



Universidad Michoacana de San  
Nicolás de Hidalgo



Facultad de Química Farmacobiología

Tesis

**Evaluación de la toxicidad dérmica aguda del extracto etanólico de  
raíz de *Cestrum roseum***

Que para tener el título de Química Farmacobióloga

Presenta:

p. QFB Katia Borjas Moreno

Director:

D.C. Martha Estrella García Pérez

Co-director:

D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez

Morelia, Michoacán, diciembre de 2019.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE ALIMENTOS DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA Y EN EL LABORATORIO DE QUÍMICA MEDICINAL DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARTHA ESTRELLA GARCÍA PÉREZ Y EL DR. HUGO ALEJANDRO GARCÍA GUTIÉRREZ. PROYECTO REALIZADO CON APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR CIC-UMSNH Y CONACYT CIENCIA BÁSICA (A1-S-47325).

## *Dedicatoria*

La presente investigación está dedicada a mis padres Waldemar Borjas Quevedo y María Moreno Cepena por el esfuerzo brindado al darme una educación, por sus consejos que me han hecho crecer tanto personalmente como profesionalmente, por apoyarme en todo momento y hacer que este logro se hiciera realidad.

¡Gracias!

## *Agradecimientos*

A mi directora, la D.C. Martha Estrella García Pérez a quien admiro mucho por ser un ejemplo de inspiración como persona y como profesionalista. Gracias por creer en mí, por estar siempre pendiente de mi trabajo, por su apoyo, dedicación, por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de investigación y sus buenos consejos.

A mi co-director, el D.C. Hugo Alejandro García Gutiérrez por proporcionarnos el extracto e incentivar esta investigación.

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

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 mis padres por acompañarme en este proceso de crecimiento profesional y brindarme las bases para seguir adelante.

A mi novio Cristian Lozano Guzmán por brindarme su apoyo incondicional en todo momento a lo largo de este tiempo, gracias por la paciencia.

A mis amigas Brenda, Lupita, Goretti, Mary y Jaqueline por permitir que estos años fueran de los mejores, gracias por coincidir.

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABLAS.....	9
Resumen .....	12
Abstract .....	13
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. MARCO TEÓRICO .....	16
2.1. La piel.....	16
2.1.1. Epidermis.....	17
2.1.2. Dermis .....	18
2.1.3. Hipodermis .....	19
2.2. El desarrollo farmacéutico.....	20
2.2.1. Etapas del desarrollo farmacéutico.....	22
2.2.1.1 Etapa de descubrimiento .....	22
2.2.1.2 Desarrollo preclínico .....	24
2.2.1.3 Desarrollo clínico .....	24
2.2.2 Particularidades del desarrollo farmacéutico para el diseño de medicamentos tópicos.....	26
2.2.3 Estrategias utilizadas en el desarrollo farmacéutico a partir de plantas	27
2.2.3.1 Estrategia quimiotaxonómica.....	29
2.2.3.2 Estrategia etnofarmacológica .....	29
2.2.3.3 Estrategia al azahar .....	30
2.2.3 La evaluación toxicológica preclínica: una etapa esencial del desarrollo farmacéutico.....	31
2.2.3.1 Consideraciones regulatorias en la evaluación preclínica toxicológica	31
2.2.3.2 Evaluación de la toxicidad aguda .....	32
2.2.3.3 Evaluación de la toxicidad subaguda.....	33

2.2.3.4	Evaluación de la toxicidad subcrónica .....	34
2.2.3.5	Evaluación de la toxicidad crónica .....	35
2.2.3.6	Métodos de evaluación de la toxicidad dérmica.....	36
2.3	Importancia del uso de las plantas para el desarrollo de medicamentos.....	38
2.4	Estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados con <i>Cestrum roseum</i> .....	40
3.	JUSTIFICACIÓN .....	44
4.	HIPÓTESIS.....	45
5.	OBJETIVOS.....	46
5.1	Objetivo general .....	46
5.2	Objetivos específicos .....	46
6	MATERIALES Y MÉTODOS .....	47
6.1	Colecta e identificación botánica de <i>Cestrum roseum</i> .....	47
6.2	Obtención del extracto etanólico.....	47
6.3	Evaluación de la toxicidad dérmica aguda en ratas Wistar.....	47
6.3.1	Especie animal.....	48
6.3.2	Selección de las dosis, vía de administración y procedimiento experimental .....	48
6.3.3	Período de observación .....	49
6.3.4	Determinación de signos y síntomas de toxicidad.....	49
6.3.5	Análisis macroscópico.....	49
6.3.6	Análisis histopatológico .....	49
6.3.7	Determinaciones hematológicas y bioquímicas .....	50
7	RESULTADOS.....	51
7.1	Colecta e identificación botánica .....	51
7.2	Obtención del extracto de <i>Cestrum. roseum</i> .....	51
7.3	Estudio de toxicidad dérmica .....	51
7.3.1	Peso corporal y signos de toxicidad .....	51

