estudios toxicológicos realizados a polifenoles del género Quercus	56
3. JUSTIFICACIÓN	57

4.	HIPÓTESIS	59
5.	OBJETIVO GENERAL.....	59
6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	59
7.	METODOLOGÍA.....	60
7.1	COLECTA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS CORTEZAS DE QUERCUS CRASSIFOLIA	60
7.2	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO AL AGUA CALIENTE	60
7.3	PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO BRUTO	61
7.4	ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA POR EL MÉTODO DE CLASES DE TOXICIDAD	61
7.4.1	Especie animal.....	61
7.4.2	Unidades experimentales y selección de las dosis	62
7.4.4	Período y vía de exposición	62
7.4.5	Procedimiento experimental	62
7.4.6	Sacrificio de los animales	62
7.4.7	Análisis macroscópico e histopatológico.....	63
7.4.8	Determinaciones bioquímicas y hematológicas	63
8.	RESULTADOS	64
8.1	COLECTA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS CORTEZAS.....	64
8.2	OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO BRUTO Y PURIFICADO	65
8.3	ESTUDIO DE LA TOXICIDAD ORAL AGUDA	66
8.3.1	Registro de alimento consumido y pesos de las ratas	66
8.3.2	Signos de toxicidad, observación macroscópica	67
8.3.3	Análisis histopatológico.....	68
8.3.4	Análisis bioquímico	71
9.	DISCUSIÓN.....	74
10.	CONCLUSIÓN	77
	Bibliografía	78

Índice de tablas:

Tabla 1. Métodos alternativos para determinar toxicidad (Adaptado de [25])	24
Tabla 2. Clasificación clínica de la psoriasis (Adaptado de [35]).....	29
Tabla 3. Clasificación de la psoriasis según su gravedad (Adaptado de [4])	34
Tabla 4. Tratamientos antipsoriásicos actuales (Adaptado de [5])	35
Tabla 5. Medicamentos antipsoriásicos en fases de desarrollo (Adaptado de [39])	37
Tabla 6. Número de especies de encinos por subgéneros (especies estudiadas 112) en diferentes regiones geográficas y el país (Tomado de [59]).....	51
Tabla 7. Número de especies endémicas de <i>Quercus</i> por estado (Tomado de [57]).	52
Tabla 8. Padecimientos o enfermedades tratadas con el género <i>Quercus</i> (Tomado de [8])	54
Tabla 9. Rendimiento de los extractos crudo y purificado de <i>Q. crassifolia</i>	65
Tabla 10. Pesos relativos de los órganos de las ratas.	67
Tabla 11. Biometría hemática completa de los grupos de ratas control y de prueba.	71
Tabla 12. Química sanguínea de los grupos de ratas control y de prueba.	72
Tabla 13. Perfil hepático de los grupos de ratas control y de prueba.....	73

Índice de ilustraciones:

Figura 1. Esquema del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (tomado de [11])	11
Figura 2. Aspectos cénicos de la psoriasis (tomado de [36])	31
Figura 3. Familia de los flavonoides (tomado de [9])	42
Figura 4. Estructura de los lignanos (tomado de [9])	43
Figura 5. Corteza recolectada en C. Hidalgo, Michoacán, utilizada en la presente investigación.....	65
Figura 6. Pesos corporales de las ratas Wistar durante la prueba de toxicidad oral aguda.	66
Figura 7. Cantidad de alimento consumido por las ratas Wistar utilizadas para la prueba de toxicidad oral aguda.	67
Figura 8. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración oral del extracto purificado de Q. Crassifolia	69
Figura 9 Análisis histopatológico a nivel encéfalo después de la administración oral del extracto purificado de Q. Crassifolia.....	70

GLOSARIO:

- **Afinidad:** Parecido, relación o analogía de una cosa con otra.
Capacidad de unión del fármaco al receptor.
- **Agallas:** Estructuras de crecimiento anómalo en los tejidos de plantas, debido a la actividad parasítica de otro organismo.
- **Alcaloides:** Sustancia nitrogenada que se encuentra en ciertos vegetales y constituye un estimulante natural; puede ser venenosa y algunas se emplean en terapéutica médica.
- **Antagonista:** Molécula que se une al receptor sin inducir en él la producción de la función a la que está destinado.
- **Antioxidante:** Sustancia que impide la formación de óxidos.
- **Antiproliferativo:** Sustancia que impide la reproducción celular, comúnmente se refiere a sustancias que previene la reproducción de células cancerosas, aunque pueden actuar sobre células normales.
- **Coalescencia:** Propiedad de las cosas para unirse o fundirse.
- **Corticosteroide:** Hormonas denominadas esteroides, que se producen en las glándulas suprarrenales.
- **Destilación:** Proceso por el que la sustancia volátil de una mezcla se separa de otra que no lo es mediante evaporación y posterior condensación de la misma.
- **Diana terapéutica:** Lugar del organismo donde un fármaco ejerce su acción. La mayoría de las dianas terapéuticas son del tipo lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.
- **Disolvente:** Sustancia o líquido capaz de disolver un cuerpo u otra sustancia.
- **Embriotóxico:** Sustancia dañina para un embrión en cualquier sentido.
- **Enantiómero:** Son una clase de estereoisómeros tales que en la pareja de compuestos la molécula de uno es imagen especular de la molécula del otro y no son superponibles.
- **Eritema:** Enrojecimiento de la piel debido al aumento de la sangre contenida en los capilares.

- **Espermatogénesis:**Proceso de formación de las células sexuales masculinas, desde la espermatogonia hasta los espermatozoides.
- **Estrógeno:**Hormona sexual que interviene en la aparición de los caracteres sexuales secundarios femeninos.
- **Estudio anatomopatológico:**Es el estudio de las características de una muestra de tejido, las cuales nos indican que tipo de enfermedad se padece y, en el caso de tumores, si éstos son benignos o malignos.
- **Extracción:**Procedimiento de separación de una sustancia que puede disolverse en dos disolventesno miscibles entre sí, con distinto grado de solubilidad.
- **Fármaco:**Sustancia que sirve para curar o prevenir una enfermedad, para reducir sus efectos sobre el organismo o para aliviar un dolor físico.
- **Farmacovigilancia:** Es un concepto que abarca la observación de todos los efectos que produce un medicamento, tanto benéficos como nocivos.
- **Fertilidad:**Capacidad de un ser vivo de producir lo que el quiere o sustentar una progenie numerosa.
- **Glucósido:**Sustancias que están constituidas por dos tipos de sustancias. Por un lado, un glúcido o azúcar, que generalmente es la glucosa, aunque también puede ser la pentosa u otros.
- **Histamina:**Sustancia química producida naturalmente, contra la que funcionan los medicamentos antihistamínicos.
- **Inmunotóxico:** Sustancia dañina para el sistema inmunológico.
- **Instilación:** Verter un líquido poco a poco o gota a gota.
- **Interleucina:**Término genérico para las citocinas producidas por los leucocitos.
- **La libido:** Deseo de placer, en especial de placer sexual.
- **Linfocitos:** tipo de glóbulos blancos, una parte importante del sistema inmunológico.
- **Medicamento:** Sustancia que sirve para curar o prevenir una enfermedad, para reducir sus efectos sobre el organismo o para aliviar un dolor físico.

- **Miscible:** Propiedad de algunos líquidos para mezclarse en cualquier proporción, formando una disolución.
- **Molécula:** Agrupación definida y ordenada de átomos que constituye la porción más pequeña de una sustancia pura y conserva todas sus propiedades.
- **Estudio multicéntrico:** Estudio clínico que se lleva a cabo en más de una institución médica.
- **Neonatos:** Es un bebé que tiene 28 días o menos desde su nacimiento, bien sea por parto o por cesárea.
- **Neurotoxicidad:** Conjunto de los efectos secundarios de un tratamiento sobre el sistema nervioso, que puede afectar al cerebro o a la médula espinal.
- **Neutrófilo:** Glóbulos blancos de tipo granulocito.
- **Ovogénesis:** Proceso de formación de las células sexuales femeninas, desde la ovogonia hasta el óvulo.
- **Patología:** Enfermedad física o mental que padece una persona.
- **Queratinocitos:** Son las células predominantes (80%-90%) de la epidermis, la capa más superficial de la piel.
- **Superantígeno:** Son proteínas bacterianas y virales con capacidad de estimular gran número de células T; se conjugan con MHC-II de la célula presentadora de antígeno de manera diferente a los antígenos comunes, uniéndose a la subfamilia del V beta del TCR del linfocito T.
- **Terpenos:** Son hidrocarburos complejos de forma general C_nH_{2n-4} , de la serie del isopreno, el que está formado por dos dobles enlaces y que unidos por cadenas orgánicas.
- **Toxicidad:** Es la capacidad de alguna sustancia química de producir efectos perjudiciales sobre un ser vivo, al entrar en contacto con él.
- **Tumefacción:** Hinchazón que se forma en una parte del cuerpo.

RESUMEN:

El desarrollo farmacéutico consiste en un conjunto de estudios que conducen al desarrollo de un nuevo medicamento. Dentro de las etapas más importantes de este proceso se encuentran los estudios toxicológicos. Investigaciones previas han demostrado que las cortezas de especies pertenecientes al género *Quercus* son ricas en polifenoles, los que se han propuesto como candidatos para el tratamiento de la psoriasis, una enfermedad dermatológica incurable que afecta al 2% de la población mundial, para la cual existe un gran interés de la industria farmacéutica en el desarrollo de nuevos productos. A pesar del interés en los polifenoles, estos han sido pobremente estudiados desde el punto de vista toxicológico, lo que limita su utilización para generar tratamientos seguros para esta enfermedad. El objetivo general del presente trabajo de investigación es estudiar los efectos toxicológicos por vía oral de un extracto polifenólico de cortezas de *Quercus crassifolia* en ratas Wistar. Para ello, se realizó la colecta e identificación botánica de cortezas de esta especie en Ciudad Hidalgo, Michoacán. La extracción de las cortezas secas y pulverizadas fue realizada por extracción al agua caliente y posterior purificación por extracción líquido/líquido con acetato de etilo. La toxicidad oral aguda se evaluó según el método de clases de toxicidad propuesto por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) en su guía 423 usando las dosis de 300 y 2000 mg/Kg. Ambas dosis no provocaron mortalidad en los animales del estudio y tampoco se evidenciaron signos de toxicidad a nivel macroscópico en los órganos estudiados. Así mismo, no se observaron cambios significativos en los pesos de las ratas y la cantidad de alimento consumido. Sin embargo, al realizar el estudio histopatológico se observó daño renal y encefálico de moderado a escaso, presentado en forma dosis-dependiente. La biometría hemática demostró un aumento de la hemoglobina corpuscular media y una disminución de amplitud de distribución de glóbulos rojos en el grupo que recibió la dosis más alta con respecto al grupo control. Del mismo modo, se constató una disminución de creatinina, así como una disminución de la fosfatasa alcalina a 2000 mg/Kg. De acuerdo a los resultados obtenidos la sustancia quedaría sin clasificar de acuerdo a la OECD ($DL_{50} > 2000$ mg/kg), aunque los resultados

histopatológicos demuestran que este extracto posee toxicidad intrínseca sobre el riñón y el encéfalo, que debe ser analizada en estudios ulteriores de toxicidad acumulativa, lo que permitiría establecer si el mismo sería prometedor para el desarrollo de un producto farmacéutico orientado al tratamiento de la psoriasis.

Palabras claves: *Quercus crassifolia*, polifenoles, toxicidad, medicamentos, psoriasis

ABSTRACT:

Pharmaceutical development consists in a set of studies that lead to the development of a new drug. Toxicological tests are within the most important investigations included in this process. Previous research has shown that bark of species belonging to the *Quercus* genus are rich in polyphenols, which have been proposed as candidates for the treatment of psoriasis, an incurable dermatological disease affecting 2% of the world population, for which there is a great interest of the pharmaceutical industry in the development of new products. Despite the interest in polyphenols, they have been poorly studied from the toxicological point of view, which limits their use to generate safe treatments for this disease. The aim of this research is to study the oral toxicological effects of a polyphenolic extract of *Quercus crassifolia* bark in Wistar rats. First, the collection and botanical identification of bark of this species was carried out in Ciudad Hidalgo, Michoacán. The extraction of the dried and pulverized bark was performed by hot water extraction with a subsequent purification by liquid/liquid extraction with ethyl acetate. Acute oral toxicity was assessed according to the acute toxic class method proposed by the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) in its Guide 423 using doses of 300 and 2000 mg/Kg. Both doses did not cause mortality and there were no signs of toxicity at the macroscopic level in the studied organs. Likewise, no significant changes were observed in rat weights and the amount of feed consumed. However, the histopathological study showed a renal and encephalic damage, presented in a dose-dependent manner. Hemodynamic biometry showed an increase in mean corpuscular hemoglobin and a decrease in red blood cell distribution amplitude in the group receiving the highest dose compared to the control group. Similarly, it was observed a creatinine and alkaline phosphatase decrease at the high concentration. According to these results, the extract remains "without classification" according to the OECD (LD₅₀ > 2000 mg / kg), although the histopathological results show that it possesses intrinsic toxicity on the kidney and the brain. Later studies of cumulative toxicity should be performed to establish the suitability of this extract as antipsoriatic treatment.

Keywords: *Quercus crassifolia*, polyphenols, toxicity, medications, psoriasis

1. INTRODUCCIÓN

Los medicamentos son desarrollados y elaborados mediante un largo y costoso proceso que tiene como finalidad demostrar mediante diferentes estudios su eficacia, seguridad y calidad con el fin de satisfacer los requisitos exigidos por los organismos regulatorios para poder ser comercializados y administrados a seres humanos[1].

El proceso clásico de desarrollo de un medicamento incluye diversas fases: 1) Fase de descubrimiento; 2) Fase preclínica; 3) Fase clínica; 4) Fase de aprobación y registro y 5) Fase de desarrollo químico farmacéutico[1]. En este esquema clásico el traslado de conocimientos se realiza desde la investigación básica hacia la clínica en un sentido unidireccional.

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta del 1 a 2% de la población mundial[2]. Esta patología produce una reducción significativa en la calidad de vida en los pacientes que la padecen, al punto que su impacto negativo ha sido comparado al que se presenta en enfermos de cáncer, de depresión y de diabetes[3]. La misma afecta a hombres y mujeres por igual, se caracteriza por la aparición de lesiones en la piel mediadas por un incremento significativo de los linfocitos T a nivel de la dermis y la epidermis. Hoy en día sigue siendo desconocida su causa primaria, pero dos componentes principales están presentes a nivel de las lesiones: la hiperproliferación epidérmica y diferenciación anómala del queratinocito, así como la inflamación de la dermis[4].

Existe un gran número de tratamientos antipsoriásicos tópicos y sistémicos aprobados y actualmente utilizados en la terapéutica de esta enfermedad, entre los cuales se encuentran la fototerapia (radiación ultravioleta: ultravioleta A [UVA], ultravioleta B [UVB] o UVB de banda estrecha), fotoquimioterapia (psoralenos + radiación UVA [PUVA], agentes sistémicos clásicos (ciclosporina, metotrexato y acitretino) y los agentes biotecnológicos (efalizumab, etanercept, infliximab y adalimumab) [3]. Sin embargo, su uso prolongado se ha correlacionado con la aparición de efectos tóxicos, falta de eficacia e insatisfacción en los pacientes [5], lo que ha motivado a que la industria farmacéutica esté enfocada en la búsqueda

de nuevos candidatos terapéuticos de origen natural y sintético para el tratamiento de esta enfermedad.

En los últimos años se ha generado un gran interés en el estudio de los compuestos polifenólicos (PF), los cuales son por definición moléculas que presentan un anillo aromático con al menos un grupo hidroxilo, quienes se encuentran omnipresentes en el reino vegetal. Estas moléculas son reconocidas por su remarcable capacidad antioxidante, además de intervenir en vías de señalización implicadas en la inflamación e hiperproliferación de las células cutáneas [6], pudiendo en consecuencia ser una gran alternativa para mejorar la calidad de vida de pacientes enfermos con psoriasis a un costo relativamente accesible.

Los polifenoles se originan principalmente del metabolismo secundario de las plantas, siendo sintetizados en gran medida debido a que las plantas los utilizan como protección ante amenazas externas. Los principales grupos de polifenoles son: ácidos fenólicos, estilbenos, lignanos, alcoholes fenólicos y flavonoides. La biosíntesis de los PF tiene lugar en dos rutas importantes: la ruta del ácido siquímico y la ruta de los poliacetatos [7].

Los árboles presentan altas concentraciones de compuestos fenólicos, destacándose dentro de ellos aquellos pertenecientes al género *Quercus*[6][39]. Este género es de gran importancia para México, ya que en el país existen 86 especies endémicas, constituyendo un importante centro de biodiversidad a nivel mundial [8]. Estudios recientes realizados en nuestro equipo de investigación han demostrado que el extracto polifenólico purificado de cortezas de *Quercus crassifolia* posee una remarcable capacidad antioxidante, incluso superior a la demostrada por el extracto comercial Oligopin® [9], lo que lo convierte en un candidato terapéutico interesante a ser explorado desde el punto de vista toxicológico y farmacológico para el tratamiento de la psoriasis.

Tomando en cuenta todos estos factores, la presente investigación tiene como objetivo global estudiar la toxicidad oral aguda del extracto purificado obtenido a

partir de las cortezas de *Quercus crassifolia* en ratas Wistar, utilizando el método de clases de toxicidad.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 EL DESARROLLO FARMACÉUTICO

La llamada “explosión terapéutica” que se originó después de la Segunda Guerra Mundial, fue un parteaguas para encontrar la cura a diversas enfermedades que hasta ese momento se encontraban sin tratamiento. A raíz de esto se originaron muchos problemas relacionados con la eficacia y seguridad de estos medicamentos, debido a la falta de control y conocimiento de los problemas que podrían ocasionar se permitió la comercialización de muchos fármacos ineficaces y de muchos otros que eran muy perjudiciales para la salud provocando verdaderas tragedias [10].

Uno de los casos más conocidos por la historia fue el de la Talidomida, comercializado como sedante y calmante de náuseas en el embarazo, que debido a uno de sus enantiómeros generó malformaciones en neonatos. A partir de este momento se creó una preocupación entre las autoridades sanitarias de todo el mundo que desembocó en una mayor profundización de los estudios toxicológicos para todas las moléculas candidatas a convertirse en medicamentos. En efecto, un nuevo fármaco debe someterse a diversos estudios que comprueben su relación beneficio-riesgo, entendiéndose como tal a la contraposición de los riesgos potenciales y los beneficios para el paciente después del análisis de su eficacia y toxicidad y el resultado a esperar si no se administra [10]. Para evaluar esta relación es necesario considerar que el uso de un medicamento en la práctica clínica solo se justifica si los posibles beneficios superan a los riesgos potenciales, lo que se determina en base al conocimiento de la enfermedad, la historia del paciente, las características del fármaco y sus efectos adversos. De toda evidencia, para tal evaluación, el fármaco en cuestión debe seguir múltiples etapas dentro de su desarrollo con el objetivo de poder emplearse adecuadamente en seres humanos.

Una visión convencional de este proceso implica varias etapas: a) el establecimiento de hipótesis relacionadas con la patogénesis de la enfermedad; b) la identificación de dianas farmacológicas; c) la selección de moléculas capaces

de interactuar con las dianas (hits); d) la optimización química de los compuestos seleccionados (leads); e) las pruebas preclínicas en animales de experimentación; f) la evaluación de la seguridad en seres humanos y el establecimiento de las propiedades farmacocinéticas (fase I); g) las pruebas de eficacia en pequeños grupos de pacientes (prueba de concepto; fase II) y finalmente f) los ensayos clínicos multicéntricos a mayor escala para evaluar la seguridad y eficacia (fase III) (Fig.1) [5].