7.3.2	Análisis macroscópico .....	53
7.3.3	Análisis histopatológico .....	54
7.3.4	Análisis hematológico.....	56
7.3.5	Análisis bioquímico.....	57
8	DISCUSIÓN .....	59
9	CONCLUSIONES .....	63
10	RECOMENDACIONES.....	64
11	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	65

## LISTA DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1:</b> La piel y su composición (7).....	17
<b>Figura 2:</b> Capas que componen la epidermis (8).....	18
<b>Figura 3:</b> Capas de la Dermis (9). ....	19
<b>Figura 4:</b> El proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Modificado de (11).....	22
<b>Figura 5:</b> <i>Cestrum roseum</i> .....	41
<b>Figura 6:</b> Compuestos mayoritarios aislados durante el estudio fitoquímico de <i>Cestrum roseum</i> (41). ....	42
<b>Figura 7:</b> Apariencia de la piel en los animales tratados con el extracto etanólico de <i>C. roseum</i> 24 h después de la administración. <i>Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D)</i> .....	52
<b>Figura 8:</b> Evolución del peso corporal de los grupos experimentales y el control antes y después de la administración tópica del extracto etanólico de la raíz de <i>Cestrum roseum</i> . Los valores son expresados como media $\pm$ DE. *Diferencias significativas estadísticamente comparadas con Prueba de Tukey.....	53
<b>Figura 9:</b> Histopatología de la piel. <i>Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D)</i> .....	55
<b>Figura 10:</b> Histopatología del riñón. <i>Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D)</i> .....	56



## LISTA DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1:</b> Número de animales por sexo en los estudios subagudos, subcrónicos y crónicos (25).-----	36
<b>Tabla 2:</b> Diferencias de la piel humana con respecto a la piel de modelos animales utilizados en los estudios toxicológicos. -----	37
<b>Tabla 3:</b> Compuestos en mayor abundancia de los extractos crudos de cada una de las partes de <i>Cestrum roseum</i> (41). -----	43
<b>Tabla 4:</b> Pesos de los tejidos de ratas Wistar grupo control, G1, G2 y G3.-----	54
<b>Tabla 5:</b> Biometría hemática completa de los grupos de ratas de ensayo. -----	57
<b>Tabla 6:</b> Química sanguínea de ratas control, G1, G2 y G3. -----	58
<b>Tabla 7:</b> Pruebas de perfil hepático grupo control, G1, G2 y G3. -----	58

## ABREVIATURAS

**°C:** Grados Celsius

**µm:** micrómetros

**ALP:** Aspartato amino-transferasa

**ALT:** Alanina amino-transferasa

**cm:** centímetros

**CMHG:** Concentración media de hemoglobina globular

**COFEPRIS:** Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios

**DE:** Desviación estándar

**DL<sub>50</sub> :** Dosis letal 50

**EAG:** Equivalente a ácido gálico

**EMA:** Agencia Europea de Medicamentos

**EQ:** Equivalente a quercetina

**etc.:** Etcétera

**FDA:** Administración de Alimentos y Fármacos

**g:** gramos

**GGT:** Gamma glutaril-transferasa

**h:** hora

**HCM:** Hemoglobina corpuscular media

**HTS:** Cribado de alto rendimiento

**ICH:** Conferencia Internacional de Armonización

**IND:** Nuevo Fármaco en Investigación

**kg:** kilogramos

**LOAEL:** Nivel mínimo de efecto tóxico observable

**m:** metros

**mg:** miligramos

**mm:** milímetros

**NDA:** Solicitud de nuevo medicamento

**NOAEL:** Nivel sin efecto tóxico observable

**OCDE:** Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico

**OMS:** Organización Mundial de Salud

**pH:** medida de acidez o alcalinidad de una solución

**RDW:** Amplitud de distribución eritrocitaria

**Supri dr:** Suprarrenal derecha

**Supri Izq:** Suprarrenal izquierda

**UV:** Ultravioleta

**V.A:** Valores absolutos

**VGM:** Volumen globular medio

## Resumen

*Cestrum roseum* es una especie distribuida en el estado de Michoacán que ha recibido poca atención en cuanto al análisis de sus características farmacológicas y toxicológicas. Estudios fitoquímicos previos realizados con los extractos orgánicos obtenidos de *Cestrum roseum* demuestran la presencia de moléculas como el ácido clorogénico, ácido ursólico y lupeol, reconocidas por sus efectos positivos a nivel dermatológico. Lo anterior sugiere que extractos de esta planta podrían ser explorados como candidatos terapéuticos por vía tópica. El desarrollo farmacéutico se basa 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.

El objetivo general del presente trabajo de investigación es estudiar los efectos toxicológicos por vía dérmica del extracto etanólico de la raíz de *Cestrum roseum* en ratas Wistar. Para ello, se realizó la colecta e identificación botánica de la planta. La extracción de la raíz seca y pulverizada se sometió a maceración con etanol al 96% por 5 días. La toxicidad dérmica aguda se evaluó según la guía 402 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) usando las dosis de 200, 1000 y 2000 mg/kg. Los resultados obtenidos muestran que las dosis probadas generaron dermatitis a las 24 h después de la administración, aunque no se constató mortalidad en los animales, cambios en el peso corporal ni otros signos y síntomas de toxicidad. El análisis histopatológico no evidenció daños en los órganos estudiados excepto en el riñón, donde se presentaron alteraciones dependientes de la dosis. Las pruebas hematológicas y perfil bioquímico no demostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales respecto al control. Este estudio demuestra que el extracto etanólico de la raíz de *Cestrum roseum* debe ser probado en estudios toxicológicos a dosis repetida de mayor duración, antes de ser considerado como candidato terapéutico dermatológico.

**Palabras clave:** Toxicología, piel, dosis, diferencias significativas, extracto etanolico.

## Abstract

*Cestrum roseum* is a distributed species in Michoacán that has received little attention regarding the analysis of its pharmacological and toxicological characteristics. Previous phytochemical studies performed with extracts obtained from *Cestrum roseum* demonstrated the presence of molecules such as chlorogenic acid, ursolic acid and lupeol, recognized for their positive effects on the skin. The above suggests that extracts of this plant could be explored as dermatological therapeutic candidates. Pharmaceutical development consists on a set of studies leading to the development of a new drug. The toxicological studies are among the most important stages of this process. The aim of this research is to study the dermal toxicological effects of ethanolic extract of roots of *Cestrum roseum* in Wistar rats. For this purpose, the collection and botanical identification of the plant was carried out. Afterwards, the extraction of the dry and pulverized roots was performed by maceration extraction with 96% ethanol for 5 days. The acute dermal toxicity was evaluated according to the guideline 402 from the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) at doses of 200, 1000 and 2000 mg/kg. The obtained results show that 24 h after the administration, the doses tested generated dermatitis, although no mortality was observed in the animals, neither changes in body weight or other signs and symptoms of toxicity. The histopathological analysis showed no damage in the organs studied except on the kidney, where dose-dependent alterations were observed. The hematological tests and biochemical profile did not show significant differences between the experimental groups with respect to the control. This study demonstrates that the ethanolic extract of roots of *Cestrum roseum* should be tested in other long-term toxicological studies before being considered as a dermatological therapeutic candidate.

# 1. INTRODUCCIÓN

La piel es un órgano complejo con múltiples funciones necesarias para mantener la homeostasis de nuestro organismo. El papel que desempeña es integral y abarca un espectro que va desde una función de barrera protectora, pasando por sus propiedades inmunológicas, endócrinas, sensitivas, metabólicas y termorreguladoras (1). La piel está formada por tres capas distintas: epidermis, dermis e hipodermis, con variados grados de especialización (2). Múltiples enfermedades que causan perturbación de la homeostasis cutánea han sido descritas, por lo que resulta de vital interés buscar nuevos candidatos terapéuticos que puedan ser utilizados por vía tópica sin ocasionar efectos toxicológicos relevantes.