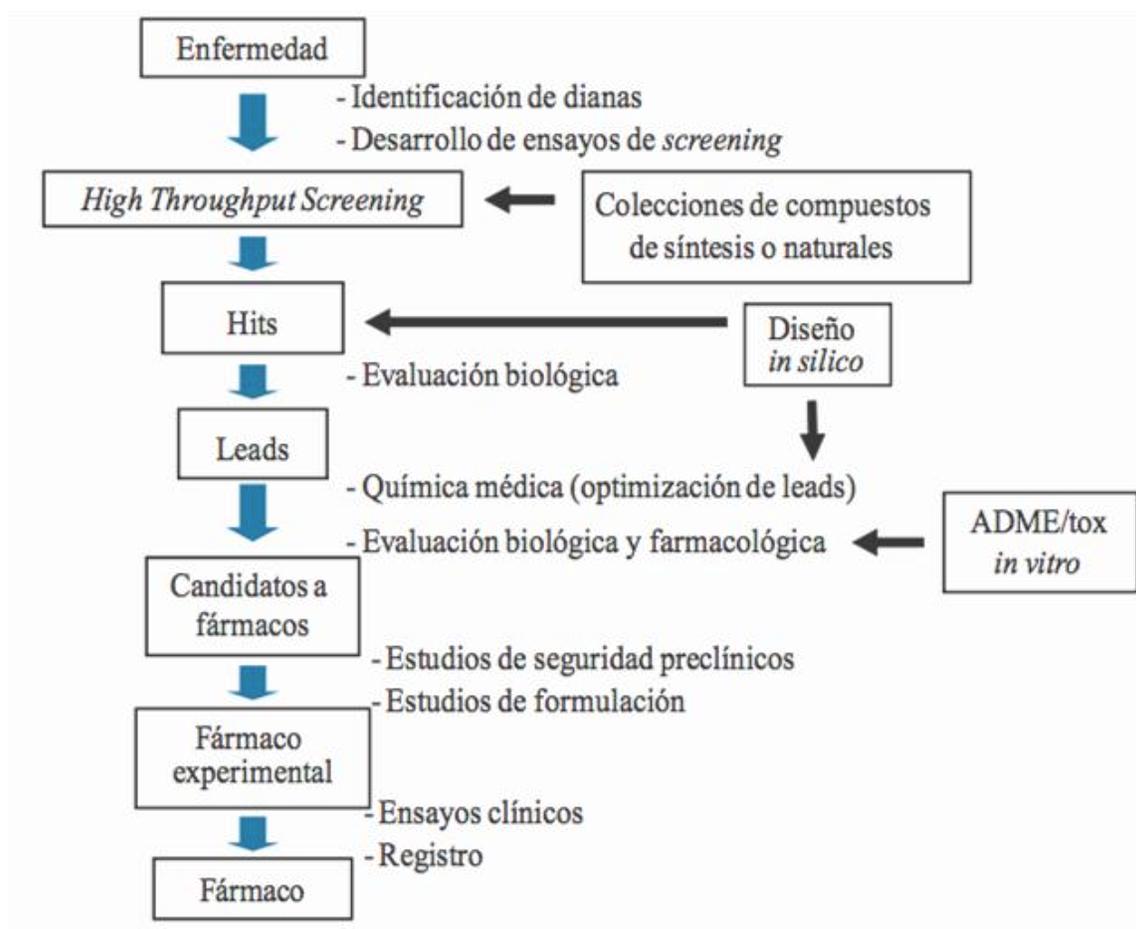


Figura 1. Esquema del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos (tomado de [11])

El desarrollo farmacéutico es un proceso muy largo y costoso en el cual la industria puede durar hasta 12 años con una nueva molécula, con una inversión que oscila entre los 500 y 1000 millones de dólares [10]. Para ello, los requerimientos de eficacia y seguridad deben cumplirse cabalmente afín de

obtener la aprobación de las agencias reguladoras entre las que se encuentran: 1) la Food and Drug Administration (FDA) en Estados Unidos, 2) Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en Europa y la 3) Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México.

2.1.1 Fases del desarrollo farmacéutico

Fase de descubrimiento

La fase de descubrimiento se relaciona con la búsqueda de moléculas como candidatas para el tratamiento de una determinada patología (Figura 1). Se plantea un objetivo terapéutico dirigido a un padecimiento específico que se pretende tratar o curar con la intervención del fármaco a desarrollar, así que para ello se establece una búsqueda secuencial de compuestos que presenten actividad biológica sobre dianas terapéuticas que han sido identificadas como relevantes para la etiología de la enfermedad [1][12]. La fase de descubrimiento a su vez se divide en 4 sub-fases [13].

- 1) **Identificación de la diana:** En la actualidad el proceso de desarrollo de un nuevo fármaco se basa en la identificación de dianas terapéuticas, entendiéndose como tal el lugar en el organismo donde el fármaco va a ejercer su acción [11]. Esta sub-fase busca identificar y comprender las dianas de tal manera de establecer cómo estas influyen en la patología, algo que no es tan simple considerando que existen alrededor de 8000 dianas [13]. Entre los métodos para identificar dichas dianas en la actualidad se destacan: los estudios de asociación del genoma completo, la genómica comparada y el análisis diferencial de la expresión génica [11].
- 2) **Validación de la diana:** La diana se valida cuando se comprueba que el fármaco demuestra una gran afinidad a la diana y este provoca un efecto clínicamente relevante sobre ella [11]. Una vez validada la diana se procede a investigar si se puede elaborar un fármaco que sea seguro y eficaz sobre la diana en cuestión [13].
- 3) **Identificación de los compuestos prometedores (HITS):** En esta etapa se estudian un gran número de moléculas, utilizándose para ello la técnica

de cribado de alta capacidad (*High Throughput Screening*), la cual permite determinar de una manera muy rápida las moléculas prometedoras (Hits) [1]. Un “hit” es aquel que tiene el potencial para tratar la enfermedad a través de su interacción con la diana, pudiendo ser obtenido por síntesis química, a partir de un compuesto natural, o por vía biotecnológica [13].

- 4) **Validación de los compuestos líder:** En este paso se optimizan a los hits mediante ensayos de afinidad y modificaciones de su estructura para mejorar la afinidad a la diana, y aquellos que posean mejores características serán los candidatos a fármacos (leads) [1]. Habitualmente estos ensayos de validación son llevados a cabo en modelos *in vivo* e *in vitro*[13].

Fase preclínica

En la fase preclínica se llevan acabo los estudios farmacológicos y toxicológicos del fármaco en sistemas biológicos diferentes al ser humano. Una vez seleccionados los leads se deberá diseñar un programa para reducir y anticipar los efectos adversos que se puedan presentar [1]. En concreto lo que se pretende averiguar en esta fase es la distribución o eliminación que presenta el fármaco en el organismo, así como su eficacia, efectos adversos y dosis [13].

En la preclínica se realizan ensayos *in vivo* (animales de laboratorio) e *in vitro* (células o tejidos). Estos ensayos se realizan para conocer los efectos tóxicos y farmacológicos que presenta el candidato a medicamento y los resultados son normalmente entregados a los organismos regulatorios [13]. También en esta fase se lleva acabo el diseño de la fase clínica, duración del tratamiento, la vía de administración del fármaco, la pauta de administración y el tipo de población que será empleada durante el estudio clínico [1].

Faseclínica

Los ensayos clínicos son realizados para comprobar la eficacia y seguridad de los nuevos medicamentos previamente evaluados en la fase preclínica con la finalidad de poder ser registrados y comercializados. Estos estudios son financiados por la

industria farmacéutica aunque también algunos estudios son apoyados por instituciones gubernamentales [14]. Una vez autorizado el uso en humanos del candidato por el organismo regulatorio se inicia el estudio clínico el cual a su vez se divide en cuatro sub-fases [15].

- 1) **Fase I:** Esta fase tiene una duración de entre 1 y 2 años, siendo la primera vez que es administrada en el ser humano [16]. El estudio es realizado en un pequeño grupo de voluntarios sanos (20-80 individuos). En esta fase se evalúa la seguridad, la tolerancia a dosis clínicas y la dosis máxima tolerada, así como también la farmacocinética en humanos. En esta etapa el estudio no es ciego [15][16]. Es aquí donde se tiene que hacer una solicitud que incluya los datos químicos de manufactura y los resultados obtenidos en la fase preclínica, esta solicitud es conocida como IND (nuevo fármaco en investigación) por la FDA [14].
- 2) **Fase II:** El medicamento en esta etapa es administrado por primera vez en un pequeño número de pacientes (cientos de individuos). En esta etapa se evalúa la eficacia y seguridad del medicamento frente a la enfermedad y se establece la relación dosis/respuesta. Los resultados obtenidos son muy importantes para continuar con el estudio, si la eficacia es buena se continúa con el estudio y se pasa a la fase III pero si el nuevo candidato no presenta eficacia frente a la enfermedad o es muy poca por lo general el proceso de desarrollo del nuevo fármaco ya no continua a la siguiente sub-fase [14][15][16].
- 3) **Fase III:** Los datos obtenidos sobre eficacia y seguridad son presentados ante las entidades regulatorias con el objetivo de obtener la aprobación del medicamento para realizar estudios de fase III en una mayor cantidad de individuos [16]. Estos estudios son multicéntricos, y controlados [16] y siguen las guías internacionales publicadas por la conferencia Internacional de Armonización (ICH). Una vez obtenidos los resultados de la fase III y el patrocinador esta convencido de su eficacia y seguridad para ser comercializado, solicita a la agencia regulatoria una aplicación de un nuevo fármaco. En Estados Unidos la FDA es quien otorga y aprueba la NDA

(New Drug Application) [15]. Estos estudios son muy costosos y tienen una duración promedio de 5 años, para evitar errores este ensayo regularmente es a doble ciego y cruzado, es aquí donde muchas veces se presentan las primeras reacciones adversas [15].

- 4) **Fase IV:** Aún no hay una definición totalmente aceptada para esta fase, pero en ella los patrocinadores y las agencias regulatorias monitorean al nuevo medicamento aprobado y comercializado en un contexto real. El patrocinador debe informar a las agencias regulatorias si hay algún efecto colateral, daños, reacciones alérgicas, o tóxicas o si el medicamento funciona o no en el nuevo ambiente no controlado en el que se usa, reportando los datos obtenidos cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses en el segundo año y posteriormente cada año. Esta fase implica una vigilancia continua y en ella se puede proceder a retirar el producto del mercado si es necesario [15].

Fase de aprobación y registro

En esta fase se lleva a cabo el registro ante las autoridades regulatorias, para que se autorice la comercialización del producto. El informe presentado tiene que incluir toda la información recopilada a lo largo del proceso de desarrollo desde la fase de descubrimiento hasta los resultados obtenidos en la fase III de la etapa clínica [13].

Una vez presentado el registro ante la autoridad regulatoria correspondiente, la revisión y aprobación puede llegar a tardar entre 2 o 3 años. La agencia al revisar el reporte analiza y evalúa todos los estudios realizados así como los resultados obtenidos sobre la eficacia y seguridad del nuevo medicamento. Aunque ningún medicamento es libre de efectos secundarios, se considera la relación beneficio riesgo del nuevo medicamento y si el beneficio es mayor que el riesgo que puede ocasionar su administración es muy probable que este reciba la aprobación, es aquí donde inicia la Fase IV de la clínica para llevar un seguimiento del nuevo medicamento una vez en el mercado apoyado de estudios de farmacovigilancia [1].

2.1.2 Importancia de la toxicología preclínica para el desarrollo farmacéutico

En la fase preclínica del desarrollo de un medicamento es necesario que se realicen estudios toxicológicos *in vitro* o *in vivo*. Estos estudios tienen como finalidad proporcionar la información necesaria para decidir si se prosigue a la fase clínica [17] y para ello se utilizan diversos modelos experimentales[18]. La toxicidad que presentan las sustancias analizadas pueden observarse de diferentes formas: a) estudiando las exposición accidental al medicamento; b) realizando estudios *in vitro* utilizando células/ líneas celulares; c) analizando la exposición *in vivo* en animales de experimentación [19].

Estas pruebas toxicológicas son realizadas para eliminar posibles riesgos de genotoxicidad así como determinar las dosis máximas del fármaco no tóxicas, además de verificar que en el estudio los animales de experimentación no presenten pérdidas de peso o cualquier comportamiento fuera de lo normal ya que esto puede indicar algún efecto adverso. Una vez finalizado el estudio los animales son sacrificados y examinados a fondo realizándoles exámenes histológicos, bioquímicos y de lesiones tisulares [20].

Las investigaciones toxicológicas son en consecuencia extremadamente importantes en la fase preclínica ya que permiten anticipar posibles efectos secundarios o tóxicos en la fase clínica, además que estos estudios son requisito obligatorio exigido por todos los organismos regulatorios a nivel mundial para que un nuevo fármaco continúe con su desarrollo clínico en seres humanos.

2.1.3 Métodos toxicológicos experimentales regulados

Todos los estudios que tenga como fin analizar los efectos toxicológicos de una molécula nueva y que se apeguen a los protocolos oficiales establecidos por la unión Europea (UE), por la organización para la cooperación y desarrollo económico (OCDE) o por una agencia regulatoria en particular se consideran como métodos toxicológicos experimentales regulados. La toxicología regulatoria tiene un papel social muy importante en la actualidad debido a que es la encargada de determinar los riesgos que una sustancia química puede ocasionar en la salud pública o en el medio ambiente [21]. Los métodos toxicológicos

regulados más importantes que se utilizan durante la etapa preclínica de desarrollo farmacéutico se muestran a continuación [22].

Toxicidad aguda

La toxicidad aguda es la capacidad de una sustancia de presentar efectos adversos en una sola administración, estos efectos pueden llegar a ser débiles como una irritación cutánea o pueden provocar hasta la muerte. En un sentido convencional los estudios de toxicidad aguda buscan determinar la dosis letal media (DL_{50}), aunque esta tendencia ha variado en los últimos años.

Los principales ensayos para evaluar la toxicidad aguda por vía oral son: 1) el ensayo de dosis fija; 2) el método de clases de toxicidad y el 3) procedimiento arriba y abajo [22].

- 1) **Dosis fija:** Este método fue admitido por la Unión Europea en 1990 y por la OCDE en 1992. Este estudio no calcula la DL_{50} si no que permite clasificar las sustancias estudiadas como tóxica o no tóxica. Se administra una dosis establecida (5, 50, 500 o 2000 mg/Kg) hasta que se observen efectos tóxicos pero sin producir necesariamente la muerte de los animales [22].
- 2) **Clases de toxicidad:** En 1996 la OCDE adoptó este estudio que aunque en algunos casos no puede calcular la DL_{50} de forma exacta si permite la clasificación de la sustancia en cuanto a su letalidad. Se utilizan por lo general 3 animales del mismo sexo por dosis (25, 200 y 2000 mg/Kg). Este método reduce considerablemente el número de animales utilizados. Intenta que se produzca la mortalidad de por lo menos un animal en la primera dosis, de no ser así se prosigue con la siguiente, teniendo como máxima la dosis de 2000 mg/Kg[22].
- 3) **Arriba y abajo:** Este procedimiento solo utiliza un animal por etapa, lo mas común es que se utilice una rata hembra aplicando el factor 3.2 hacia arriba o hacia abajo de la dosis previa según se produzca o no la muerte del animal. Se inicia con una dosis menor a la letal media. A las 48 horas se

administra al segundo animal modificando la dosis según produjera la muerte o no del primer animal y esto así hasta que se presente una de estas tres posibilidades: que 3 animales de forma consecutiva sobrevivan a la administración a dosis altas, ocurran 5 cambios de sentido en 6 animales o por lo menos 4 hayan seguido el primer cambio de sentido y el cociente sobrepase un determinado valor [22].

Capacidad corrosiva

Las sustancias que se consideran corrosivas son aquellas que generan un daño de tipo irreversible en el tejido donde se aplican. Antes de realizarse el ensayo se deben de considerar las propiedades fisicoquímicas del compuesto estudiado, así como su pH, ya que si posee un pH muy ácido (pH=2) o muy alcalino (pH=11.5) se entiende que la sustancia es por naturaleza es corrosiva [22].

En el año 2000 fueron aceptados algunos métodos para comprobar la capacidad corrosiva de una sustancia antes de ser probada en animales de experimentación. Estos métodos son: 1) Ensayo de la Resistencia Eléctrica Transcutánea en piel de rata o humana (prueba *ex vivo*) y el Ensayo Metabólico usando piel humana reconstituida. Si estas pruebas no fueran suficientes para determinar si la sustancia es corrosiva o no, es necesario hacer el ensayo en animales [22].

El procedimiento utilizado en animales es el de Draize el cual consiste en aplicar la sustancia directamente en la piel afectada del animal o en el ojo. Las especies más utilizadas son ratones, conejos y cobayos, siendo de primera elección los conejos albinos. Se empieza con un solo animal aplicando sobre su lomo cubriendo la sustancia con un parche de ser necesario, la exposición no tiene que ser mayor a 4 horas, finalizado el tiempo se retira la sustancia y se analiza los resultados obtenidos, se utiliza la escala de Magnussin Kligman que es la siguiente: 0) sin cambios visible; 1) eritema ligero con manchas localizadas; 2) eritema moderado y confluyente; y 3) eritema intenso y tumefacción [22].

El proceso de la evaluación ocular solo se realiza si la sustancia no presenta corrosividad o irritación severa en el ensayo en la piel, de ser así se asume que la

sustancia es corrosiva o irritante ocular para así no realizar un estudio innecesario en animales que provoque más sufrimiento y dolor [22].

Capacidad irritante dérmica y ocular

La capacidad irritante a diferencia de la capacidad corrosiva ocasiona un daño reversible en el sitio de aplicación. Debe realizarse en conejos albinos de preferencia, sanos y adultos. Se administra por instilación de 0.1 ml en uno de los ojos, si es un sólido debe pulverizarse lo mejor posible y medir el volumen a administrar, si se tratara de un aerosol este debe aplicarse manteniendo el ojo abierto y a una distancia promedio de 10 cm. El tiempo para evaluar los daños que pueda ocasionar la administración no es fijado de una forma rigurosa pero tiene que ser lo suficientemente largo para que permita la evaluación de la toxicidad, no excediendo por lo general de los 21 días [22].

Capacidad sensibilizante

En la actualidad existe un número bastante importante de ensayos para determinar la sensibilidad dérmica o de antigenicidad; ya que tradicionalmente este estudio era utilizado como primera opción en cobayos (OCDE GT 406). Hoy en día son aceptados otros ensayos por ejemplo: el ensayo del nódulo linfático local (LLNA), el ensayo en oreja de ratón (MEST), y los ensayos más prometedores *in vitro* son los cultivos de células dendríticas humanas, piel reconstruida, cultivos de células de Langerhans, cultivos de queratinocitos y cultivos de linfocitos T. En estas pruebas *in vivo* se cuantifica la proliferación de los ganglios linfáticos, siendo considerada una sustancia sensibilizante aquella que aumente por lo menos cuatro veces la proliferación de los ganglios linfáticos comparativamente al control [22].

Toxicidad por exposición repetida o prolongada

El nombre de esta prueba ha cambiado a lo largo del tiempo siendo inicialmente llamada toxicidad subaguda, después toxicidad subcrónica y hoy en día se ha nombrado “toxicidad a dosis repetida” [22]. El tiempo mínimo de dicho estudio es

regulado en base a los requerimientos de cada entidad regulatoria pudiendo cambiar en cada país [14]. En general este tipo de ensayos tiene una duración de exposición al animal de 14 a 28 días por vía oral [23]. La finalidad de este estudio es conocer si se presentan efecto a largo plazo o de manera acumulativa, así como determinar la dosis sin efecto adverso observable (NOAEL). La administración es de manera diaria durante el tiempo que dure el ensayo [22].

La DL_{50} se toma como punto de referencia para calcular al menos tres dosis diferentes en las cuales en la más baja no se presente efecto adverso y siendo en la más alta donde se produzcan estos efectos. Durante el tiempo de administración se hacen observaciones físicas y al finalizar son sacrificados los animales para finalmente realizar un estudio anatomopatológico macroscópico, en donde son pesados todos los órganos poniendo atención especial en órganos que puedan proporcionar información de efectos inmunotóxicos que se pudieran presentar como por ejemplo: bazo, timo y nódulos linfáticos [22].

Carcinogenicidad

Estudia la capacidad de un agente de producir tumores cancerígenos en los animales [17][18]. Este tipo de ensayos son por lo regular realizados casi de forma exclusiva en ratas o ratones, pero también son utilizados los perros como especie no roedora. Estos estudios son generalmente de larga duración y de un alto costo, pudiendo ser utilizados hasta más de 400 animales en los que se debe realizar una exploración física como la palpación semanalmente en busca de masas tumorales así como llevar un control de su peso durante el primer mes del estudio, también se les realizan por lo menos dos veces durante el ensayo un estudio hematológico a cada uno de los animales, al término del estudio se hace un estudio histopatológico a todos los órganos en al menos los grupos control y el de dosis más alta en busca de alteraciones microscópicas que se pudieran presentar [22]. Estos ensayos nos permiten clasificar a las sustancias teniendo en cuenta su capacidad de producir cáncer [18]. La clasificación es la siguiente: 1) Evidencia suficiente de carcinogenicidad; 2) Limitada evidencia de carcinogenicidad; 3) Inadecuada evidencia de carcinogenicidad; 4) Ausencia de carcinogenicidad [18].