El desarrollo de un nuevo candidato terapéutico ocurre 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 las entidades regulatorias para poder ser comercializados y administrados a seres humanos (3).

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 (3). En este esquema clásico el traslado de conocimientos se realiza desde la investigación básica hacia la clínica en un sentido unidireccional. Durante la fase preclínica los estudios toxicológicos constituyen piedra angular, ya que permiten demostrar la seguridad del candidato terapéutico y las dosis a las que puede ser utilizado en estudios farmacodinámicos ulteriores.

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, de esta manera fue que en cada región del mundo se comenzaron 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 cada región poseía una diversidad de plantas diferentes (4).

El género *Cestrum* de la familia de las Solanaceae, está ampliamente distribuido en México, siendo *Cestrum roseum* una de las especies del estado de Michoacán. Estudios fitoquímicos previos realizados con extractos obtenidos de *Cestrum roseum* mostraron la presencia importante de moléculas como ácido clorogénico, ácido ursólico y lupeol, reconocidas por sus efectos positivos a nivel dermatológico (5). Lo anterior sugiere que extractos de esta planta podrían ser explorados como candidatos terapéuticos por vía tópica, siendo para ello necesario probar en una primera etapa su toxicología antes de realizar estudios farmacodinámicos ulteriores.

Tomando en cuenta todos estos factores, la presente investigación tiene como objetivo global estudiar la toxicidad dérmica aguda del extracto etanólico obtenido a partir de la raíz de *Cestrum roseum* en ratas Wistar, utilizando para ello la guía 402 de la OCDE.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. La piel

La piel es la cubierta externa del cuerpo humano y uno de los órganos más importantes del mismo, tanto por tamaño como por sus funciones. La piel separa al organismo del medio ambiente externo y, al mismo tiempo, permite su comunicación con él, tiene una superficie de alrededor de  $2\text{m}^2$  (depende de la altura y peso de la persona) y un peso de 4 kg, lo que supone aproximadamente el 6% del peso corporal total. Es una envoltura completa, que en las regiones donde se encuentran los orificios naturales del organismo, se transforma paulatinamente en una mucosa (2).

La piel sana es una barrera contra agresiones mecánicas, químicas, tóxicos, calor, frío, radiaciones ultravioletas y microorganismos patógenos. Puede actuar como una barrera ambiental que protege los órganos principales, como una barrera de difusión que minimiza la pérdida de agua que podría resultar en deshidratación, y como una barrera metabólica que puede metabolizar un compuesto para eliminar más fácilmente los productos después de que haya ocurrido la absorción (1).

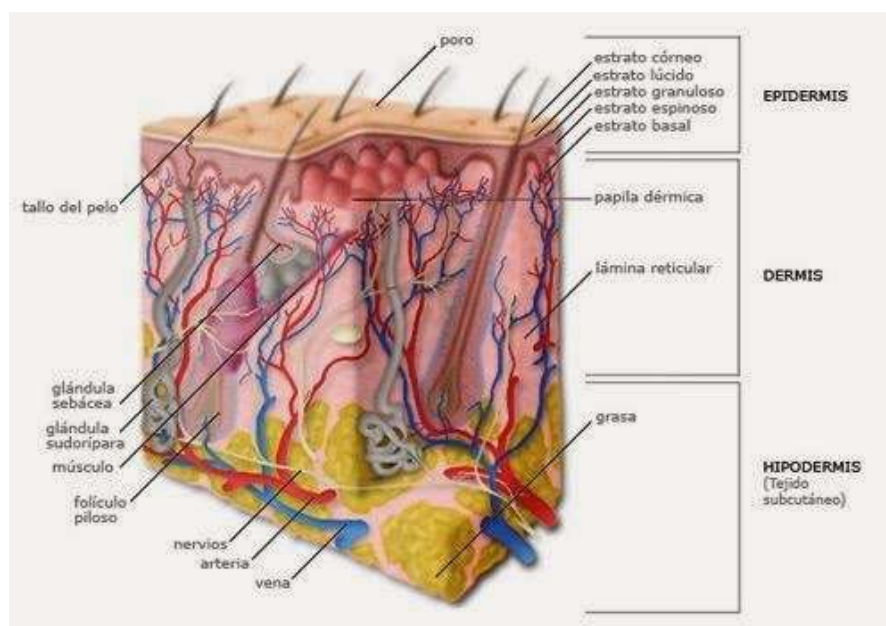
La piel puede funcionar en la regulación de la temperatura, en la que los vasos sanguíneos se contraen para conservar el calor y se dilatan para disipar el calor. El cabello y la piel actúan como aislantes, mientras que la sudoración facilita la pérdida de calor por evaporación. También constituye un eje inmunológico configurando una respuesta inflamatoria a un insulto extraño. Además, la piel tiene un estroma bien desarrollado, que soporta todos los demás órganos. La piel tiene propiedades neurosensoriales por las cuales los receptores detectan las modalidades del tacto, el dolor y el calor. Adicionalmente funciona como un órgano endocrino al sintetizar la vitamina D, siendo una diana para los andrógenos que regulan la producción de sebo y un objetivo para la insulina, en su regulación del metabolismo de los carbohidratos y los lípidos. La piel posee varias glándulas sebáceas que secretan sebo, considerado como una mezcla compleja de lípidos que funcionan como agentes antibacterianos o como un escudo repelente al agua en muchos animales. Las



glándulas sudoríparas apocrinas y ecrinas producen una secreción que contiene olor y funciones en la demarcación territorial. La piel desempeña un papel en la metabolización de la queratina, el colágeno, la melanina, los lípidos, los carbohidratos y la vitamina D, así como en la respiración y en la biotransformación de los xenobióticos (6).

Anatómicamente, este órgano se compone de tres capas distintas (Figura 1):

- La epidermis.
- La dermis o corion.
- El tejido subcutáneo o también denominado hipodermis o subcutis

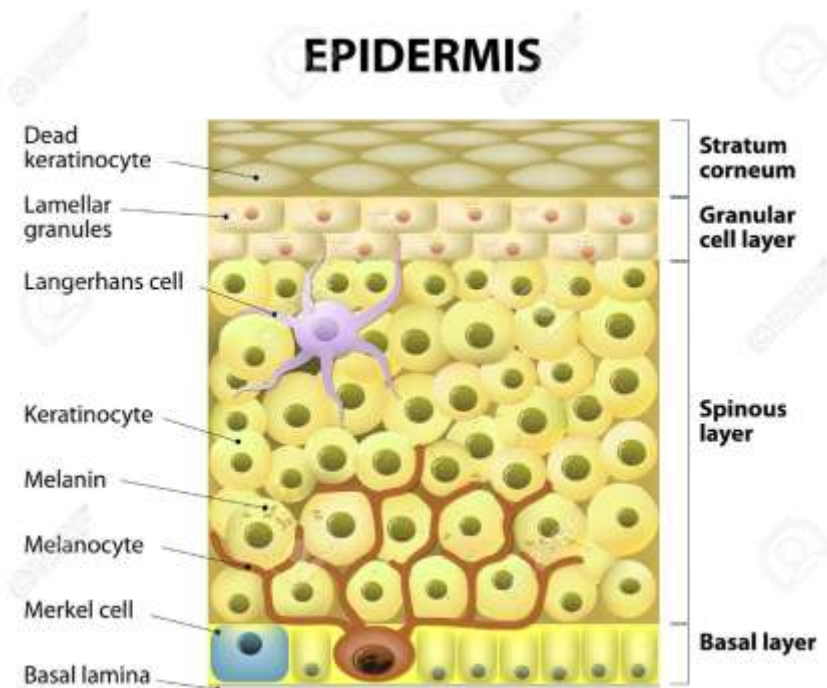


**Figura 1:** La piel y su composición (7).

### 2.1.1. Epidermis

La epidermis se compone de epitelio escamoso estratificado queratinizado derivado del ectodermo y forma la capa más externa de la piel (Figura 2). Dos tipos de células primarias, los queratinocitos y los no queratinocitos, comprenden esta capa. La clasificación de las capas epidérmicas de la superficie externa hacia la interna es la siguiente: estrato córneo (capa córnea), estrato lúcido (capa transparente), estrato

granuloso (capa granular), estrato espinoso (capa espinosa o espinosa) y estrato basal (basal capa) (6).