Mutagenicidad

Este ensayo evalúa la capacidad de una sustancia de dañar o alterar el material genético, el cual puede ser como consecuencia de un daño mutágeno o carcinógeno[17]. Debido a la complejidad de obtener resultados confiables en este tipo de ensayos no es realizada una sola prueba si no que se realiza toda una batería de ensayos *in vitro* e *in vivo* con el fin de tener resultados aceptables [22].

El ensayo de reversión de la mutación en *Salmonella tiphiturium* fue el primer estudio *in vitro* aceptado por los organismos regulatorios [22]. Hoy en día es el estudio *in vitro* más usado para analizar el potencial mutagénico de una sustancia [18]. En este se realiza en un medio deficiente de histamina en el cual las bacterias que mutan son capaces de prevalecer en el medio y las bacterias que no sufren una mutación mueren [22]. Si una sustancia es capaz de hacer que las bacterias proliferen en esta prueba nos indica que tiene una capacidad mutagénica.

Toxicidad para la reproducción y el desarrollo

Estos estudios son requisito de carácter obligatorio por todas las entidades regulatorias para el registro de un nuevo medicamento que se pretende administrar en pacientes que se encuentren en etapa reproductiva [18]. Estos estudios evalúan si pudiera presentarse trastornos en la fertilidad y el desarrollo de la descendencia como consecuencia del consumo del nuevo medicamento [22].

La evaluación de la capacidad de una sustancia para generar trastornos de la fertilidad se realiza en ambos sexos, determinando si existe algún efecto negativo en algunos aspectos como por ejemplo: la libido, el comportamiento sexual, la espermatogénesis, la ovogénesis, la actividad hormonal y las respuestas fisiológicas que impidan la fertilización así como la fase de implantación [22].

Mientras tanto en el estudio de la toxicología del desarrollo se analiza si existen efectos embriotóxicos o fetotóxicos como pueden ser la disminución del peso

corporal, el retraso en el desarrollo y crecimiento, lesiones en órganos, defectos estructurales, defectos funcionales, abortos o muerte [22].

Cinética en el organismo y el medio ambiente

Así como es necesario conocer los efectos biológicos del nuevo compuesto es indispensable conocer su toxicocinética y biotransformación. En efecto, para todo tipo de sustancia resulta necesario conocer su absorción, distribución y concentración efectiva en los órganos diana. Este tipo de estudios brinda la información necesaria para determinar en el caso por ejemplo de sustancias que no se absorbe, los estudios toxicológicos, duración de estos así como las especies y número de animales empleados, los que serían de toda evidencia diferentes al de una molécula que presente buena absorción por la vía de administración pretendida [22].

Otros tipos de estudios

Otros estudios toxicológicos ampliamente usados son las evaluaciones de neurotoxicidad y de comportamiento [22]. Los estudios neurotóxicos son realizados por lo general en ratas con una duración que varía de entre 28 y 90 días dependiendo si es un estudio crónico en el cual son 14 días de evaluación. Estos estudios incluyen observaciones de diferentes estímulos como por ejemplo: sensoriales, de la fuerza muscular, de actividad motora y se lleva un control del alimento y el agua consumida, además se realiza un examen oftalmológico y neuropatológico [22].

Otro tipo de estudio que se realiza es el del comportamiento, debido a que los primeros efectos tóxicos que se presentan en los animales son los del comportamiento, siendo utilizados ratas como elección pero también se utilizan primates y palomas [22].

2.1.4 Toxicidad aguda: pruebas clásicas y alternativas

En la actualidad se realizan grandes esfuerzos por desarrollar nuevos métodos alternativos, pero solo unos pocos han sido aceptados por los organismos

regulatorios. La organización para la cooperación y el desarrollo económico (OECD) fue en 1982 el primer organismo internacional en regular los protocolos de los ensayos de toxicidad realizados en animales de experimentación. Estos protocolos fueron aceptados por todos los países que eran miembros en este organismo.

Durante un largo tiempo los estudios toxicológicos agudos solo tenían como objetivo la identificación de la dosis letal media DL_{50} del compuesto estudiado, con la cual se causaba la muerte al 50 % de los animales, pero este tipo de métodos denominados “estudios de toxicidad aguda clásicos” dejaron de ser requisito obligatorio por las entidades regulatorias a finales del 2002, debido fundamentalmente al gran uso de animales de experimentación [18].

La OECD hasta hoy en día solo ha aprobado tres métodos alternativos para evaluar la toxicidad aguda: el método de dosis fija, de clases de toxicidad y el procedimiento arriba y abajo. Los mismos obedecen a una presión cada vez más creciente de protección hacia los animales. El comité para los productos medicinales (CPMP) en 1997 definió la regla de las 3 R con la finalidad de tener un impacto en la reducción del número de animales sacrificados cada año en los estudios de toxicidad [24]. Las tres R consisten en: 1) Reducir: reducir los animales utilizados en los ensayos toxicológicos; 2) Refinar: utilizar ensayos toxicológicos que sean menos dolorosos y estresantes para los animales; 3) Reemplazar: sustituir los animales por otros animales o en su defecto por ensayo *in vitro* o *ex-vivo*[25].

El principio de las 3 R surgió en 1959 cuando Russell y Burch publicaron el libro “The Principles of Humane Experimental Technique” en el proponían el reducir, refinar y reemplazar para así aminorar el sufrimiento y el número de animales en los estudios toxicológicos que se utilizaban en esa época. Ellos proponían que en caso de ser indispensable el uso de animales lo mejor era reducir su número. Sin embargo, no fue hasta 20 años después que la comunidad científica reconoció el valor de dicho principio, por el incremento de la preocupación de la sociedad por los animales [21]. En los últimos 20 años se ha avanzado rápidamente siendo de

gran importancia hoy en día los métodos alternativos en los estudios de toxicidad de nuevos compuestos utilizados procedimientos *in vitro*, *in silico* e *in vivo*. Estos métodos son muy importantes debido a que son utilizados en la evaluación de nuevas moléculas, siendo aceptados por las entidades regulatorias como la OECD, la FDA, y la EPA [25].

Los métodos alternativos dan la ventaja de realizar los estudios de toxicidad de una molécula *in vitro* lo cual hasta hace algunos años solo eran realizados con animales. Además, brindan una mayor información de los mecanismos implicados en la toxicidad. A pesar de que existe una gran dificultad para que estos métodos sean aceptados por los organismos regulatorios se sigue trabajando en ellos y se espera que en los próximos años sean aceptados dejando de lado numerosos métodos clásicos que todavía persisten en la evaluación de medicamentos, como el test de Draize [24]. Las desventajas que presentan estos ensayos es que algunos poseen un alto grado de simplicidad, por no permiten evaluar si existe reversibilidad del efecto tóxico, así como la dificultad que presentan en ensayos de larga duración o en aquellos casos donde se requieren administraciones repetidas. Del mismo modo, se hace difícil conocer si existen interacciones con otros fármacos [26]. En la Tabla 1 se muestran algunos de los estudios alternativos aceptados por entidades reguladoras internacionales [25].

Tabla 1. Métodos alternativos para determinar toxicidad (Adaptado de [25])

Método	Ensayo	Organismo regulador
Toxicidad aguda oral		
Método de las clases	<i>in vivo</i>	OECD TG 423 (2001)
Método de la dosis fija	<i>in vivo</i>	OECD TG 420 (2001)
Procedimiento arriba-abajo	<i>in vivo</i>	OECD TG 425 (2006)
Ensayo de respuesta de queratinocitos normales humanos al rojo neutro (NHK NRU)	<i>in vitro</i>	OECD GD 129 (2010)
Ensayo de respuesta al rojo neutro Balb´c 3T3	<i>in vitro</i>	OECD TG 129 (2010)
Toxicidad aguda inhalación		

Método de las clases de toxicidad	<i>in vivo</i>	OECD (TG 436 (2009), GD 153 (2011))
Penetración o absorción dermal		
Métodos <i>in vivo</i> para evaluar la absorción cutánea	<i>in vitro</i>	OECD (TG 428 (2004), DG 28 (2004), Notas no. 156)
Estudio de mecanismos endocrinos		
Ensayo de activación transcripcional para agonistas de receptores (Rs) estrogénicos	<i>in vitro</i>	Actualizada OECD TG 435 (2012)
Esteroidogénesis (H295R línea celular humana)	<i>in vitro</i>	OECD TG 456
Método de transactivación del R estrogénico DG1Luc para identificar agonistas de los Rs estrogénicos	<i>in vitro</i>	OECD TG 457 (2012)
Corrosión ocular		
Ensayo de opacidad y permeabilidad córnea bovina	<i>ex vivo</i>	OECD (Revisado TG 437 (2012), GD 160)
Método del ojo aislado de pollo	<i>ex vivo</i>	OECD (Revisado TG 438 (2012), GD 160)
Liberación de Fluoresceína	<i>in vitro</i>	OECD TG 460 (2012)
Evaluación del uso de analgésicos tópicos, analgésicos sistémicos y punto final en humanos	<i>in vivo</i>	Actualización OECD (TG 405 (2012), GD 19)
Estrategia de ensayo secuencial para irritación y corrosión ocular	<i>in vivo/</i> <i>ex vivo/</i> <i>in vitro</i>	Actualización OECD TG 405 (2012)
Irritación ocular		
Uso rutinario de analgésicos tópicos, analgésicos sistémicos y punto final en humanos	<i>in vivo</i>	Actualización OECD (TG 405 (2012), GD 19)
Estrategia secuencial de ensayo para irritación y corrosión ocular	<i>in vivo/</i> <i>ex vivo/</i> <i>in vitro</i>	Actualización OECD TG 405 (2012)
Genotoxicidad		
Ensayo de Ames	<i>in vitro</i>	OECD TG 471 (1997)
Ensayo de mutagenicidad celular	<i>in vitro</i>	OECD TG 476 (1997)
Ensayo de aberraciones cromosómicas	<i>in vitro</i>	Actualización OECD TG 473 (2012)

Ensayo de micronúcleos en células de mamíferos	<i>in vitro</i>	Borrador OECD TG 487 (2012), ICH (2011)
Ensayo de intercambio de cromátidas hermanas	<i>in vitro</i>	OECD TG 479 (1986)
Ensayo de síntesis no propagada de ADN	<i>in vitro</i>	OECD TG 482 (1986)
Ensayo de mutagenicidad en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>in vitro</i>	OECD TG 480 (1986)
Inmunotoxicidad/ Piel sensibilización		
Ensayo den nódulo linfático local	<i>in vivo</i>	Actualización OECD TG 429 (2010)
Nódulo Linfático Local LLNA: DA	<i>in vivo</i>	OECD TG 442A (2010)
Nódulo Linfático local: BrdU-ELISA	<i>in vivo</i>	OECD TG 442B (2010)
Fototoxicidad		
Captación del rojo neutro células 3T3	<i>in vitro</i>	OECD TG 432 (2004)

2.1.5 Metabolitos de plantas y desarrollo farmacéutico en la actualidad

Desde la antigüedad el ser humano ha utilizado las plantas por sus propiedades curativas y aunque no se conocían los mecanismos farmacológicos exactos por las que revertían las enfermedades, su utilización fue pasando de generación en generación [27]. Las arcillas de Babilonia, los papiros de Egipto, y los grabados americanos son las pruebas más fidedignas que permiten constatar la utilización de las plantas medicinales en las culturas antiguas. En esta época, las plantas eran usadas como remedios o en ritos mágicos, donde se preparaban como material seco, pulverizado, mascado o en extractos las raíces, hojas, flores y semillas [28].

De esta manera fue que cada región del mundo se comenzó a utilizar las plantas nativas de la zona para curar las enfermedades, lo que brindó características únicas a cada una de ellas debido a que en cada región poseía una diversidad de plantas diferentes. Al pasar del tiempo este tipo de prácticas de terapias locales fue denominada “medicina tradicional”. A la utilización de plantas medicinales con fines terapéuticos el médico francés Henri Leclerc, le llamó fitoterapia a principios

del siglo XX. A diferencia de la medicina sintética o convencional, esta se caracteriza por la utilización de matrices vegetales complejas, como lo son la planta completa o alguna de sus partes (hojas, raíces, etc) o productos de estas obtenidos por un tratamiento con disolvente, llamados extractos [29].

Hoy en día este tipo de terapias siguen siendo muy utilizadas de manera folklórica o popular y han ido en aumento principalmente por la población de bajos recursos o aquellas que viven apartadas de la sociedad y no tienen acceso a medicamentos, pero a pesar de esto pocas especies vegetales han sido estudiadas siguiendo los parámetros modernos apegados a las normas éticas y protocolos internacionales definidos, por lo que nuevas investigaciones son necesarias afín de explorar la gran biodiversidad existente a nivel global [30][26]. De hecho, se estima que solo entre 20000 y 50000 de especies vegetales se han utilizado para curar enfermedades, de las cuales una pequeña cantidad de ellas has sido estudiada con el fin de desarrollar medicamentos. De todas las especies terrestres solo entre 15 y 20% has sido han sido analizadas, por lo que en consecuencia el resto de plantas aún no estudiadas son una gran oportunidad para poder encontrar principios activos novedosos [31]. La OMS señala que los estudios existentes dirigidos a las plantas medicinales aún son insuficientes [30][26] y que el desarrollo farmacéutico a partir de recursos naturales debe realizarse bajo bases científicas que sustenten la seguridad, efectividad y calidad de los nuevos productos [27].

A pesar de este desconocimiento existente, algunas plantas han sido desde hace muchos años fuente para la obtención de agentes farmacéuticos [32]. De hecho, los metabolitos secundarios, considerados como aquellos compuestos químicos que sintetiza la planta sin relación directa con funciones de crecimiento y reproducción han sido usados para el desarrollo de nuevos fármacos [27]. Estas moléculas son el resultado de diversas rutas metabólicas, destacándose entre ellos los compuestos fenólicos, terpénicos, alcaloides y ácidos grasos los cuales sirven como defensa de la planta contra patógenos, protección de los rayos UV, entre otras funciones [29].

Una de las grandes desventajas de la búsqueda de fármacos a partir de plantas es la baja disponibilidad que los metabolitos secundarios presentan, debido a que su aislamiento casi siempre resulta en la obtención de cantidades muy pequeñas de moléculas. Además, desde el punto de vista químico es en ocasiones muy complejo realizar la síntesis química de compuestos de origen natural para uso industrial, aunque la novedad que presentan sus estructuras le confieren una gran ventaja debido a la existencia de numerosos centros estereogénicos con gran afinidad por las dianas farmacológicas, que difícilmente podrían reproducirse usando síntesis química convencional [33]. De hecho, de los 1010 fármacos nuevos aprobados por la FDA desde enero del 1981 hasta julio de 2006, 43 eran de origen vegetal sin ser alterados en su estructura y 232 eran derivados de productos naturales. Pero a pesar de esto con la llegada de la robótica, la bioinformática, la biotecnología, el modelado molecular (*in silico*), el cribado de alto rendimiento (HTS) y los métodos de síntesis combinatorios, ha habido una gran disminución en la utilización de productos de origen vegetal para desarrollar nuevos medicamentos [33].

2.2 LA PSORIASIS

La psoriasis es una patología caracterizada por una inflamación crónica en la piel que afecta entre el 1 y el 2% de la población mundial [2]. Es una enfermedad eritemato-escamosa que presenta una hiperproliferación de queratinocitos epidérmicos de una forma excesiva, mediada por una estimulación continua de las células T por inmunógenos de origen epidérmico [34]. Esta afecta con la misma frecuencia a hombres y mujeres [4][34]. La causa aún sigue siendo desconocida, pero se han logrado diferenciar tres componentes en las lesiones que se presentan: la hiperproliferación epidérmica representada por un aumento en la cantidad de células basales, la diferenciación anómala de los queratinocitos y la inflamación dérmica [4].

Se plantea la posibilidad de que esta enfermedad pudiera ser ocasionada por una predisposición genética desencadenada por estímulos medioambientales. Además

de que se asocia a otras comorbilidades como la artritis, enfermedad inflamatoria del intestino e incluso infecciones por VIH. Los linfocitos Th1 y Th17 y su activación son considerados el factor patogénico de mayor relevancia en la producción de las lesiones en la piel. En esta hipótesis patogénica, tal activación condicionaría la hiperproliferación epidérmica, la que a su vez se ha relacionado con el fenómeno del superantígeno postestreptocócico y la activación de los neutrófilos. Además de la predisposición genética, el estrés o ansiedad, así como las estaciones del año pueden estar en relación con la aparición de la enfermedad. De hecho, esta enfermedad se agrava en primavera y otoño, también algunos medicamentos ayudan a su empeoramiento clínico tales como aquellos que contengan litio, propranolol, cloroquina, anti-inflamatorios no esteroideos, antagonistas del calcio y especialmente los corticoides [4].

2.2.1 Clasificación de la psoriasis

La literatura clasifica esta enfermedad de diversas maneras dependiendo de sus características fenotípicas como la edad de inicio, el grado de afección cutánea, el patrón morfológico y su ubicación anatómica [35].

Tabla 2. Clasificación clínica de la psoriasis (Adaptado de [35]).

Criterios de clasificación	Fenotipos clínicos
Edad de inicio	Psoriasis tipo I: inicio antes de 40 años Psoriasis tipo II: inicio después de 40 años
Grado de gravedad según el área de superficie corporal (BSA) o el número de sitios	Psoriasis moderada: 5-10% BSA Psoriasis grave: >10% BSA Psoriasis localizada/ Psoriasis generalizada
Patrón de distribución	Inversa, seborreica
Morfología	Placa, gutata, eritrodérmica, postular (generalizada/ localizada, rupioide, elefantina)
Sitio anatómico	Psoriasis: del cuero cabelludo, palmoplantar, genital, de las uñas y anal.
Etapas de desarrollo	Psoriasis en placa estable

Psoriasis en placas

La psoriasis en placas es la forma más común en que se presenta la enfermedad, afectando aproximadamente al 90% de todos los pacientes con psoriasis, conocida comúnmente como *psoriasis vulgaris*[35]. Se caracteriza por la aparición de placas eritematosas de color rojo y en muchos de los casos aparecen cubiertas de escamas plateadas. Las lesiones se manifiestan de formas redondeadas u ovaladas con un tamaño mínimo de 0.5 cm de diámetro, por lo general suelen ser muy dolorosas o causar comezón las cuales dependiendo de su tamaño y ubicación pueden ocasionar consecuencias negativas, ya sean físicas o psicológicas a los pacientes. Este tipo de psoriasis se presenta en zonas como las rodillas, los codos o se extiende sobre el cuerpo en superficies más grandes por lo que las placas son claramente demarcadas de la piel no afectada, lo que las hace muy visibles, mientras que en otros casos más aislados su aspecto es parecido al de un anillo debido a que la parte central se cura [36].

La psoriasis en placas al ser la forma que se presenta con mayor frecuencia en los pacientes, es en la que se han enfocado la mayoría de las investigaciones y ensayos clínicos existentes. Estos estudios han llevado a subdividir a la psoriasis en placas en: psoriasis inversa, psoriasis del cuero cabelludo, psoriasis de uñas, sebo-psoriasis y psoriasis palmo-plantar de acuerdo a los sitios anatómicos en que se presentan, así como a sus variaciones fenotípicas [36].



Figura 2. Aspectos clínicos de la psoriasis (tomado de [36])

A) En placas; B) en gotas; C) eritrodérmica; D) del cuero cabelludo; E) inversa; F) postular; G) postular generalizada; H) de las uñas.

Psoriasis inversa: Conocida también como psoriasis intertriginosa, se manifiesta con la aparición de placas delgadas y poco escamosas [36]. Suele aparecer en lugares donde se dobla la piel tales como la región inframamaria, axilas, la ingle y la zona intergluteal [35][36]. Este tipo de psoriasis está sujeta a la irritación causada por los roces y la sudoración entre los pliegues de la piel afectada, teniendo más problemas las personas con sobrepeso [36].

Psoriasis del cuero cabelludo: El cuero cabelludo por lo general es la primera parte del cuerpo afectada por la psoriasis en placas. Estas lesiones se caracterizan por la presencia de eritemas, placas con escamas muy definidas, cubiertas de escamas plateadas más gruesas, por lo general se localizan alrededor de las orejas y en la zona occipital [36]. Estas al ser tan visibles ocasionan un deterioro significativo en la calidad de vida de los pacientes [35].