**Figura 2:** Capas que componen la epidermis (8).

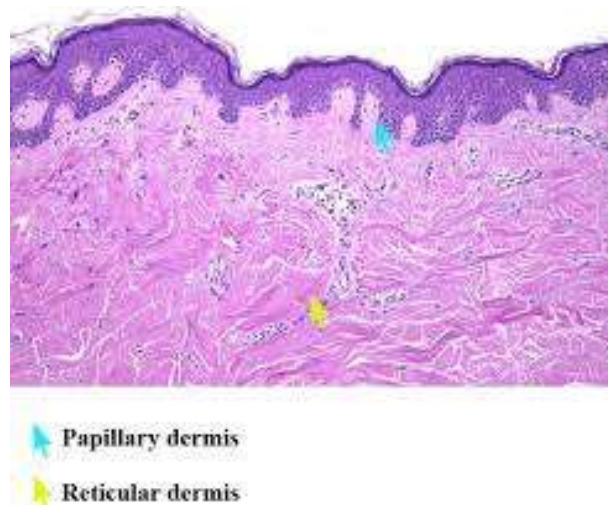
Además de los queratinocitos, existe otra población de células; comúnmente conocido como los no queratinocitos e incluye los melanocitos, las células de Merkel (células epitelioides táctiles) y las células de Langerhans (macrófagos intraepidérmicos) que residen dentro de la epidermis, pero no participan en el proceso de queratinización. La epidermis es avascular y experimenta un patrón ordenado de proliferación, diferenciación y queratinización. Varios apéndices cutáneos, como pelo, sudor y glándulas sebáceas, órganos digitales (uñas) son especializaciones de la epidermis. Debajo de la epidermis se encuentra la dermis, que es de origen mesodérmico y consiste en un tejido conectivo irregular denso.

### 2.1.2. Dermis

La dermis o el corio se encuentra directamente debajo de la membrana basal y consiste en un tejido conectivo irregular denso con un fieltro de colágeno, elástico y

fibras reticulares incrustadas en una sustancia fundamental amorfa de mucopolisacáridos. Los tipos de células predominantes de la dermis son fibroblastos, mastocitos y macrófagos. Además, las células plasmáticas, los cromatóforos, las células grasas y los leucocitos extravasados a menudo se encuentran en asociación con los vasos sanguíneos, los nervios y los linfáticos. Glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, folículos pilosos están presentes dentro de la dermis (6).

De manera arbitraria, la dermis se puede dividir en una capa papilar superficial que se mezcla en una capa reticular profunda. La capa papilar es delgada y consiste en tejido conectivo suelto, que está en contacto con la epidermis y se ajusta al contorno de las crestas y surcos epiteliales basales. Cuando sobresale en la epidermis, da lugar a la papila dérmica. Cuando la epidermis se invagina en la dermis, se forman las clavijas epidérmicas. La capa reticular es una capa más gruesa formada por tejido conectivo denso irregular con menos células y más fibras (Figura 3) (6).



**Figura 3:** Capas de la Dermis (9).

### 2.1.3. Hipodermis

La hipodermis (subcutis), es una capa de tejido conectivo suelto que se encuentra debajo de la dermis. No es parte de la piel, sino la fascia superficial, como se ve en las disecciones anatómicas generales. La hipodermis ayuda a anclar la dermis al

músculo o hueso subyacente. La disposición suelta de colágeno y fibras elásticas permite la flexibilidad de la piel y el movimiento libre sobre las estructuras subyacentes (6).

El límite entre la dermis reticular profunda y la hipodermis es una transición abrupta de un tejido conjuntivo dérmico predominantemente fibroso a un tejido subcutáneo fundamentalmente adiposo, las dos regiones están integradas de forma estructural y funcional, mediante redes de nervios y vasos, y mediante la continuidad de los apéndices epidérmicos. Los folículos pilosos en crecimiento activo tensan la piel y se extienden hacia la grasa subcutánea, y las glándulas sudoríparas apocrinas y ecrinas se encuentran normalmente confinadas a esta profundidad de la piel (6).

Los adipocitos forman la masa principal de células de la hipodermis. Están organizados en lóbulos definidos por tabiques de tejido conjuntivo fibroso. Los nervios y vasos linfáticos están localizados dentro de los tabiques e inervan, nutren y drenan la región. La síntesis y almacenamiento de grasa continúa por la acumulación facilitada en las células adiposas, o por el reclutamiento de nuevas células (10).

## **2.2. 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, lo que generó que se permitiera la comercialización de muchos fármacos ineficaces y de muchos otros que eran muy perjudiciales para la salud provocando verdaderas tragedias.

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 (5).