Psoriasis de las uñas: Es común que se presente en pacientes con psoriasis en placas, aunque también puede presentarse de forma aislada y se caracteriza porque todas las estructuras que conforman la uña se ven afectadas lo que ocasiona un engrosamiento, decoloración y desmoronamiento de las uñas. Debido a la dificultad que se presenta a la hora administrar los medicamentos ya sea alrededor, arriba y debajo de la superficie de la uña, se considera a este tipo de psoriasis de las más difíciles de tratar [35] [36].

Psoriasis sebácea: Este es un tipo de psoriasis en placa caracterizada por la presencia de una dermatitis seborreica, se manifiesta en zonas como la cara y de manera especial en los pliegues nasolabiales, formando lesiones rojas, finas y bien definidas de un aspecto grasoso [36].

Psoriasis palmo-plantar: El 17% de los pacientes con psoriasis en placas padecen este tipo de psoriasis la cual se caracteriza por afectar las palmas de las manos así como la planta de los pies. Se presenta de dos formas diferentes, la primera como una psoriasis en placas con lesiones definidas, eritematosas y cubiertas por una capa gruesa de escamas y las segunda con la presencia de placas eritematosas salpicadas de pústulas con frecuencia recalcitrantes al tratamiento [36]. Al ser muy dolorosa estas pueden llegar a producir una condición incapacitante a los pacientes, por lo que se recomiendan medidas preventivas como son utilizar emolientes durante la noche y evitar fricciones en estas áreas [35].

Psoriasis eritrodérmica

Su principal característica es la aparición de erupciones cutáneas agudas o subagudas difusas y lesiones inflamatorias de color rojo que llegan a extenderse hasta el 90% o más de la superficie de la piel que se ve acompañada de una gran descamación [36]. Por lo general, esta llega a desarrollarse debido a que no se lleva un control adecuado de la enfermedad por los pacientes. Además, puede aparecer debido a la retirada de los medicamentos sistémicos, reacciones adversas a otros medicamentos que contengan litio o por una infección sistémica subyacente [35]. Es considerada grave y poco común, ocasiona serios síntomas a las personas que la padecen tales como: trastornos en la regulación de la temperatura, calor excesivo en la piel y fiebre [36].

Psoriasis en gotas

Este tipo de psoriasis se presenta como erupciones agudas en pequeñas pápulas en el tronco, las extremidades o la cara, siendo las zonas en la que hay fricción las más afectadas como lo son: el abdomen inferior, espalda baja, antebrazos y pecho. En dos tercios de los casos es ocasionada por infecciones estreptocócicas [36].

Psoriasis postular

Este tipo de psoriasis se presenta en forma de pústulas en piel eritodérmicas monoforma en las placas inflamatorias, se produce a raíz del exagerado fenómeno de la exocitosis de los neutrófilos que se encuentran en la psoriasis. Clínicamente se describe en forma de pústulas planas de color blanco amarillento (anicrobiennes) con tendencia a la coalescencia [36].

2.2.2 Severidad de la psoriasis

En años recientes ha ido en aumento el interés por crear una forma que sea totalmente confiable para poder evaluar la gravedad de la psoriasis, como resultado de este interés se han logrado desarrollar diferentes métodos para evaluar el grado de gravedad de la psoriasis [37]. Estos estudios evalúan de una forma objetiva la extensión y los síntomas, así como de forma subjetiva el impacto que tiene la enfermedad en la calidad de vida de las personas que la padecen [36].

Entre los métodos estandarizados más aceptados para medir la gravedad de la psoriasis se encuentran el área de superficie corporal (BSA) y el índice del área y gravedad de la psoriasis (PASI) [3][36]. De esta misma manera el índice de calidad de vida en dermatología (ICVD) y la escala SF-36 son utilizadas para evaluar la calidad de vida de los pacientes con esta afección [36].

Siguiendo la escala del área de superficie corporal los pacientes (BSA) se considera un BSA de 5-10% representa una psoriasis de tipo moderada, mientras que los que presentan un BSA de 10% o mayor se considera que es una psoriasis grave [35]. En los ensayos clínicos el índice del área y gravedad de la psoriasis (PASI) es considerado el standard de oro para la evaluación de la eficacia de los tratamientos. Probablemente porque se trata de un parámetro objetivo el cual es el mejor validado hasta hoy en día, debido a que permite realizar la comparación histórica de diversos tratamientos y presenta una buena correlación inter-observador. Sin embargo, en la actualidad no existe un consenso absoluto por parte de la comunidad científica que indique cómo debe medirse la gravedad de la psoriasis en un paciente [37].

Tabla 3. Clasificación de la psoriasis según su gravedad (Adaptado de [4])

Gravedad de Psoriasis	Descripción
Psoriasis leve	Psoriasis estable, en placas, que afecta a menos del 10% de la superficie corporal. Psoriasis en gotas
Psoriasis moderada	Psoriasis que afecta del 10 al 25% de la superficie corporal, excepto si afecta zonas incapacitantes como cara, manos, pies, genitales o pliegues, y que no exista afectación articular. Estado psicológico del paciente no excesivamente afectado.
Psoriasis grave	Psoriasis que afecta a más del 25% de la superficie corporal o zona incapacitantes como cara, manos, pies, genitales o pliegues. Afectación articular con limitación de la movilidad. Perturbación emocional que impida el desarrollo de las actividades normales. Psoriasis aguda, que incluye: psoriasis pustulosa generalizada, psoriasis eritodérmica y psoriasis en extensión rápida

2.2.3 Tratamientos antipsoriásicos actuales

En la actualidad no existe una cura como tal para esta enfermedad, sin embargo, existen muchos tratamientos tópicos, sistémicos y biológicos que ayudan a mejorar la calidad de vida de estos pacientes, los que son seleccionados dependiendo del tipo de psoriasis que se quiera tratar, la gravedad, la extensión y la localización de las lesiones [4].

Existen una gran variedad de preparados tópicos que son utilizados en la terapia. Estos tratamientos solo son indicados para pacientes con psoriasis leve donde el área afectada solo es del 10% o menos, debido a que si la superficie es mayor, el tiempo de aplicación sería demasiado largo, lo que ocasionaría que los pacientes no realicen el tratamiento adecuadamente debido a la falta de adherencia. Los

tópicos utilizados en la terapéutica son: corticosteroides, alquitranes, derivados de la vitamina D y retinoides [4].

Los tratamientos sistémicos aprobados para tratar la psoriasis son: la fototerapia (radiación ultravioleta: ultravioleta A [UVA], ultravioleta B [UVB] o UVB de banda estrecha), fotoquimioterapia (psorelenos + radiación UVA [PUVA] y los agentes sistémicos clásicos como: ciclosporina, metotrexato y acitretino [3][4].

En la actualidad se trabaja en diseñar diferentes agentes biológicos (anticuerpos monoclonales, proteínas de fusión, proteínas humanas recombinantes), dirigidos a modificar la inflamación en la psoriasis. Estos medicamentos tienen que ser aprobados por las entidades regulatorias para su uso en la psoriasis [34]. Estos tratamientos están indicados para pacientes adultos con psoriasis en placas de moderada a grave que no han respondido a tratamientos tópicos o sistémicos, han tenido contraindicaciones o presentan intolerancia/efectos adversos a los tratamientos sistémicos convencionales. La elección de un tratamiento biológico debe hacerse de manera personalizada, tomando en cuenta factores como la presencia de enfermedades concomitantes, artropatía psoriásica, edad, peso del paciente y posibles efectos adversos que se pudieran presentar. Deben ser prescritos por dermatólogos con una amplia experiencia en tratamientos sistémicos antipsoriásicos [3].

Tabla 4. Tratamientos antipsoriásicos actuales (Adaptado de [5])

Tratamiento antipsoriásico	Fármaco
Tópico	Derivados de la vitamina D Retinoides Corticosteroides Alquitranes Urea Ácido salicílico
	UVB de banda ancha

Fototerapia	UVB de banda estrecha Láser excimer Psoraleno + UVA
Sistémicos	Metotrexato Acitretina Ciclosporina A Ésteres de ácido fumárico Sulfasalazina Hidroxiurea
Biológicos	Alefacept Efalizumab Ustekinumab Infliximab Etanercept Adalimumab

2.2.4 Tratamientos antipsoriásicos en fase de desarrollo

Los grandes avances de la tecnología molecular en los últimos años y la mejor comprensión de la fisiopatología de la psoriasis han ayudado al descubrimiento de nuevos medicamentos, particularmente del grupo de los biotecnológicos. Estos nuevos agentes van dirigidos a células específicas y moléculas implicadas en el desarrollo y mantenimiento de las placas psoriásicas [38].

El desarrollo de diversos medicamentos biológicos en la última década ha revolucionado totalmente la terapéutica de la psoriasis en placa de moderada a severa. Con una comprensión mayor de la inmunopatogénesis de la enfermedad, los efectos farmacológicos de los nuevos medicamentos se han vuelto más específicos. Aunque todavía no se comprende completamente la vía inmunológica, los modelos actuales enfatizan en la importancia del factor de necrosis tumoral (TNF), la interleucina IL-23 y la IL-17. Diversos fármacos biotecnológicos dirigidos a estas citocinas están en estos momentos en diversas etapas de su desarrollo.

De hecho, a pesar que muchos de estos medicamentos ha demostrado seguridad y eficacia en ensayos clínicos, la seguridad a largo plazo todavía está por determinarse [39].

Un ejemplo de ello es el Tildrakizumab, que se encuentra en fase III de investigación clínica. Se trata de un anticuerpo monoclonal humanizado, anti-IL-23p 19, diseñado para bloquear selectivamente la citocina IL-23. Este nuevo candidato terapéutico tiene un potencial de ayudar a controlar las células patógenas responsables del proceso inflamatorio en la psoriasis con un impacto limitado en el resto del sistema inmunológico [38][40]. Otros nuevos fármacos actualmente en fase de investigación se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Medicamentos antipsoriásicos en fases de desarrollo (Adaptado de [39])

Fármaco	Tipo de fármaco	Fase del estudio
Tildrakizumab	Anticuerpo monoclonal humanizado	Clínica fase III
BI 655066	Anticuerpo monoclonal	Clínica fase II
Guselkumab (CNTO 1959)	IgG1k anticuerpo monoclonal humano IL-23	Clínica fase III
Ixekizumab (LY2439821)	Anticuerpo monoclonal humanizado	Clínica fase III
ABT-122	Anticuerpo de dominio variable doble	Clínica fase II

2.2.5 Importancia del desarrollo farmacéutico en la psoriasis

La investigación y desarrollo de nuevos medicamentos tiene diversos beneficios, tales como mejorar el conocimiento de la etiología de la enfermedad y su impacto en la sociedad, generar nuevos conocimientos, permitir la transferencia de tecnología, promover el prestigio académico de las instituciones, generar empleos, etc. El desarrollo farmacéutico permite la obtención de nuevos medicamentos para

prevenir y tratar de manera más eficaz las enfermedades, para mejorar la calidad de vida de los pacientes y hacerla productiva, el objetivo de la investigación farmacéutica es desarrollar fármacos seguros y eficaces [14].

La psoriasis hasta la actualidad es una enfermedad que no tiene cura y continúa sin entenderse completamente su vía inmunológica. El desarrollo farmacéutico es de gran importancia para esta enfermedad ya que tiene como objetivo comprenderla y así desarrollar medicamentos eficaces y seguros que sean de gran utilidad en la terapia. Con la investigación de nuevos fármacos se busca disminuir en lo posible los síntomas de los pacientes y así mejorar su calidad de vida, de esta misma manera se intenta desarrollar un tratamiento que cure esta enfermedad.

Hoy día, los tratamientos antipsoriásicos están experimentando un cambio de paradigma sobre la base de importantes avances en el esclarecimiento de los mecanismos biológicos relacionados con su patogénesis y los nuevos tratamientos biotecnológicos son consecuencias directas de los descubrimientos realizados en la ciencia fundamental [41]. Sin embargo, el desarrollo de nuevos tratamientos para la psoriasis trae consigo una serie de retos adicionales que serán descritos a continuación [5]:

- 1) **La patogénesis de la psoriasis es objeto aún de debate en la comunidad científica, por lo que es difícil determinar con precisión las dianas farmacológicas.** Algunas de las interrogantes que quedan por resolver son las siguientes: a) La determinación de los antígenos que activan la respuesta inflamatoria celular y la elucidación de sus interacciones con los factores genéticos; b) la identificación de factores genéticos que conllevan a la alteración de la respuesta inmune; c) la caracterización de las respuestas aberrantes de los queratinocitos psoriásicos en el contexto de la activación del sistema inmune conduciendo al desarrollo de las placas; d) el estudio de las disfunciones en los linfocitos T, neutrófilos y células presentadoras de antígenos y su relación con la respuesta inmunitaria anormal de estos pacientes[5].

- 2) **La psoriasis no cuenta con biomarcadores que permitan predecir el pronóstico de la enfermedad ante una acción farmacológica determinada.** Nuevas investigaciones son necesarias para identificar y validar biomarcadores de éxito terapéutico sobre todo en etapas tempranas de la investigación de nuevos fármacos. Además resulta necesario establecer cómo las variaciones individuales en el comportamiento de los biomarcadores podrían estar primaria o secundariamente asociadas con la patogénesis de la enfermedad[5].
- 3) **No existen modelos animales validados que imiten todas las características de la enfermedad.** La psoriasis es una enfermedad exclusiva de los seres humanos, por lo que los modelos en ratas (los más utilizados) no imitan completamente las características de la enfermedad. La mayoría de estos modelos no reflejan las interacciones complejas entre los diferentes tipos de células que tiene lugar en la psoriasis. Por demás, las diferencias inherentes entre la piel murina y humana en cuanto al grosor de la epidermis, la densidad de los folículos pilosos, el programa de diferenciación de los queratinocitos y la composición del infiltrado inmune limitan el valor predictivo de estos modelos animales para el desarrollo de nuevos tratamientos farmacobiológicos [5].
- 4) **Debido a su naturaleza crónica, la psoriasis requiere de largos tratamientos.** La minimización de los efectos adversos de las nuevas terapias es un aspecto muy importante en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. La duración de los estudios clínicos debe ser tal que permita la evaluación de la toxicidad a largo plazo[5].
- 5) **Una alta proporción de pacientes presentan comorbilidades.** La alta proporción de pacientes con comorbilidades hace complejo y difícil el desarrollo de terapias. Los nuevos tratamientos deben ser también evaluados en estos pacientes durante los estudios clínicos en vistas a tener escenarios más realistas y a prevenir la presencia de efectos adversos graves e interacciones medicamentosas[5].

- 6) **La psoriasis se presenta en pacientes pediátricos (4.1% de las dermatosis antes de los 16 años).** Resulta necesario evaluar la capacidad reservorio de la piel en niños de diferentes edades y la variabilidad en cuanto a la absorción percutánea de acuerdo a la localización de las placas y al grado de severidad para minimizar los efectos secundarios[5].

2.3 LOS POLIFENOLES

Son el grupo más abundante de sustancias que no son energéticas presente en los alimentos de origen vegetal. Por definición se trata de moléculas que contienen uno o más de un grupo fenólico en su estructura química. Estudios recientes han demostrado que una dieta rica en polifenoles vegetales ayudan a mejorar la salud [7]. Estas moléculas son el principio activo de muchas plantas medicinales, modulan una amplia gama de enzimas y receptores de las células [42].

La razón principal del gran interés que se ha generado por estos compuestos son sus propiedades antioxidantes, su gran abundancia, y su probable función en la prevención de diversas enfermedades asociadas con el estrés oxidativo, como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y neurodegenerativas [42].

La literatura científica muestra que una dieta rica en compuesto fenólicos podría ayudar a evitar el daño oxidativo que provoca el envejecimiento, así como las enfermedades relacionadas con la edad, al eliminar los radicales libres del metabolismo celular. Teniendo efectos biológicos (antioxidantes, antivirales, antimicrobianos, antitumorales y antibacterianos), participan en la protección contra las acciones dañinas de las especies reactivas del oxígeno [43]. Esto puede deberse, por lo menos en alguna parte, a las características fisicoquímicas de estos compuestos, que le permiten participar en diversas reacciones metabólicas celulares de óxido-reducción [7]. Algunos de los polifenoles son indispensables para las funciones fisiológicas de las plantas, y otros tienen la función de defensa ante situaciones de estrés y diversos estímulos (hídrico, luminoso, etc.) [7].

2.3.1 Clasificación

Estos compuestos se han clasificado de diferentes maneras, considerando su fuente de origen, función biológica y estructura química. La mayoría de los polifenoles en las plantas existen como glucósidos y azúcares acilados en diferentes posiciones de su estructura [44]. Para simplificar todas estas clasificaciones el presente trabajo clasificará a los polifenoles de acuerdo a su estructura química. Los polifenoles de acuerdo a su estructura se clasifican dependiendo el número de anillos fenólicos que poseen y de los elementos estructurales que presentan dichos anillos. Los grupos principales son: ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos, lignanos y taninos [7][42][43].

Ácidos fenólicos

Los ácidos fenólicos son compuestos polifenólicos no flavonoides, que a su vez se subdividen en dos subgrupos: ácidos hidroxibenzoicos y ácidos hidroxicinámicos, caracterizados por la presencia de un esqueleto C6-C1 y C3-C3 respectivamente [43][44]. El carácter ácido de estas moléculas es debido a la presencia de un grupo carboxilo. Mientras que las frutas y verduras contienen ácidos fenólicos de forma libre, en los granos y semillas se encuentran de forma ligada. Los ácidos fenólicos sólo pueden liberarse o hidrolizarse por una hidrólisis ácida o alcalina, o por algunas enzimas [43]. El ácido hidroxibenzoico contenido en las plantas de consumo humano es generalmente bajo, presentando algunas excepciones en algunas frutas rojas, rábano negro y las cebollas. Estos son componentes de estructuras más complejas como los taninos hidrolizables (galotaninos en mangos y los elagitaninos en frutos rojos como fresas, bayas, etc.). Los ácidos hidroxicinámicos son más comunes y consisten básicamente en ácido p-cumárico, cafeico, ferúlico y sináptico [42].

Flavonoides

Los flavonoides son moléculas de bajo peso molecular que tiene un esqueleto en común de difenilpirano (C6-C3-C6), constituido por dos anillos fenilo (A y B) unidos a través de un anillo de pirano heterocíclico (C)[7][44]. Todos los flavonoides

tienen estructuras hidroxiladas en sus anillos aromáticos. Estos se encuentran por lo general en forma de glucósidos, pero también se presentan en forma libre (agliconas flavonoides), además, se pueden presentar como sulfatos, dímeros ó polímeros. Los glucósidos se encuentran en dos formas: como O-glucósidos con los carbohidratos ligados a través de átomos de oxígeno, o como C-glucósidos ligados a través de enlaces carbono-carbono [7].

Los flavonoides se dividen en diferentes subgrupos, los cuales se clasifican en función del estado de oxidación de su anillo heterocíclico (anillo C) y la posición del anillo B. Los principales subgrupos son: flavonoles, flavonas, flavanonas, isoflavonas, antocianidinas y flavonoles [7].

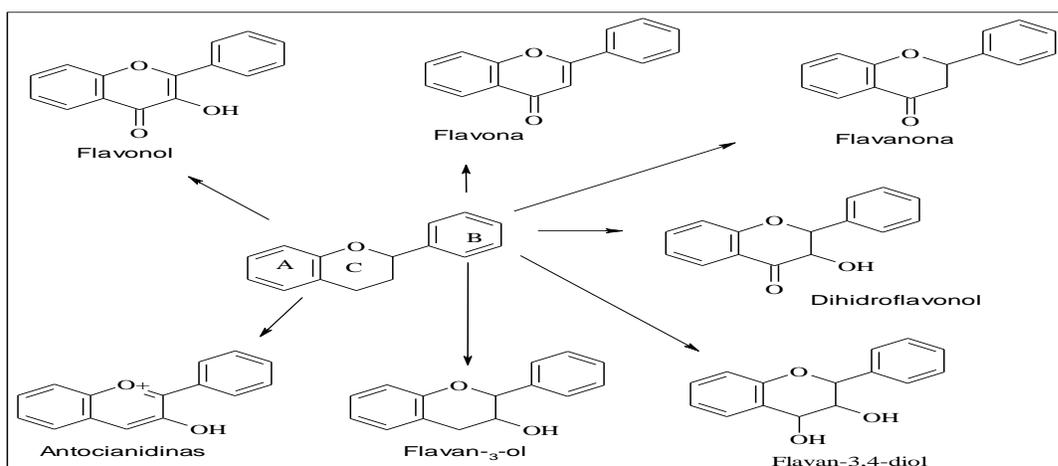


Figura 3. Familia de los flavonoides (tomado de [9])

Estilbenos

Los estilbenos son un grupo de compuestos derivados de fenilpropanoides caracterizados por tener un esqueleto de 1,2-difeniletileno (C6-C2-C6) [43]. Se encuentran en bajas concentraciones en la dieta humana, teniendo como principal representante al resveratrol [42][43]. Varios estudios han indicado que este estilbeno tiene la capacidad de prevenir el cáncer y enfermedades coronarias, neurológicas y degenerativas [43]. El resveratrol se encuentra presente en el vino el cual se vincula a la paradoja francesa. Los franceses tienen una dieta rica en grasas saturadas, pero tienen una menor incidencia de enfermedades

cardiovasculares que otros países desarrollados, esto se atribuye a su costumbre de beber vino tinto regularmente donde entre otros polifenoles se encuentra el resveratrol [43][45].

Lignanos y neolignanos

Los lignanos se forman a partir de dos unidades de fenilpropano unidas mediante puentes de hidrógeno en la cadena lateral [42][43][46]. Por lo general se presentan como glucósidos. Son una de las principales clases de fitoestrógenos por tener una estructura similar al estrógeno. Las frutas no son la principal fuente dietética de lignanos, sino que la mayor cantidad de estos compuestos se encuentra en la linaza [43]. Los lignanos son metabolizados en el tracto gastrointestinal como enterodiol y enterolactona los cuales tienen propiedades estrogénicas y antiestrogénicas [42][43]. Se denomina lignano cuando las unidades se unen entre el ácido y/o el alcohol, mientras que cuando se unen las moléculas de propenilbenceno y/o alilbenceno se le denomina neolignano [46].

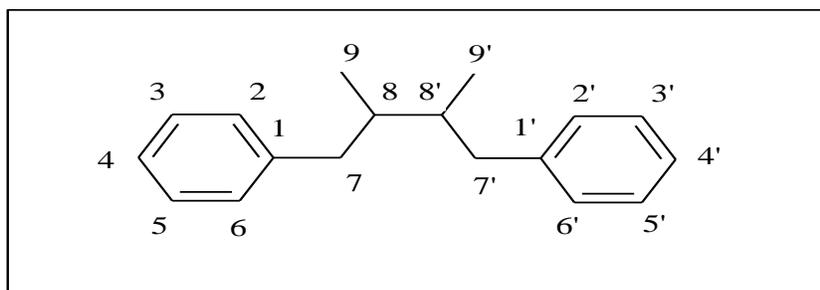


Figura 4. Estructura de los lignanos (tomado de [9])

Taninos

Los taninos son sustancias astringentes y amargas [43]. Estos son compuestos fenólicos hidrosolubles con un peso molecular aproximadamente de entre 500 y 3000 Da, los cuales son los responsables de precipitar algunas proteínas para convertir la piel de los animales en cuero. Se clasifican en dos grupos: hidrolizables y no hidrolizables o condensados, estos compuestos contienen un

número importante de grupos hidroxilo entre sus grupos funcionales, los cuales les dan la capacidad de poder unirse a proteínas y otras macromoléculas [46].

Los taninos hidrolizables tienen en su núcleo central un alcohol polihídrico como la glucosa y grupos hidroxilo que se encuentran esterificados parcial o completamente al ácido gálico o al ácido hexahidroxidifénico, formando los galotaninos y elagitaninos respectivamente. Los taninos condensados son llamados también proantocianidinas que constan de unidades monoméricas de flavanos ligados por medio de enlaces carbono-carbono y uniones éter. Se han identificado 15 subgrupos de proantocianidinas pero sólo 3 tienen importancia para la dieta vegetal de los humanos, estos son: procianidinas, prodelfinidina y propelargonidina [46].

2.3.2 Vías biosintéticas para los polifenoles en las plantas

La biosíntesis de los compuestos fenólicos como productos del metabolismo secundario en las plantas se realiza a través de dos importantes rutas primarias: la ruta del ácido shiquímico o shikimato y la ruta de los poliacetatos [7][44][47]. En la ruta del ácido shiquímico se sintetizan los aminoácidos aromáticos (fenilalanina o tirosina), y el ácido cinámico y sus derivados (fenoles sencillos, ácidos fenólicos, cumarinas, lignanos y derivados del fenilpropano), mientras que en la ruta de los poliacetatos se sintetizan las quinonas y las xantonas [7].

La ruta del ácido shiquímico es dependiente de la luz. Esta se inicia en los plastos por condensación de dos productos fotosintéticos, la eritrosa-4-fosfato, que proviene de la vía de las pentosa fosfato, y el fosfoenolpiruvato [7]. Esta ruta puede continuar con la adición de una segunda molécula de fosfoenolpiruvato, dando como resultado la fenilalanina. La fenilalanina entra a formar parte del metabolismo secundario de las plantas por acción de la enzima fenilalanina amoniliasa, que funciona como catalizador para eliminar el grupo amonio, convirtiendo a la fenilalanina en el ácido trans-cinámico, posteriormente este se convierte en p-cumárico por la incorporación de un grupo hidroxilo a nivel del anillo aromático. La coenzima A (CoA-ligasa) transforma el ácido p-cumárico en p-

cumaroilCoA, el cual es el precursor de la mayoría de los fenoles encontrados en el reino vegetal [7][44][47].

La ruta de los poliacetatos inicia a partir de una molécula inicial de acetilCoA, que mediante diversas condensaciones originan los poliacetatos. Cuando estos son reducidos dan como resultado a los ácidos grasos, que por ciclaciones posteriores forman una gran variedad de compuestos aromáticos, como son las quinonas y otros metabolitos que se generan a través de rutas mixtas. Estas rutas combinan precursores tanto de la vía del ácido shikímico como los de la ruta de los poliacetatos. Este es un importante grupo de moléculas biológicamente activas, llamadas genéricamente flavonoides [7].

2.3.3 Métodos de extracción y purificación de polifenoles

En la extracción de compuestos fenólicos se deben tomar en cuenta varios parámetros para seleccionar las condiciones de extracción óptimas. La preparación de la muestra tiene un papel muy importante en la cuantificación de los polifenoles de origen vegetal. Para lograr una máxima extracción de estas moléculas, es recomendado probar parámetros diferentes, como los disolventes, la agitación, el tiempo de extracción, la relación solvente/ disolvente, la temperatura, la eficiencia de la transferencia de masa y el tamaño de partícula [43]. También es importante el pH del disolvente, debido a que la mayor parte de las extracciones se realizan en condiciones ácidas porque los polifenoles son generalmente más estables en pH bajos, la condición ácida favorece a que permanezcan neutrales, por lo tanto son fácilmente extraíbles con disolventes orgánicos. Esto se hace usando ácidos débiles o ácidos fuertes en concentraciones bajas [44].

Extracción por maceración

La maceración consiste en extraer los principios activos de la planta o de alguna parte de ella a temperatura ambiente, utilizando agua o algún otro disolvente como

por ejemplo alcohol o aceite. Sencillamente se trata de poner en remojo a la planta o alguna de sus partes que se va utilizar lo mejor triturada que sea posible [48].

Extracción con Soxhlet

La extracción con Soxhlet es una herramienta muy útil para propósitos preparativos en la que el analito a extraer se encuentra a partir de la matriz como un todo o se separa de sustancias interferentes. En el Soxhlet la muestra pulverizada se coloca en un cartucho de materia porosa y durante su funcionamiento se sumerge gradualmente en un disolvente que condensado proveniente de la destilación de Sask, cuando este alcanza un nivel de sobrepresión, un sifón aspira todo el contenido del dedal y lo descarga nuevamente a la destilación de Sask. Esta operación se repite hasta conseguir una extracción completa [49].

Extracción asistida por ultrasonido

Este es un método rápido y eficaz para extraer compuestos fenólicos a partir de plantas y frutas, siendo más eficiente que otras técnicas ya que esta extrae en un menor tiempo los analitos que se encuentran en diferentes matrices. El aumento del rendimiento de extracción de los polifenoles por esta técnica es debido a la disrupción de las paredes celulares por las ondas ultrasónicas, lo que se ve favorecido por una reducción del tamaño de partícula y un aumento en la transferencia de masa de los contenidos celulares al disolvente, provocado por el colapso de las burbujas producidas por cavitación [43].

Extracción líquido-líquido

Es una operación en la cual hay una transferencia de masa de una solución líquida (alimentación) que contiene uno o más solutos con un líquido inmiscible (disolvente). El disolvente debe tener una afinidad o selectividad para uno o más de los componentes presentes en la solución líquida de partida. Esto da como resultado dos flujos: el extracto y el residuo [50].

Extracción líquido-sólido

Es un método en el cual ocurre una transferencia de masa a partir de una matriz sólida que emigra a un disolvente puesto en contacto [50].

Extracción de fluidos supercríticos (SFE)

Estos métodos son rápidos, automáticos, selectivos y evitan el uso de grandes cantidades de disolventes, además, debido a la ausencia de luz y aire durante la extracción reduce los procesos de degradación que suelen ocurrir durante otras técnicas tradicionales de extracción. Los SFE se basan en el hecho de que, cerca del punto crítico, el disolvente cambia rápidamente sus propiedades físicas con sólo ligeras variaciones de presión. El fluido crítico más utilizado es el dióxido de carbono supercrítico (DC-CO₂), debido a sus propiedades benignas para el medio ambiente, baja toxicidad, no inflamabilidad y compatibilidad, además, posee características críticas modestas, puede separarse con facilidad de los solutos y es barato [50].

Extracción por microondas

En esta técnica suele utilizarse adicionalmente algún método convencional como la hidro-destilación o se adapta un equipo para establecerlo como un método independiente, como la extracción por microondas sin disolvente (SFME), la cual combina el calentamiento por microondas sin disolvente y la destilación. No es necesario agregar agua o cualquier otro disolvente si se utiliza material fresco, en caso de emplearse material seco este se rehidrata con agua y se elimina el exceso drenándola antes de la extracción. Este método ofrece ventajas como la reducción considerable de energía y tiempo, además, que es posible realizarse a gran escala utilizando reactores de microondas, pero es necesario tener altos niveles de seguridad [51]. Estas metodologías implican la co-extracción de sustancias no fenólicas, como azúcares, ácidos orgánicos y proteínas, que requieren procesos posteriores de purificación [50].

Purificación usando extracción líquido-líquido.

Este método consiste en tratar una mezcla de compuestos con un disolvente de una forma que uno de los componentes se disuelva en el disolvente y el resto no lo haga. Los compuestos orgánicos en disoluciones acuosas se extraen normalmente agitando vigorosamente la solución con un disolvente orgánico no miscible. Este proceso es realizado en un embudo de decantación [52].

El proceso es gobernado por la ley de la distribución o de reparto, el cual nos dice que para un soluto “A” distribuido libremente entre dos fases se cumple:

$$K = [A_o] / [A_w]$$

[A_o]= Concentración del soluto en la fase orgánica

[A_w]= Concentración del soluto en la fase acuosa

K= Coeficiente de reparto

El soluto “A” se distribuye entre las dos fases en función de su solubilidad llegando a un equilibrio de partición dinámico. Una vez alcanzado el equilibrio se establece una diferencia entre la relación de concentración en las dos fases. La relación de concentraciones es independiente de la cantidad total de “A” [52].

Mediante extracciones sucesivas con cantidades pequeñas del disolvente extractante, se separa mayor cantidad de soluto que con una sola extracción en la que sea utilizado todo el volumen de extractante [52]. El acetato de etilo es muy utilizado como disolvente extractante para purificar extractos crudos de fracciones ricas en flavonoides y proantocianidinas oligoméricas[9]. Un ejemplo de purificación con acetato de etilo de compuesto fenólicos es el método utilizado por García-Pérez y colaboradores en 2012. El proceso fue el siguiente, se secaron 50 g de corteza de abeto negro en horno, primero se extrajeron 500 mL en agua caliente en reflujo durante una hora, los sólidos se separaron por filtración con papel filtro, posteriormente se filtró con crisol Goosh, el filtrado se recogió en un matraz Erlenmeyer. La solución se desgrasó primero con hexano y a continuación se purificó con acetato de etilo, finalmente para eliminar el acetato de etilo de la fracción orgánica, este se evaporó al vacío con ayuda del rotavapor, se resuspendió con agua y se liofilizó [53].

Purificación de polifenoles por cromatografía

Lastécnicas cromatográficas se utilizan en la purificación, análisis cualitativo y cuantitativo de los polifenoles, siendo utilizadas principalmente: la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de corriente de contador de alta velocidad (HSCCC), cromatografía de flúidos supercrítica (SFC). También son utilizadas otro tipos de cromatografías como lo son las cromatografías en papel (PC) y en capa fina (TLC)[50].

Purificación por electroforesis capilar (CE)

La electroforesis capilar es indicada para la separación de compuestos polares y cargados de compuestos de bajo a medio peso molecular. Es una herramienta analítica versátil para la determinación de una amplia variedad de compuestos fenólicos en diferentes tipos de muestras debido a su alta eficiencia de separación, potencia de alta resolución, tiempo de análisis corto y bajo consumo de reactivos [50].

2.3.4 Polifenoles estudiados para el tratamiento de la psoriasis

Aunque los polifenoles se han sugerido como candidatos terapéuticos para el tratamiento de la psoriasis, los estudios existentes en la literatura científica son relativamente escasos. Los polifenoles que contiene el cacao tienen efectos antioxidantes y anti-inflamatorios, siendo capaces de inhibir al TNF- α el cual es una citoquina pro-inflamatoria que posee un papel fundamental en la patogénesis de enfermedades inflamatorias como el cáncer y la psoriasis [54].

Un estudio realizado en 2010 por García-Pérez y colaboradores demostró que el extracto de abedul amarillo obtenido por maceración y el extracto de abeto obtenido por extracción con agua caliente tenían una mayor capacidad antioxidante comparativamente a otros extractos obtenidos a partir de cortezas de especies canadienses. El extracto de *Picea mariana* fue considerado menos tóxico para los queratinocitos humanos normales, mostrando un potencial antiproliferativo [55].

La fracción soluble de acetato de etilo obtenida de la corteza de *Picea mariana* demostró tener propiedades anti-inflamatorias y anti-oxidantes, también se demostró que este mismo extracto poseía un alto contenido de fenoles y flavonoides totales y una baja toxicidad en los queratinocitos de los humanos, así como una reactividad química adecuada frente a diferentes radicales libres implicados en la psoriasis [53]. Además, este extracto, mostró un efecto anti-TNF tanto en queratinocitos normales como psoriásicos con una mayor efectividad que la dexametasona, un corticosteroide empleado usualmente en el tratamiento de la psoriasis. Este efecto fue atribuido a su capacidad para bloquear la vía de señalización relacionada con el factor de transcripción NF-kappa B [56].

2.4 EL GÉNERO QUERCUS

El género *Quercus* dentro de la familia Fagaceae es el que presenta una mayor distribución en el mundo. Este se encuentra con frecuencia en todos los bosques templados del hemisferio norte [56][57]. También se encuentran en regiones tropicales y subtropicales del mismo. Incluso se han descrito especies en lugares más secos, como el sureste de Asia y el nororiente de África. En el continente Americano se distribuye desde Canadá hasta Colombia, incluyendo Cuba [57].

La cantidad específica total de especies del género *Quercus* es difícil de precisar. Algunos autores estiman que esta oscila alrededor de 300 o 400, otros opinan que ha aproximadamente 500 o 531 especies. Los menos conservadores piensan que puede llegar hasta alrededor de 600 taxa específicos en todo el mundo [57].

Se reconocen dos centros de diversidad para este género. El primero se encuentra en el sureste de Asia con alrededor de 125 especies. El segundo se localiza en México, principalmente en las regiones montañosas, en su mayoría en los bosques templados [57].

2.4.1 Distribución del género *Quercus* en México

El género *Quercus* presenta un centro de diversificación en México, ya que de las 450 especies estimadas a nivel mundial, entre 135 y 150 se encuentran en nuestro

país, y de ellas 86 son consideradas endémicas [8][58]. Los encinos representan una parte importante de los componentes florísticos en diversas comunidades templadas y tropicales del país. Como arbustos forman parte de diversos matorrales y como árboles conforman comunidades vegetales características de las zonas montañosas de México [8].

Tabla 6. Número de especies de encinos por subgéneros (especies estudiadas 112) en diferentes regiones geográficas y el país (Tomado de [59]).

Región	<i>Erythribalanus</i>	<i>Lepidobalanus</i>	<i>Protobalanus</i>
Noroeste	19	25	3
Noreste	17	28	0
Occidente	25	28	0
Centro	33	33	0
Sur y Sureste	27	22	0
Total país	52	57	3

Diversidad de encinos en México

El estado con mayor riqueza de especies del género *Quercus* es Oaxaca con un total de 48 especies descritas, seguido por Nuevo León con 47. A éstos le siguen Jalisco con 45, Chihuahua con 40 y Veracruz con 38. Por otro lado, los estados que presentan menos diversidad de encinos son la Península de Yucatán, Campeche, y Tabasco en donde solo se presenta *Q. oleoides*. En Quintana Roo no se desarrolla ninguna especie [57]. Los estados en los que se tiene mayor información científica sobre los encinos son: Jalisco, Guerrero, México y Michoacán. El estado de Michoacán cuenta con una gran variedad de encinos entre los que se encuentran 30 especies diferentes aproximadamente: *Q. acutifolia*, *Q. candicans*, *Q. castanea*, *Q. conspersa*, *Q. crassifolia*, *Q. cassipes*, *Q. desertícola*, *Q. dysophylla*, *Q. Elliptica*, *Q. frutex*, *Q. gentry*, *Q. glabrescens*, *Q. glaucescens*, *Q. glaucoides*, *Q. laeta*, *Q. laurina*, *Q. magnoliifolia*, *Q. martinezii*, *Q. obtusata*, *Q. peduncularis*, *Q. Planipocula*,

Q. resinosa, Q. rugosa, Q. salicifolia
née, Q. scytophylla, Q. sideroxylla, Q. splendens, Q. subspathulata, Q. tuberculata, Q. uxor
is[60].

Patrones de la distribución de especies a nivel estatal dentro de México:

- 1) **Especies de distribución amplia:** Estas especies comprenden solo aquellas que se localizan en más de 15 estados, estas son *Q. candicans, Q. castanea, Q. crassifolia, Q. laeta, Q. microphylla, Q. obtusata* y *Q. rugosa*. Siendo esta última la que mayor distribución presenta en el país [57].
- 2) **Especies de distribución amplia media:** Especies que se presentan entre 10 y 15 estados, estas son: *Q. chihuahuensis, Q. deserticola, Q. glaucoides, Q. greggii, Q. grisea, Q. laurina, Q. magnolifolia* y *Q. polymorpha* [56].
- 3) **Especies de distribución media:** Especies que se localizan entre 3 y 9 estados, aquí se encuentran la mayoría de especies (74), incluyendo *Q. arizonica, Q. corrugata, Q. germana, Q. glaucescens, Q. liebmanii, Q. martinezii, Q. splendens, Q. acherdophylla, Q. aristata, Q. emori* y *Q. pinnativenulosa* [57].
- 4) **Especies con distribución en sólo dos estados:** Corresponden a 25 especies ejemplificadas por *Q. rubramenta, Q. hirtiifolia, Q. canbyi* y *Q. benthamii* [57].
- 5) **Especies con distribución en sólo un estado:** 42 especies presentan presencia en un solo estado, algunos ejemplos de estas son *Q. macdougallii, Q. monterreyensis, Q. cualensis, Q. hintoniorium* y *Q. cedrosensis*. Entre éstas son incluida 15 especies que además se distribuyen en Estados Unidos o en Centroamérica, resultando únicamente 27 las que se encuentran en un solo estado de México [57].

Tabla 7. Número de especies endémicas de *Quercus* por estado (Tomado de [57]).

Estados	<i>Quercus</i>	<i>Lobatae</i>	<i>Protobalanus</i>	Totales
Baja California	0	1	1	2
Baja California Sur	1	1	0	2
Coahuila	1	1	0	2
Chiapas	0	2	0	2
Chihuahua	1	0	0	1
Durango	1	0	0	1
Hidalgo	0	1	0	1
Jalisco	0	2	0	2
Nuevo León	4	6	0	10
Oaxaca	1	2	0	3
Veracruz	1	0	0	1
Total	10	16	1	27

Distribución altitudinal

De forma general los encinos se encuentran en México desde el nivel del mar hasta los 3500 m sobre el nivel del mar (snm). Las especies de encinos blancos se distribuyen entre 0 y 3500 m snm, y los intervalos por especie oscilan entre 150 y 2000 m. Los encinos rojos se encuentran desde los 150 hasta 3100 m snm, con intervalos por especie de 150 a 1900 m [57][57].