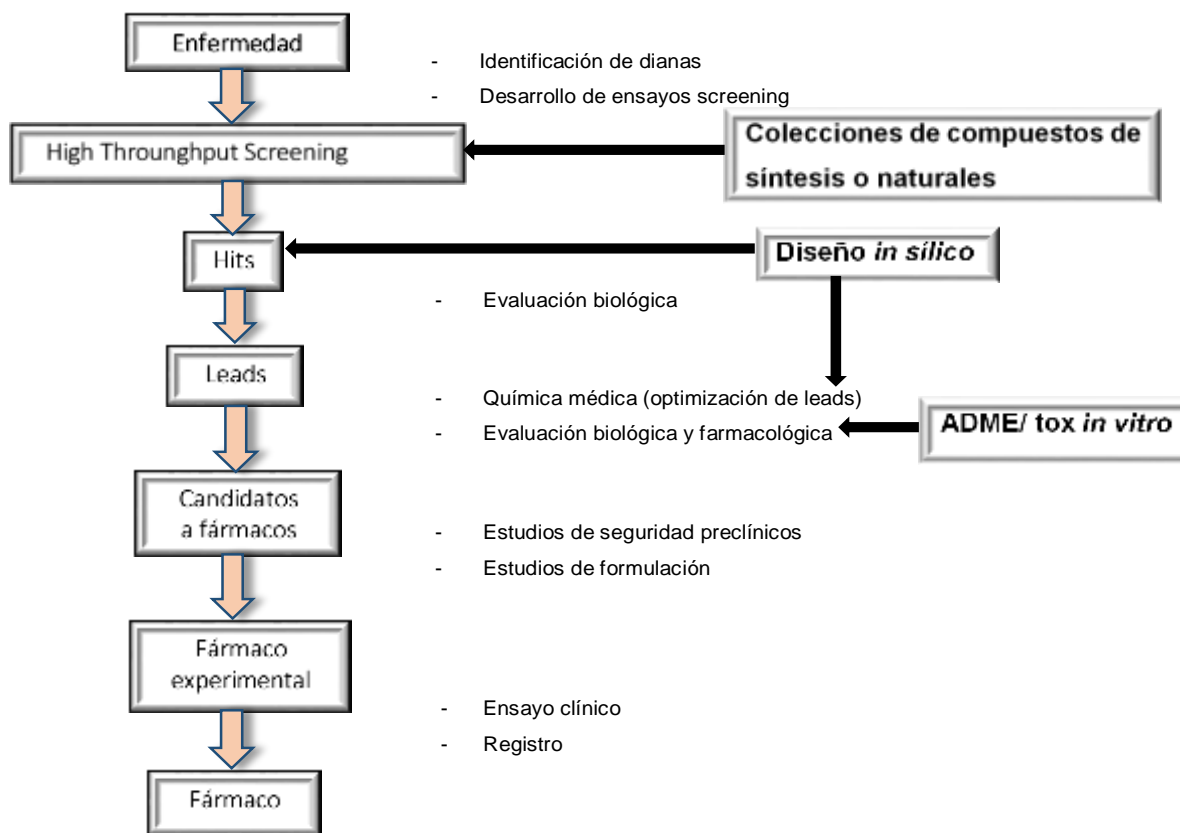
Para evaluar esta relación es necesario considerar que el uso de un medicamento en la práctica clínica solo se justifica si los posibles beneficios superan a los riesgos potenciales, lo que se determina en base al conocimiento de la enfermedad, la historia del paciente, las características del fármaco 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 que se presentan a continuación (Figura 4):

- 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).
- h) los ensayos clínicos multicéntricos a mayor escala para evaluar la seguridad y eficacia (fase III).

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 (11).

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 Administración de Alimentos y Fármacos (FDA) en Estados Unidos, 2) la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) en Europa y la 3) la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) en México (12).



**Figura 4:** El proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Modificado de (11).

## 2.2.1. Etapas del desarrollo farmacéutico

### 2.2.1.1 Etapa de descubrimiento

La fase de descubrimiento se relaciona con la búsqueda de moléculas como candidatas para el tratamiento de una determinada patología. 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. La fase de descubrimiento a su vez se divide en 4 sub-fases (7).

- 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. 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 caracterizadas. 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 (7).
- 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. 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). 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). Habitualmente estos ensayos de validación son llevados a cabo en modelos *in vivo* e *in vitro* (13).