Quercus crassifolia

Aunque existen diferentes tipos de encinos, por la importancia que reviste para el presente trabajo se particularizará en la especie *Q. crassifolia*. Estos encinos se distribuyen en los estados de Chihuahua, Sinaloa, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Aguascalientes, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Estado de México, Ciudad de México, Morelos, Tlaxcala, Puebla y Veracruz. Crecen de manera idónea en altitudes que oscilan entre los 1800- 2800m snm. Se conocen comúnmente como encino, chicharrón, encino roble, encino hoja ancha, encino blanco, encino colorado, encino prieto, jicarillo, encino hoja rasca [61].

2.4.2 Importancia medicinal de las especies del género *Quercus*

El género *Quercus* es utilizado para diversos fines como lo son: el uso leñoso, alimenticio, forraje, artesanal, como colorante y el medicinal, siendo este último de los más importantes ya que concentra el 96% de las especies del género reportadas en la literatura y en los herbarios [8]. Los polifenoles que se encuentran en los encinos le confieren efectos biológicos (antioxidantes, antivirales, antimicrobianos, antitumorales y antibacterianos) [43]. Todas estas características son las que han generado un gran interés para su estudio, resultando ser muy importantes en el tratamiento de diversas enfermedades.

En el uso medicinal se emplean casi todas las partes de la planta: cortezas, hojas, flores, raíces y agallas. Se han documentado 31 enfermedades (tabla 8) que son tratadas con este género, relacionadas con los diferentes aparatos y sistemas del cuerpo humano de las cuales se destacan las patologías que se relacionan con el sistema digestivo y la piel, utilizándose principalmente la corteza y las hojas [8].

Tabla 8. Padecimientos o enfermedades tratadas con el género *Quercus* (Tomado de [8])

Aparato o sistema	Padecimiento
Aparato bucal	Inflamación y sangrado de encías, dolor de garganta y muelas, dientes flojos, estomatitis, hematitis, úlceras bucales, gingivitis
Aparato digestivo	Gastritis, dolor de estómago, diarrea, disentería, hemorragias intestinales, cáncer de estómago e intestinos, inflamación intestinal, acedías
Piel	Heridas, granos, quemaduras, llagas, infección de la piel, caída del cabello
Aparato reproductor	Lavados vaginales, hemorragias vaginales, desviación de la matriz, baño posparto, enfriamiento después del parto, concepción, alteraciones ginecobstétricas
Aparato circulatorio	Corazón, circulación de la sangre

Aparato urinario	Cistitis, dolor al orinar
Aparato respiratorio	Pulmones, tos
Sistema nervioso	Excitación nerviosa, contra los ataques nerviosos
Sistema muscular	Dolor muscular
Otros	Diabetes, hemorragias

2.4.3 Polifenoles identificados dentro del género *Quercus*

Informes etnobotánicos mencionan que las infusiones de las especies de *Quercus spp* solas o combinadas con otras plantas tienen efectos anticarcinógenos en pacientes con cáncer gástrico, estudios demuestran que esta capacidad protectora contra los daños ocasionados por el etanol en el estómago está relacionada con la presencia de ácido tánico, quercetina y ácido elágico que son polifenoles que posee este género. Así mismo se han obtenido compuestos fenólicos oligoméricos en extractos acuosos de *Q. ilex* y un estudio para elucidar la composición química de *Q. infectoria* arrojó como resultado, que este contiene galotaninos y ácido elágico [62].

Un estudio realizado en 2014 por Cabeza de Vaca y colaboradores demostró que el extracto obtenido de la mezcla de MeOH:H₂O (80:20 v/v) de la pulpa de bellotas de *Quercus ilex* contenían α -tocoferol, γ -tocoferol, taninos condensados, así como los polifenoles totales (4.91 \pm 35.19 mg AG/g), estos últimos fueron determinados por el método de Folin-Ciocalteu [63].

El estudio de la composición polifenólica del extracto acuoso de la mezcla de MeOH/ H₂O (80:20) y *Quercus suber* de diferentes provincias de España realizado por Conde y colaboradores arrojó como resultado que esta especie contenía: ácido gálico, ácido protocatequínico, aldehído protocatético, aesculetin, ácido vanílico, ácido cafeico, vanilina, escopoletina, ácido ferúlico, conifalaldehído, sinapaldehído, ácido elágico, roburina A, granidin, vescalagina, roburina E y castalagina [64].

2.4.4 Estudios toxicológicos realizados a polifenoles del género *Quercus*

Los estudios toxicológicos realizados a los polifenoles del género *Quercus*, reportados en la literatura científica son insuficientes, encontrándose solamente 4 estudios. En el primero se realizó un estudio de toxicidad aguda del extracto de *Q. crassifolia* en nauplios de *Artemia Franciscana*, utilizando concentraciones de 10 mg/L, 100 mg/L, 500 mg/L, 1 g/L, realizando una lectura a las 24, 48 y 74 horas después de la administración, el resultado de este estudio no evidenció toxicidad aparente a la concentración más alta (1g/L) y al tiempo de exposición más prolongado (72 horas), ya que los nauplios seguían con vitalidad, sin impacto en su morfología, sin embargo, el nado de los organismos expuesto fue más lento en comparación al grupo control [9].

El segundo estudio se realizó con hojas y bellotas de *Quercus robur* sobre dos terneros machos. A uno de los animales se le administró por vía oral 10.7 Kg de hojas y bellotas jóvenes molidas repartidas en 6 dosis de 15-20 g/Kg de peso vivo cada 5 días durante 30 días. El segundo recibió una dosis total de 22.8 Kg de hojas y bellotas maduras en dosis diarias de 10-15 g/Kg durante 22 días. Se evaluó a los animales diariamente durante el experimento (temperatura corporal, frecuencia cardio-respiratoria y movimiento ruminales). Al término del estudio los animales fueron sacrificados, se les realizó la necropsia y un estudio histopatológico. Los resultados obtenidos en este estudios fueron los siguientes: en ninguno de los animales se manifestaron variaciones significativas en la frecuencia respiratoria (34.5 ± 3.1 resp/min), frecuencia cardíaca (69.1 ± 0.006 lat/min), temperatura rectal ($38.6 \pm 0.17^\circ\text{C}$), urea en suero (3.7 ± 0.6 mmol/L), creatinina (91.0 ± 5.50 mmol/L) y el estudio histopatológico demostró nefrosis leve a moderada, con degeneración hidrópica de los túbulos proximales, cilindros hialinos o granulares y moderado edema a nivel del intersticio intertubular [65].

En tercer estudio toxicológico determinó la actividad enzimática metabólica en *Neotoma macrotis* y *Neotoma lepida* con *Q. Agrifolis*, el cual contiene polifenoles considerados tóxicos para la mayoría de los mamíferos. Los animales recibieron una dieta de 70% del encino en cuestión. Los resultados obtenidos demostraron

que la actividad de 5 de las enzimas principales (citocromo P450, NAD(P)H/quinona oxidoreductasa, UDP- glucuronosiltransferasa (UGT), sulfotransferasa (SULT), y glutatión S-transferasa (GST)) no presentaron diferencia en su actividad con respecto al grupo control [66].

Otro de los estudios encontrados examinó la sangre de cabras Mamber de 2-3 años que recibieron hojas de *Q. calliprinos*. Las cabras no presentaron efectos tóxicos tras el consumo de 10-23 Kg/día de hojas ricas en taninos. Esto indica que las cabras pueden adaptarse al ambiente nutricional donde se encuentren, incluso si llegaran a consumir grandes cantidades de taninos (1.1-2.7 g/Kg de peso corporal por día) [67]. El escaso número de estudios toxicológicos realizados a extractos polifenólicos provenientes del género *Quercus* limita la comprensión sobre los efectos adversos que pudieran ocasionar el uso de extractos y moléculas aisladas de este género para el desarrollo en un futuro de nuevos medicamentos para el tratamiento de la psoriasis [9].

3. JUSTIFICACIÓN

México al ser uno de los centros de diversificación del género *Quercus* presenta una gran cantidad de encinos, de las 450 especies que se estiman que existen a nivel mundial, en nuestro país se encuentran entre 135 y 150, de las cuales 86 son consideradas endémicas. Los encinos representan una parte importante de los componentes florísticos en diversas comunidades templadas y tropicales del país. Como arbustos forman parte de diversos matorrales y como árboles conforman comunidades vegetales características de las zonas montañosas de México [8]. En el caso específico de Michoacán, los encinos satisfacen 80% de las necesidades energéticas en forma de leña y carbón [60]. Tomando todos estos aspectos en cuenta, se puede considerar que la cantidad de cortezas de estas especies como consecuencia de la explotación forestal en el país es considerablemente grande, por lo cual resultaría oportuno su estudio con el objetivo de proponer nuevas aplicaciones en el campo farmacéutico que permitan su aprovechamiento racional.

Una de las vías más interesantes para proponer nuevas aplicaciones a estos residuos es la obtención de extractos naturales, ricos en moléculas bioactivas como polifenoles, los cuales podrían utilizarse para el tratamiento de enfermedades que aún no tienen cura como la psoriasis. Los polifenoles son moléculas naturales, omnipresentes en el reino de las plantas, reconocidas como excelentes antioxidantes y antiinflamatorios que han demostrado su potente efecto anti-TNF alfa, superior a la dexametasona, en queratinocitos psoriásicos [56]. El uso de polifenoles es muy alentador para el tratamiento de este tipo de enfermedades; sin embargo, aún se requiere de estudios adicionales toxicológicos y farmacológicos para cumplimentar con las etapas requeridas durante el desarrollo farmacéutico y que puedan ser considerados candidatos terapéuticos para el tratamiento de la psoriasis.

La revisión de la literatura muestra que la mayoría de las investigaciones que se relacionan con la determinación de la composición polifenólica y los efectos toxicológicos de especies del género *Quercus* se han llevado a cabo en especies europeas como *Q. rubra*, mientras que los estudios realizados a especies mexicanas del género son muy poco o casi inexistentes.

Debido a esto la presente investigación propone la extracción, purificación y el estudio de las propiedades toxicológicas del extracto polifenólico de *Q. crassifolia*, encino que se explota forestalmente en el estado de Michoacán. Lo anterior se realizará con el objetivo de proponer nuevas aplicaciones para este extracto en el desarrollo de productos farmacéuticos destinados al tratamiento de la psoriasis.

4. HIPÓTESIS

El extracto purificado de *Quercus crassifolia* presenta una baja toxicidad oral aguda en ratas Wistar, lo que le permitirá proseguir con etapas sucesivas de su desarrollo farmacéutico.

5. OBJETIVO GENERAL

- ✓ Determinar la toxicidad oral aguda de un extracto polifenólico purificado de *Quercus crassifolia* en ratas Wistar según el método de clases de toxicidad.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar la presencia de signos y síntomas de toxicidad en ratas Wistar expuestas a concentraciones de 300 y 2000 mg/kg de un extracto polifenólico purificado de *Quercus crassifolia*.
- ✓ Determinar la alteración consecuente a la administración del extracto respecto al análisis macroscópico e histopatológico de órganos diana.
- ✓ Determinar la influencia de la exposición oral del extracto en parámetros hematológicos y bioquímicos.

7. METODOLOGÍA

7.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS CORTEZAS DE QUERCUS CRASSIFOLIA

Se realizó la colecta de la corteza del encino (*Q. crassifolia*) en una plantación forestal en Ciudad Hidalgo, Michoacán, México, también se recolectaron ramas y hojas para su identificación botánica. El encino fue identificado por expertos en botánica forestal, el Dr. Pablo Cuevas Reyes y el M.C. Javier Madrigal ambos de la facultad de Biología de la UMSNH. La corteza se lavó, se fraccionó en piezas de 5x5 cm las que fueron secadas a 40 °C en hornos durante 48 horas. Una vez finalizado el proceso de secado se pulverizaron las piezas en un molino de bolas y se tamizaron con malla #40 (tamaño de partícula <0.4 mm). La corteza pulverizada se almacenó en bolsas negras a temperatura ambiente, considerando que la humedad excesiva, la incidencia del sol directo y el polvo atmosférico deterioran y disminuyen la calidad de la materia prima.

7.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO BRUTO AL AGUA CALIENTE

Se utilizó el método descrito por Diouf y colaboradores. Se pesaron 50 g de corteza seca y pulverizada, se realizó la extracción con 500 mL de agua caliente (90 °C) con reflujo durante una hora, se separó la fase acuosa y la corteza fue lavada con 500ml de agua caliente. El extracto acuoso fue filtrado con papel filtro Whatman No. 42, posteriormente se liofilizó y fue almacenado en frascos ámbar a 4 °C [69].

7.3 PURIFICACIÓN DEL EXTRACTO BRUTO

Para realizar la purificación del extracto bruto se siguió el procedimiento descrito por García-Pérez (2012)[53]. Se pesaron 6.5 g del extracto bruto y se suspendió en 250 mL de agua destilada, agitando hasta homogeneizar. Se filtró con crisol Gooch. El filtrado posteriormente se colocó en un embudo de separación y se agregaron 100 mL de hexano. Se agitó fuertemente y se dejó reposar hasta que se llevara a cabo una separación de fases. La fracción acuosa fue colectada y vertida en el embudo, mientras que la fracción de hexano fue desechada, este procedimiento se repitió cuatro veces y en la quinta lavada la fracción acuosa se colectó, se devolvió al embudo y se le agregaron 100 mL de acetato de etilo puro, nuevamente se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta notarse la separación de las fases. La fracción acuosa se recolectó en un matraz Erlenmeyer para volver a lavarla con acetato de etilo cuatro veces más, los compuestos de interés (polifenoles) se encuentran en la fracción de acetato de etilo. Dicha fracción se colocó en un matraz de rotavapor con sistema de vacío, el acetato de etilo fue destilado a 55 °C, se recolectó la fracción del extracto purificado en tubos Falcon para finalmente llevarlos al proceso de liofilización.

7.4 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD AGUDA POR EL MÉTODO DE CLASES DE TOXICIDAD

Se evaluó la toxicidad oral aguda, siguiendo la metodología propuesta por la OECD en la guía 423 [68], del extracto acuoso purificado de corteza de *Q. crassifolia*.

7.4.1 Especie animal

Se utilizó como modelo biológico ratas Wistar de 8 a 12 semanas de edad, se mantuvieron en un bioterio de la Facultad de Químico Fármaco-Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo las siguientes

condiciones: 22°C ± 3°C, Humedad 30-70%, luz artificial con períodos de 12 hr de luz y 12 de oscuridad, alimento y agua ad libitum.

7.4.2 Unidades experimentales y selección de las dosis

Se asignaron tres ratas al grupo control (C1) y tres ratas a cada uno de los grupos de estudio (G1, G2, G3, G4). El grupo control (C1) recibió el vehículo (agua destilada) al G1 se le administró una dosis de 300 mg/ Kg de la solución acuosa del extracto purificado del encino, la cual no excedió de 2 ml/100 g, posteriormente se administró al G2 con una dosis de 300 mg/Kg, los G3 y G4 recibieron una dosis de 2000 mg/Kg, tal y como se especifica en la Guía 423 de la OCDE.

7.4.3 Período y vía de exposición

Los animales se mantuvieron en observación constante la primera media hora, cada media hora las primeras 4 horas, cada hora durante las siguientes 24 horas y 1 vez al día durante los próximos 13 días para determinar muerte o presenciar signos y síntomas de toxicidad. La vía de administración fue oral, con ayuda de una cánula intragástrica.

7.4.4 Procedimiento experimental

Durante período de exposición se determinó si los animales presentaban signos de toxicidad tales como de aspecto físico (posiciones extrañas, piloerección, posición de la cola, lagrimeo, excretas), comportamiento (consumo de agua y alimentos, actividad/inactividad, comportamiento exploratorio, agresividad, sedación); exámenes físicos (temblores musculares, convulsiones, parálisis, alteración de los reflejos, tamaño de pupila, opacidad corneal, lesiones en piel).

7.4.5 Sacrificio de los animales

El día catorce después de la administración se procedió al sacrificio de los animales por dislocación cervical. Además, se tomaron muestras de sangre realizando una punción cardíaca, las que se utilizaron para realizar determinaciones bioquímicas y hematológicas.

7.4.6 Análisis macroscópico e histopatológico

Para el análisis macroscópico se extrajeron y pesaron los siguientes órganos: corazón, estómago, pulmón, hígado, bazo, páncreas, riñones, glándula adrenal, intestino grueso, intestino delgado, ovarios, toroides y encéfalo. Para el análisis histopatológico, se deshidrataron los órganos antes mencionados, se incluyeron en parafina y fueron cortados en un micrótopo a 3 micras. Los cortes se colocaron sobre un portaobjetos, se tiñeron con hematoxilina eosina y fueron observados al microscopio.

7.4.7 Determinaciones bioquímicas y hematológicas

Las determinaciones bioquímicas y hematológicas se realizaron por el Laboratorio Independencia usando métodos estandarizados. Se realizó una biometría hemática completa que comprendió la determinación de leucocitos totales, linfocitos, bandas, segmentos, monocitos, eosinófilos basófilos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, volumen corpuscular medio de la hemoglobina, concentración hemoglobina corpuscular media, amplitud de distribución de glóbulos rojos, conteo de plaquetas, volumen corpuscular medio de las plaquetas, ancho de distribución de las plaquetas y procalcitonina. Las pruebas bioquímicas que se realizaron fueron las siguientes: glucosa, creatinina, urea, fosfatasa alcalina, bilirrubina total, alanina amino-transferasa (ALT), aspartato amino-transferasa (ALP) y gamma glutaril-transferasa (GGT).

8. RESULTADOS

8.1 COLECTA E IDENTIFICACIÓN BOTÁNICA DE LAS CORTEZAS

El encino *Q. crassifolia* tiene un gran interés para la industria forestal del estado de Michoacán. La identificación botánica realizada permitió constatar que efectivamente se trataba de la especie en cuestión. La figura 5 muestra las características de esta corteza.



Figura 5. Corteza recolectada en C. Hidalgo, Michoacán, utilizada en la presente investigación.

8.2 OBTENCIÓN DEL EXTRACTO ACUOSO BRUTO Y PURIFICADO

Los rendimientos de extracción de los extractos bruto y purificado se muestran en la tabla 9. El rendimiento del extracto crudo de *Q. crassifolia* al agua caliente obtuvo un rendimiento del 20.04 ± 7.71 % respecto a las cortezas secas. Sin embargo, la purificación del extracto redujo considerablemente el rendimiento de extracción a 2.70 % (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento respecto a la masa de cortezas secas de los extractos crudo y purificado de *Q. crassifolia*

Extracto	Rendimiento de extracción (%)
<i>Q. crassifolia</i> agua crudo	$20.04 \pm 7.71^*$
<i>Q. crassifolia</i> agua purificado	2.70 ± 0.33

Medias con *en la misma columna son significativamente diferentes estadísticamente. Prueba t ($p < 0.05$).

8.3 ESTUDIO DE LA TOXICIDAD ORAL AGUDA

8.3.1 Registro de alimento consumido y pesos de las ratas

En la figura 6 se muestran los pesos corporales de las ratas Wistar al inicio del período de prueba y en los días 7 y 14 después de la administración. Como se puede observar, los grupos mantuvieron pesos similares. No se registraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo control con los grupos que fueron administrados con el extracto del encino.

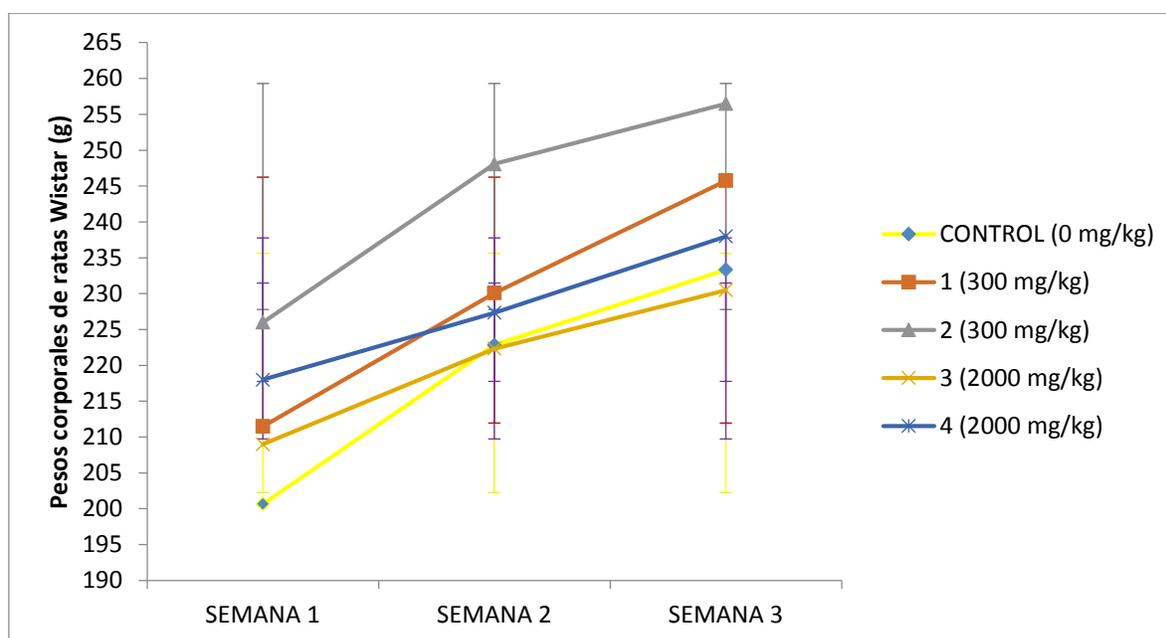


Figura 6. Pesos corporales de las ratas Wistar durante la prueba de toxicidad oral aguda.

Media \pm Desviación estándar; Análisis de varianza, prueba de Tukey $p < 0.05$, comparada con el control (No se registraron diferencias estadísticamente significativas)

En la figura 7 se muestra la cantidad de alimento consumido por las ratas del grupo control, los grupos de prueba G1, G2, G3 y G4. No hubo diferencias significativas estadísticamente (prueba de Tukey $p < 0.05$).

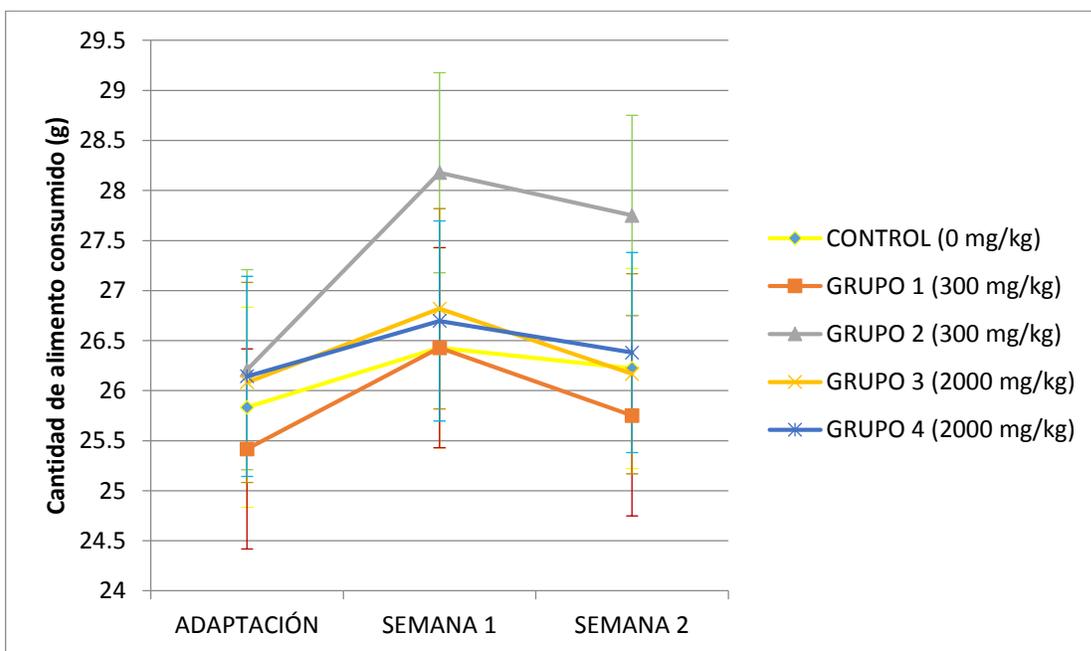


Figura 7. Cantidad de alimento consumido por las ratas Wistar utilizadas para la prueba de toxicidad oral aguda.

Media \pm Desviación estándar; Análisis de varianza, prueba de Tukey $p < 0.05$, comparada con el control. (No se registraron diferencias estadísticamente significativas)

8.3.2 Signos de toxicidad, observación macroscópica

Durante el período experimental no se observaron signos y síntomas de toxicidad en los grupos experimentales comparativamente con el control. En cuanto a la observación macroscópica en los grupos G1, G2, G3 y G4, no se presentaron alteraciones perceptibles en la posición, aspecto y/o morfología de los tejidos de las ratas de los grupos observados. En la tabla 10 se observan los pesos relativos de los tejidos y las longitudes de los intestinos grueso y delgado de las ratas tanto del grupo control con relación al peso total. No se registraron diferencias significativas estadísticamente entre el grupo control y los grupos G1, G2, G3 y G4.

Tabla 10. Pesos relativos de los órganos de las ratas.

Órgano	Grupo control	Grupo 1 300 mg/Kg	Grupo 2 300 mg/Kg	Grupo 3 2000mg/Kg	Grupo 4 2000mg/Kg
Bazo (%)	0.26 ± 0.03	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.05	0.25 ± 0.01	0.27 ± 0.01
Corazón (%)	0.36 ± 0.01	0.35 ± 0.01	0.38 ± 0.01	0.36 ± 0.00	0.41 ± 0.04
Encéfalo (%)	0.78 ± 0.06	0.75 ± 0.06	0.72 ± 0.07	0.79 ± 0.03	0.77 ± 0.03
Estómago (%)	0.67 ± 0.06	0.65 ± 0.02	0.60 ± 0.09	0.65 ± 0.01	0.69 ± 0.05
Suprarrenal derecha (%)	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Suprarrenal izquierda (%)	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00	0.02 ± 0.00
Hígado (%)	4.15 ± 0.32	3.61 ± 0.08	3.61 ± 0.18	3.35 ± 0.20	3.74 ± 0.25
Ovario derecho (%)	0.04 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Ovario izquierdo (%)	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00	0.04 ± 0.00
Páncreas (%)	0.11 ± 0.06	0.11 ± 0.07	0.22 ± 0.06	0.19 ± 0.08	0.20 ± 0.00
Pulmón derecho (%)	0.31 ± 0.05	0.32 ± 0.09	0.42 ± 0.03	0.37 ± 0.01	0.40 ± 0.06
Pulmón izquierdo (%)	0.21 ± 0.05	0.23 ± 0.04	0.20 ± 0.02	0.20 ± 0.03	0.17 ± 0.00
Riñón derecho (%)	0.41 ± 0.03	0.36 ± 0.02	0.41 ± 0.04	0.41 ± 0.04	0.42 ± 0.3
Riñón izquierdo (%)	0.40 ± 0.04	0.36 ± 0.02	0.04 ± 0.01	0.40 ± 0.03	0.40 ± 0.01
Toroides (%)	0.10 ± 0.07	0.17 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.19 ± 0.06	0.17 ± 0.00
Útero (%)	0.09 ± 0.04	0.09 ± 0.01	0.05 ± 0.00	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.02

Los valores son expresados como media ± desviación estándar $p < 0.05$. ANOVA, prueba de Tukey $p < 0.05$.

8.3.3 Análisis histopatológico

En el análisis histopatológico que se realizó, no se encontraron alteraciones microscópicas atribuibles al extracto de *Q. crassifolia* purificado en los tejidos corazón, pulmón, hígado, bazo, páncreas, glándula adrenal, intestino grueso e intestino delgado, útero, tiroides, estómago y ovarios. Mientras que en el riñón,

órgano por excelencia encargado de la eliminación de xenobióticos del organismo, se encontró que la administración del extracto a una concentración de 300 mg/kg presentó un engrosamiento moderado de las membranas basales glomerulares (Figura 8). Mientras que para los grupos de ratas a las que se les administró el extracto a una concentración de 2000 mg/kg se observa daño microscópico atribuible a la administración del extracto. En otras palabras, estos resultados indican la presencia de daño renal, caracterizado por un engrosamiento tanto moderado como intenso de las membranas basales glomerulares, así como aumento de espacio de Bowman (A) que se presenta en forma dosis-dependiente a consecuencia de la administración oral del extracto purificado de *Q. crassifolia*.

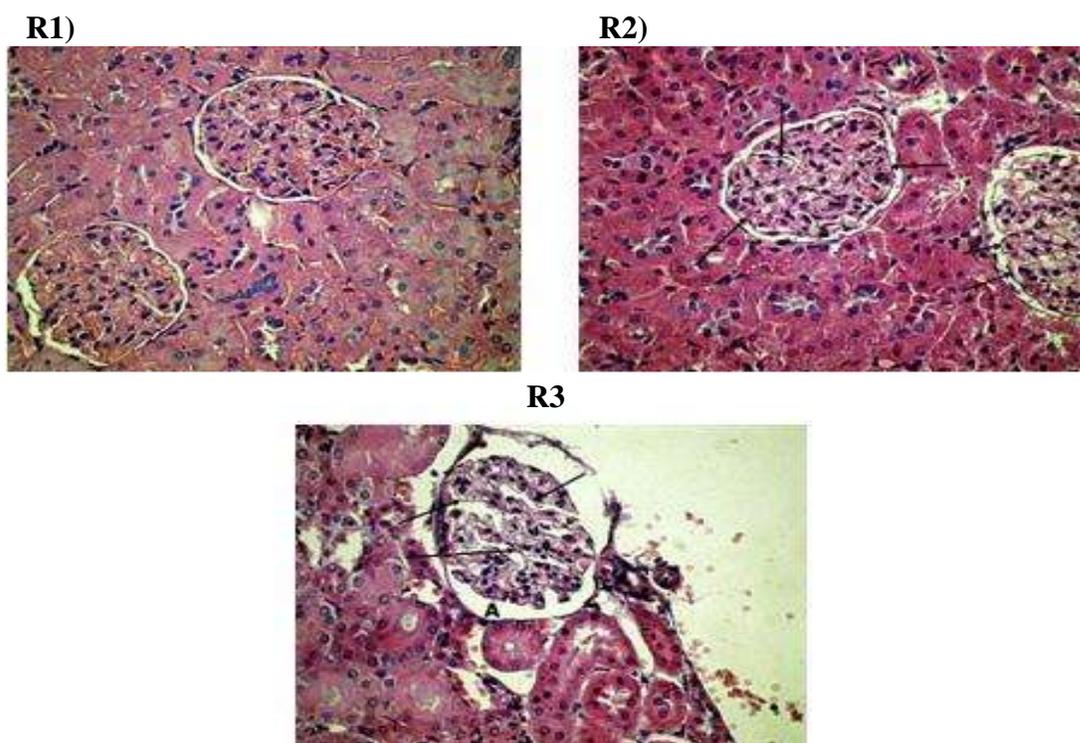


Figura 8. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración oral del extracto purificado de *Q. Crassifolia* .

R1) Grupo control; R2) Grupo que recibió 300 mg/kg; R3) Grupo que recibió 2000 mg/kg. Las flechas indican engrosamiento tanto moderado (300 mg/kg) como intenso (2000 mg/kg) de las membranas basales glomerulares, así como aumento de espacio de Bowman (A).

A nivel encefálico también se presentaron alteraciones histopatológicas (Figura 9). De hecho, al comparar al grupo control con los grupos de prueba a los que se les administró el extracto de encino, se aprecian daños microscópicos. En el encéfalo de los grupos a los que se les administró el extracto a concentraciones de 300 mg/kg se observa la presencia de pocos astrocitos reactivos con citoplasma condensado eosinófilo, así como gliosis de escasa a moderada, lo cual se intensifica para los grupos a los que se les administró el extracto a concentraciones de 2000 mg/kg notando la presencia intensa de (abundantes) astrocitos reactivos con citoplasma condensado eosinófilo además de gliosis intensa.

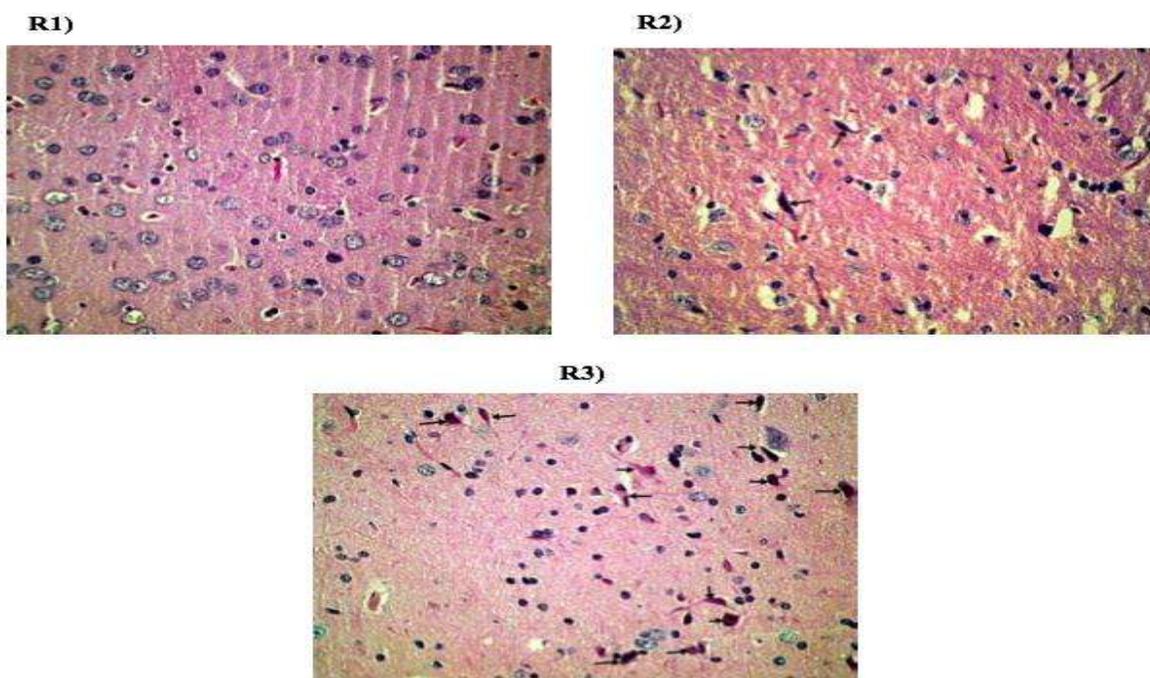


Figura 9 Análisis histopatológico a nivel encéfalo después de la administración oral del extracto purificado de Q. Crassifolia.

R1) Grupo control; R2) Grupo que recibió 300 mg/kg; R3) Grupo que recibió 2000 mg/kg. Las flechas indican la presencia de astrocitos con citoplasma condensado eosinófilo, así como gliosis escasa a moderada (300 mg/kg) como intensa (2000 mg/kg)

8.3.4 Análisis bioquímico

En la tabla 11 se muestran los resultados correspondientes a la biometría hemática completa de los grupos control y experimentales (300 mg/kg y a 2000 mg/kg). En los grupos a los cuales se les administró una concentración de 2000 mg/kg, se observó un aumento estadísticamente significativo en la concentración de hemoglobina corpuscular media, así como una disminución significativa en la amplitud de distribución de glóbulos rojos (%) en comparación con el grupo control, mientras que en los parámetros restantes no hubo diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 11. Biometría hemática completa de los grupos de ratas control y de prueba.

Parámetro	Concentración de extracto administrado (mg/kg)		
	control	300	2000
Conteo de leucocitos totales ($10^3/\mu\text{L}$)	2.63 ± 1.50	2.75 ± 1.47	2.37 ± 1.04
Linfocitos (%)	2012.67±1234.55	1812.83±672.33	1753.33±848.03
Bandas (%)	0	0	0
Segmentados (%)	466.00±193.19	451.17± 223.90	428.33±136.41
Monocitos ($10^3/\mu\text{L}$)	154.67± 96.84	132.00± 90.68	155.33± 68.07
Eosinófilos (%)	0	0	0
Basófilos (%)	0	0	0
Glóbulos rojos ($10^6/\mu\text{L}$)	8.13 ± 0.14	8.28 ± 0.32	7.75 ± 0.61
Hemoglobina (g/dl)	15.63 ± 0.25	16.18 ± 0.69	15.53 ± 0.91
Hematocrito (%)	46.30± 0.10	47.42± 1.48	42.93± 3.15
Volumen corpuscular medio (fL)	57.03± 0.85	57.40± 1.32	55.48± 1.15
Volumen corpuscular medio de la hemoglobina (pg)	19.20 ± 0.361	19.517 ± 0.796	20.017 ± 0.991
Concentración de hemoglobina corpuscular media (g/dl)	33.70± 0.50	34.08± 1.10	36.17± 1.54*
Amplitud de distribución de glóbulos rojos (%)	14.20±0.37	13.90± 0.67	12.77± 0.86 *

Conteo de plaquetas (10 ³ /μL)	655.33± 83.26	518.83± 231.49	620.17± 239.84
Volumen corpuscular medio de las plaquetas (fL)	11.97± 0.06	10.90± 1.32	11.43± 0.46
Ancho de distribución de las plaquetas (%)	20.57± 0.21	19.33± 1.91	20.22 ± 0.60
Procalcitonina (%)	0.23 ± 0.39	0.21 ± 0.29	0.23 ± 0.29

Los valores son expresados como media ± DE. * Diferencias significativas estadísticamente comparadas con el control a p<0.05. ANOVA, Prueba de Tukey.

La tabla 12 muestra los resultados correspondientes a la realización de pruebas bioquímicas de los grupos control y experimental. En ésta se encontró una disminución estadísticamente significativa en la concentración de creatinina en la sangre para los grupos de prueba a los cuales se les administró el extracto de encino a una concentración de 2000 mg/kg, comparados con el grupo control.

Tabla 12. Química sanguínea de los grupos de ratas control y de prueba.

Parámetros	Concentración de extracto administrado (mg/Kg)		
	(0) control	300	2000
Glucosa(mg/dl)	148.47 ± 31.77	148.05 ± 31.21	134.95 ± 16.15
Urea(mg/dl)	38.17 ± 5.80	50.27 ± 6.37	50.75 ± 9.03
Bilirrubina (mg/dl)	17.67 ± 2.50	23.43 ± 2.99	23.67 ± 4.23
Creatinina (mg/dl)	0.75 ± 0.08	0.89 ± 0.10	0.50 ± 0.13 *

Los valores son expresados como media ± DE. * Diferencias significativas estadísticamente comparadas con el control a p<0.05. ANOVA, Prueba de Tukey.

La tabla 13 muestra los resultados obtenidos del perfil hepático de los grupos control y experimentales. Estos no presentaron diferencias significativas estadísticamente para los parámetros analizados entre los grupos de prueba y el control, excepto en los valores de la concentración de fosfatasa alcalina, estos se muestran disminuidos en los grupos a los que se les administró el extracto de encino a una concentración de 2000 mg/kg, en comparación al grupo control.

Tabla 13. Perfil hepático de los grupos de ratas control y de prueba.

Parámetro	Concentración de extracto administrado(mg/Kg)		
	(0) control	300	20000
Bilirrubina total (mg/dl)	0.33 ± 0.03	0.69 ± 0.36	0.59 ± 0.09
Bilirrubina indirecta (mgdl)	0.23 ± 0.03	0.43 ± 0.20	0.33 ± 0.05
Bilirrubina directa (mg/dl)	0.10 ± 0.01	0.27 ± 0.17	0.26 ± 0.09
Aspartato amino transferasa	166.03 ± 68.41	213.47 ± 48.08	152.17 ± 82.30
Alanina aminostransferasa	58.37 ± 16.81	68.58 ± 20.71	50.47 ± 35.02
Fosfatasa alcalina	117.93 ± 18.74	94.57 ± 17.73	83.40 ± 15.17 *
Gama glutamil transpeptidasa	10.80 ± 1.39	9.92 ± 2.57	9.35 ± 1.64

*Los valores son expresados como media ± DE. * Diferencias significativas estadísticamente comparadas con el control a p<0.05. ANOVA, Prueba de Tukey.*

9. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la presente investigación constituyen el primer estudio toxicológico realizado a un extracto polifenólico obtenido de cortezas de encinos mexicanos. Un estudio previo realizado por nuestro equipo de investigación demostró que este extracto poseía una concentración en fenoles totales de $(2391.04 \pm 185.01 \text{ mg EAG/g})$, flavonoides $(43.59 \pm 0.31 \text{ mg EQ/g})$, ácidos hidroxicinámicos $(362.37 \pm 13.47 \text{ mg EACI/g})$ y proantocianidinas $(9.35 \pm 0.32 \text{ mg ECIC/g})$, lo que demuestra que efectivamente se trata de un extracto concentrado en este tipo de moléculas[9]. El extracto purificado está representado por la fracción acetato de etilo, la que, por su polaridad intermediaria entre la fracción de hexano y acuosa debe poseer una gran concentración en fenoles representados por flavonoides, ácidos fenólicos, fenoles simples, lignanos, estilbenos y taninos oligoméricos. De hecho, el extracto purificado presenta una concentración en fenoles totales superior al extracto crudo de partida $(2391.04 \pm 185.01 \text{ mg EAG/g vs. } 746.54 \pm 41.09 \text{ mg EAG/g})$ [9], lo que concuerda con los resultados obtenidos de Brighete y colaboradores en 2007, quienes vieron favorecida la concentración de polifenoles totales en la fracción de acetato de etilo comparada con la fracción acuosa y el extracto bruto de partida[70].

El extracto purificado de *Quercus crassifolia* no generó afectaciones en cuanto al peso corporal o la ingesta de alimentos de los animales tratados. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Panchal y colaboradores, quienes en 2011 administraron un extracto alcohólico de corteza de *Q. petraea* en ratas, sus resultados indicaron que el peso corporal de las ratas no se vio afectado por la administración del extracto polifenólico, de la misma manera la ingesta de alimentos no mostró cambios significativos[71]

En cuanto al análisis hematológico, la hemoconcentración observada (pocos eritrocitos y hemoglobina normal) podría explicarse por la disminución de eritropoyesis y esto pudiera estar en relación con el daño renal inducido por el extracto. En 2001 Niho y colaboradores reportaron disminución de la eritropoyesis relacionada a la administración de ácido gálico, estadísticamente[72]. Otros

estudios han demostrado la presencia de ácido gálico y galotaninos en extractos de especies pertenecientes al género *Quercus*, como el estudio realizado por Ishimaru y colaboradores en 1986 donde demostraron la presencia de ácido gálico y galotaninos en un extractopolifenólico de hojas frescas de *Q. myrsinaefolia* así como en bellotas de *Q. mongólica* [73]. Moreno Jimenez y colaboradores en 2015 identificaron ácido gálico en *Q. sideroxylla*, *Q. durifolia* y *Q. eduaedii*[6]. Conde y colaboradores en 1998 realizaron un estudio para determinar la composición polifenólica de *Q. suber* en donde determinaron la presencia de ácido gálico[64]. Estos estudios que demuestran la presencia de ácido gálico y sus derivados en los extractos polifenólicos del género *Quercus*, podrían probablemente explicar los efectos observados con el extracto de *Q. crassifolia* relacionados con la presencia de estas moléculas. Una caracterización química exhaustiva de este extracto en el futuro permitirá la identificación de sus compuestos mayoritarios y poder establecer una mejor relación con los efectos tóxicos observados. Los compuestos fenólicos a dosis altas, como las administradas en este estudio, tienen además la capacidad de interferir en la adsorción del hierro consumido en los alimentos de la dieta diaria, lo cual podría explicar la disminución en los eritrocitos[45].

En lo concerniente al análisis bioquímico, aunque no se logró establecer la causa precisa de la disminución de creatinina, es posible pensar que este efecto pudiera ser consecuencia de una disminución de la masa muscular en el grupo que recibió la dosis más alta del extracto purificado de *Q. crassifolia*. Este efecto adverso pudiera estar relacionado con la capacidad de los taninos de quelar las proteínas exógenas, impidiendo de esta manera su asimilación, lo que impactaría en la masa muscular del grupo con la dosis más alta y consecuentemente en una disminución de la creatinina [74].

Así mismo, los niveles de concentración de la fosfatasa alcalina se vieron disminuidos en los grupos que fueron administrados con las dosis más altas del extracto. La fosfatasa alcalina es la enzima hidrolasa responsable de eliminar grupos fosfatos de distintas moléculas como nucleótidos, proteínas y alcaloides. Los niveles bajos de fosfatasa alcalina, pueden deberse a indicios de daño

hepático o desnutrición debida a deficiencias de proteínas, lo cual concuerda con los resultados encontrados en la química sanguínea y que pudieran corresponder a la baja disponibilidad proteica debida a la acción quelante de los compuestos fenólicos, lo cual ha sido reportado como un efecto de los taninos a altas concentraciones[75]. De hecho, un estudio realizado por Shahkhalili con dietas de cacao, té y algarroba demostró que los polifenoles (taninos) pueden generar un decremento en la ingesta de alimento, en el crecimiento, en la eficiencia alimenticia, en la energía metabólica neta, así como la digestibilidad de proteínas[76].

Como se mencionó anteriormente, los reportes científicos relacionados con la toxicidad oral de especies pertenecientes al género *Quercus* son relativamente pocos o casi nulos. En el estudio histopatológico se demostró la existencia de daño renal y encefálico, los cuales se presentaron de una forma leve o moderada a nivel microscópico en forma dosis-dependiente. El daño renal coincide con lo reportado por Dutra y colaboradores en 2013 quienes encontraron nefrosis leve a moderada, con degeneración hidrópica de los túbulos proximales, cilindros hialinos o granulares y moderado edema a nivel del intersticio intertubular en el riñón del ternero experimental alimentado con hojas y bellotas de *Q. rubra*[65]. Niho y colaboradores en 2001 reportaron presencia de daño renal, al administrar concentraciones altas de ácido gálico[72]. Considerando que múltiples estudios han demostrado la presencia de galotaninos en este género[77][78], pensamos que los efectos tóxicos sobre el riñón pudieran relacionarse con la presencia de dichas moléculas en el extracto purificado de *Quercus crassifolia*. De toda evidencia, estudios ulteriores encaminados a la identificación de los biomarcadores químicos, son necesarios para estimar con precisión el posible impacto de los compuestos mayoritarios de este extracto en su toxicidad.

10. CONCLUSIÓN

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio demostraron la existencia de signos y síntomas aparentes de toxicidad en los animales aunque no se apreciaron diferencias significativas en los pesos de las ratas. Sin embargo, un análisis más profundo desde el punto de vista hematológico, bioquímico e histopatológico demostró la existencia de daño renal en forma dosis dependiente atribuible a la administración oral del extracto purificado de *Q.crassifolia*. De la misma manera, se aprecia daño encefálico dosis-dependiente con presencia de astrocitos reactivos con citoplasma condensado eosinófilo así como gliosis, lo que demuestra la capacidad del extracto de atravesar la barrera hematoencefálica e inducir toxicidad a este nivel.

Por lo tanto, los resultados obtenidos en esta prueba de toxicidad oral aguda sugieren que el extracto purificado de *Q.crassifolia* posee toxicidad intrínseca, por lo que resulta imperativo continuar las investigaciones de toxicología subcrónica a dosis inferiores a los 300 mg/kg, con el fin de detectar efectos tóxicos acumulativos tardíos asociados a la administración repetida, para determinar la inocuidad de este extracto y su potencial para el desarrollo de un nuevo producto farmacéutico orientado al tratamiento de la psoriasis.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. De Miguel, C. García, L. Martín, and M. Escribano, "Guía de desarrollos preclínicos," *Guía Desarro. Preclin.*, p. 80, 2012.
- [2] L. Puig-Sanz, "La psoriasis, ¿una enfermedad sistémica?," *Actas dermosifiliográficas*, vol. 98, no. 6, pp. 396–402, 2007.
- [3] L. Puig *et al.*, "Directrices españolas basadas en la evidencia para el tratamiento de la psoriasis moderada a grave con agentes biológicos," pp. 386–413, 2009.
- [4] P. Lázaro and R. Suárez, "Actualización en el tratamiento de la psoriasis," vol. 25, pp. 105–110, 2001.
- [5] M.-E. García-Pérez, J. Jean, and R. Pouliot, "Antipsoriatic drug development : challenges and new therapies," pp. 3–21, 2012.
- [6] M. R. Moreno-Jimenez *et al.*, "Antioxidant, anti-inflammatory and anticarcinogenic activities of edible red oak (*Quercus* spp.) infusions in rat colon carcinogenesis induced by 1,2-dimethylhydrazine," *Food Chem. Toxicol.*, vol. 80, pp. 144–153, 2015.
- [7] M. Quiñones, M. Miguel, and A. Aleixandre, "Los polifenoles, compuestos de origen natural con efectos saludables sobre el sistema cardiovascular Compounds with beneficial effects," 2012.
- [8] A. D. L. Luna, L. Montalvo, and B. Rendón, "Los usos no leñosos de los encinos en México," 2003.
- [9] M. C. Martínez García, "Estudio de las propiedades antioxidantes y toxicológicas de extractos polifenólicos de cortezas de especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus*," 2016.
- [10] C. B. Rojas, "Fases del desarrollo de un nuevo medicamento," pp. 1–4.
- [11] F. Peláez, "Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos," vol. 107, pp. 36–45, 2011.
- [12] B. Blass, *Drug Discovery and Development : An Overview of*. 2015.
- [13] MSD, "Proceso de investigación, desarrollo y aprobación de un fármaco," 2016.
- [14] A. Bayona and N. Fajardo, "Development of new drugs : opportunities and benefits for Peru," vol. 29, no. 4, 2012.
- [15] G. A. Magos and M. Lorenzana, "Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos," vol. 52, no. 6, pp. 260–264, 2009.
- [16] P. Rendo, "Desarrollo de nuevos medicamentos, la experiencia clínica al mercado: Una perspectiva desde la industria," pp. 177–182, 2015.

- [17] R. Ramírez Herrera and N. E. Soto Ruíz, “Estudios pre-clínicos y clínicos,” *Cofepris*, pp. 1–20, 2013.
- [18] R. Gámez, “Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados,” vol. 38, no. 3, pp. 204–208, 2007.
- [19] S. Parasuraman, “Toxicological screening,” vol. 2, no. 2, 2011.
- [20] L. S. R. Del Barrio, “Desarrollo de nuevos fármacos: desde la invención a la farmacia,” 2013.
- [21] M. P. V. Martínez-hidalgo, “Alternativas a la experimentación animal en toxicología: situación actual,” vol. 13, no. 1, pp. 41–52, 2007.
- [22] M. Repetto and G. Repetto, *Toxicología fundamental*, 4°. 2009.
- [23] OECD/OCDE, “Repeated dose 28-Day oral toxicity study in rodents,” no. October, 2008.
- [24] D. F. Arencibia-Arrebola *et al.*, “Algunas consideraciones sobre la determinación de la toxicidad aguda,” *Rev. Toxicol. en Línea*, pp. 1–15, 2003.
- [25] H. Kandárová and S. Letašiová, “Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods.,” *Interdiscip. Toxicol.*, vol. 4, no. 3, pp. 107–113, 2011.
- [26] R. Ibis and M. Hernández, “Métodos alternativos en toxicología,” vol. 45, no. 1, pp. 18–28, 2014.
- [27] D. F. Fernández, Á. S. Lamar, G. F. López, and N. Capiro, “Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de plantas medicinales en Cuba,” 2000.
- [28] A. Monge, “El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales,” 2003.
- [29] M. L. Avello and I. F. Cisternas, “Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile,” pp. 1288–1293, 2010.
- [30] M. F. Vidaurre, L. M. Querevalú, E. De los ríos, and S. G. Ruiz, “Características farmacognósticas de las hojas,” 2007.
- [31] O. A. Abreu and A. Cuellar, “Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar,” 2008.
- [32] K. Lee, “Discovery and development of natural product-derived chemotherapeutic agents based on a,” no. 919, pp. 500–516, 2010.
- [33] C. Avendaño, “Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos . una visión de conjunto,” 2010.
- [34] A. Echeverría, A. M. Aristizábal, F. Vargas, J. se F. Monlina, L. F. Pinto, and A. Zuluaga, “Nuevos avances de la terapia biológica en la psoriasis,” vol. 33,

2005.

- [35] S. K. Raychaudhuri, E. Maverakis, and S. P. Raychaudhuri, "Diagnosis and classification of psoriasis," vol. 13, pp. 490–495, 2014.
- [36] M. Garcia Pérez, "Analyse des effets pharmacologiques d'extraits polyphénoliques issus d'essences canadiennes pour le résumé," 2012.
- [37] G. Wozel, "Retos y opciones : ¿hacia donde nos dirigimos ? ¿como definir la gravedad de la psoriasis ? retos prácticos y límites," vol. 33, no. 1, pp. 41–42, 2005.
- [38] V. Singh, "Clinical outcome of a novel anti-CD6 biologic Itolizumab in patients of psoriasis with comorbid conditions," vol. 2016, pp. 1–5, 2016.
- [39] M. Campa, B. Mansouri, R. Warren, and A. Menter, "A review of biologic therapies targeting IL-23 and IL-17 for use in moderate-to-severe plaque psoriasis," *Dermatol. Ther. (Heidelb)*., vol. 6, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [40] Almirall, "Almirall announces data from Tildrakizumab clinical development program presented at the 2017 American academy of dermatology meeting," no. October 2016, pp. 1–4, 2017.
- [41] E. Guttman- Yassky and J. G. Krueger, "Psoriasis : evolution of pathogenic concepts and new therapies through phases of translational research," pp. 1103–1115, 2007.
- [42] C. Manach, A. Scalbert, C. Morand, C. Rémésy, and L. Jiménez, "Polyphenols: Food sources and bioavailability," *Am. J. Clin. Nutr.*, vol. 79, no. 5, pp. 727–747, 2004.
- [43] C. W. I. Haminiuk, G. M. Maciel, M. S. V Plata-oviedo, and R. M. Peralta, "Phenolic compounds in fruits – an overview," pp. 1–22, 2012.
- [44] R. Tsao, "Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols," pp. 1231–1246, 2010.
- [45] E. V. A. G. Creus, "Compuestos fenólicos: Un análisis de sus beneficios para la salud," vol. 23, pp. 80–84, 2004.
- [46] A. P. Porras and A. López, "Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos," 2009.
- [47] N. Almaraz-Abarca, J. A. Ávila-Reyes, E. A. Delgado-Alvarado, N. Naranjo-Jiménez, and J. Herrera-Corral, "El metabolismo secundario de las plantas, un nuevo concepto."
- [48] P. Saz, "Fitoterapia y medicina naturista :"
- [49] M. D. Luque de Castro and L. E. García Ayuso, "Principles of Conventional Soxhlet Use of Conventional Soxhlet," no. 1995, 2000.
- [50] I. Ignat, I. Volf, and V. I. Popa, "A critical review of methods for

- characterisation of polyphenolic compounds in fruit and vegetables,” *Int. J. ChemTech Res.*, vol. 3, no. 3, pp. 1033–1036, 2011.
- [51] H. A. Peredo-Luna, E. P. García, and A. López-Malo, “Aceites esenciales: métodos de extracción.” 2009.
- [52] M. López-Sánchez, J. Triana-Méndez, F. J. Pérez-Galván, and M. E. Torres-Padrón, “Métodos físicos de separación y purificación de sustancias orgánicas,” 2005.
- [53] M. García-pérez, M. Royer, G. Herbette, Y. Desjardins, R. Pouliot, and T. Stevanovic, “Picea mariana bark: A new source of trans -resveratrol and other bioactive polyphenols,” vol. 135, pp. 1173–1182, 2012.
- [54] J. Kim *et al.*, “Cocoa polyphenols suppress TNF- α -induced vascular endothelial growth factor expression by inhibiting phosphoinositide 3-kinase (PI3K) and mitogen- activated protein kinase kinase-1 (MEK1) activities in mouse epidermal cells,” no. 2010, pp. 957–964, 2010.
- [55] M. E. García-Pérez, M. Royer, A. Duque-Fernandez, P. N. Diouf, T. Stevanovic, and R. Pouliot, “Antioxidant, toxicological and antiproliferative properties of Canadian polyphenolic extracts on normal and psoriatic keratinocytes,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 132, no. 1, pp. 251–258, 2010.
- [56] M. García-pérez, I. Allaëys, D. Rusu, R. Pouliot, T. Stevanovic, and P. E. Poubelle, “Picea mariana polyphenolic extract inhibits proinflammatory mediators produced by TNF- α -activated psoriatic keratinocytes: Impact on NF- κ B pathway,” *J. Ethnopharmacol.*, vol. 151, no. 1, pp. 265–278, 2014.
- [57] A. Valencia, “Diversidad del género Quercus (Fagaceae) en México,” 2004.
- [58] J. A. Encina-Domínguez and J. Á. Villarreal-Quintanilla, “Distribución y aspectos ecológicos del género Quercus (Fagaceae), en el estado de Coahuila, México,” pp. 1–23, 2002.
- [59] F. Zavala-Chávez, “Observaciones sobre la distribución de encinos en México,” pp. 47–64, 1998.
- [60] S. Arizaga and M. Salcedo-cabral, “Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos.” 2009.
- [61] C. de la P. Pérez-Olvera and R. Dávalos-Sotelo, “Algunas características anatómicas y tecnológicas de la madera de 24 especies de Quercus (encinos) de México,” vol. 14, no. 3, pp. 43–80, 2008.
- [62] B. D. Vázquez-cabral *et al.*, “Mexican oaks as a potential non-timber resource for Kombucha beverages,” vol. 22, no. 6, pp. 73–86, 2016.
- [63] M. Cabeza de Vaca, D. Tejerina, S. García-Torres, E. Prior, A. Gordillo, and E. Martín-Tornero, “Composición antioxidante de bellotas y pastos de dehesa durante el periodo de montanera en extremadura,” 2014.
- [64] E. Conde, E. Cadahía, M. C. García-Vallejo, and B. Fernández de Simón,

- "Polyphenolic composition of *Quercus suber* cork from different Spanish provenances," vol. 8561, no. 97, pp. 3166–3171, 1998.
- [65] F. Dutra, A. Romero, P. Trelles, F. Arruti, J. Ferres, and C. Quinteros, "Intoxicación espontánea y experimental por *Quercus rubur* (roble inglés) en bovinos en Uruguay," vol. 50, pp. 34–48, 2013.
- [66] S. L. Haley, J. G. Lamb, M. R. Franklin, J. E. Constance, and M. D. Dearing, "Xenobiotic metabolism of plant secondary compounds in oak (*Quercus Agrifolia*) by Specialist and Generalist Woodrat Herbivores , Genus *Neotoma*," pp. 2111–2122, 2007.
- [67] N. Silanikove, N. Gilboa, A. Perevolotsky, and Z. Nitsan, "Goats fed tannin-containing leaves do not exhibit toxic syndromes," vol. 21, pp. 195–201, 1996.
- [68] OECD/OCDE, "Acute oral toxicity – Acute toxic class method," no. december, 2001.
- [69] P. N. Diouf, T. Stevanovic, and A. Cloutier, "Study on chemical composition, antioxidant and anti-inflammatory activities of hot water extract from *Picea mariana* bark and its proanthocyanidin-rich fractions," *Food Chem.*, vol. 113, no. 4, pp. 897–902, 2009.
- [70] I. M. C. Brighente, M. Dias, L. G. Verdi, and M. G. Pizzolatti, "Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species," vol. 45, no. 2, pp. 156–161, 2007.
- [71] S. K. Panchal and L. Brown, "Cardioprotective and hepatoprotective effects of ellagitannins from European oak bark (*Quercus petraea* L .) extract in rats," no. 2013, pp. 397–408.
- [72] N. Niho *et al.*, "Subchronic toxicity study of gallic acid by oral administration in F344 rats," vol. 39, pp. 1063–1070, 2001.
- [73] K. Ishimaru, G.-I. Nonaka, and I. Nishioka, "Gallic acid esters of protoquercitol, quinic acid and (-) shikimic acid from *Quercus mongolica* and *Q. myrsinaefolia*," vol. 26, no. 5, pp. 6–9, 1987.
- [74] H. P. . Makkar, "Effects and fate of tannins in ruminant animals , adaptation to tannins , and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds," vol. 49, pp. 241–256, 2003.
- [75] L. Bravo and P. D, "Polyphenols : Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance," vol. 56, no. 11, 1998.
- [76] Y. Shahkhalili, P. A. Finot, R. Hurrell, and E. Ferh, "Effects of foods rich in polyphenols on nitrogen excretion in rats1 T," no. October 1989, pp. 346–352, 1990.
- [77] M. Nishiwaza and T. Yamagishi, "Tannins and related compounds. Part 9. Isolation and characterization of polygalloyglucoses from turkish gall

(*Quercus infectoria*,” no. 2, pp. 2–6, 1983.