### **2.2.1.2 Desarrollo preclínico**

En la fase preclínica se llevan a cabo 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 en humanos. 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 régimen de dosificación (11).

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. También en esta fase se lleva a cabo 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 (8).

### **2.2.1.3 Desarrollo clínico**

Los ensayos clínicos son realizados para comprobar la eficacia y seguridad de los nuevos medicamentos previamente evaluados en la fase preclínica en seres humanos 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. Una vez autorizado el uso en humanos del candidato terapéutico por el organismo regulatorio que compete al sitio donde se realiza el estudio, se inicia el estudio clínico el cual a su vez se divide en cuatro sub-fases que se describen a continuación (14).



### ***Fase I***

Esta fase tiene una duración de entre 1 y 2 años, siendo la primera vez que el nuevo candidato es administrado en el ser humano. 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. 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 (5).

### ***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 (11, 14).

### ***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. Estos estudios son multicéntricos, y controlados y siguen las guías internacionales publicadas por la conferencia Internacional de Armonización (ICH). Una vez obtenidos los resultados de la fase III y cuando el patrocinador está convencido de su eficacia y seguridad para ser comercializado, solicita a la agencia regulatoria competente que el candidato sea considerado como un nuevo fármaco. En Estados Unidos la FDA es quien otorga y aprueba la NDA (New Drug Application). 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 (11).

#### ***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 (11).

### **2.2.2 Particularidades del desarrollo farmacéutico para el diseño de medicamentos tópicos**

En terapéutica tópica dermatológica intervienen tres elementos fundamentales que condicionan la eficacia y seguridad de un producto tópico: la piel, el vehículo y el principio activo. En la piel, el grado de hidratación desempeña un papel relevante para facilitar la penetración de los fármacos y la absorción es variable en función de la región anatómica. En cuanto al vehículo, su elección depende del tipo de fármaco que puede transportar, del grado de absorción necesaria, el tipo de patología a tratar y la localización anatómica. Respecto al principio activo, su elección depende de la patología a tratar, de su farmacocinética, de la concentración utilizada, así como de la forma de aplicación y tiempo de exposición. Estos aspectos, unidos al metabolismo cutáneo también condicionan el grado de toxicidad que un producto tóxico puede presentar.

La elección de la terapéutica tópica requiere del conocimiento de los aspectos cinéticos que regulan el paso de los fármacos a través de la piel y de su comportamiento cuando se mezclan con los vehículos que los transportan (15).

### **2.2.3 Estrategias utilizadas en el desarrollo farmacéutico a partir de plantas**

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. 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 (16).

De esta manera fue que en 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 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 método de extracción determinado, llamados extractos (17).

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.

Una de las limitaciones del uso extensivo de plantas en la medicina moderna ha sido la falta de investigaciones fitoquímicas, farmacológicas y toxicológicas, siguiendo rigurosos diseños experimentales apegados a las normas éticas y protocolos internacionales definidos. Por ello, se ha señalado, que nuevas investigaciones son necesarias para explorar la gran biodiversidad de la flora existente a nivel global. De hecho, se estima que solo entre 20000 y 50000 especies vegetales se han utilizado para curar enfermedades, de las cuales una pequeña cantidad de ellas ha sido estudiada con el fin de desarrollar medicamentos. De todas las especies terrestres solo entre 15 y 20% han sido analizadas, por lo que en consecuencia el resto de las plantas aún no estudiadas son una gran oportunidad para poder encontrar principios activos novedosos. La OMS señala que los estudios existentes dirigidos a las plantas medicinales aún son insuficientes 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(18) (4).

A pesar de este desconocimiento existente, algunas plantas han sido desde hace muchos años fuente para la obtención de agentes farmacéuticos. 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. 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 (18).

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 confiere 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. 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 (19).

Hoy día son tres las estrategias más utilizadas para el desarrollo de fármacos a partir de plantas, las que serán explicadas a continuación:

### **2.2.3.1 Estrategia quimiotaxonómica**

Consiste en la sistematización de las relaciones filogenéticas de los diferentes *taxa* y las rutas biosintéticas mediante las que se forman los metabolitos secundarios. La presencia de diferentes compuestos como marcadores biosintéticos es empleada por los botánicos en sus estudios de taxonomía; pero también sirve como herramienta en la selección exitosa de familias, subfamilias y géneros para ser investigados en función de los metabolitos que se prevé producen y que pueden ser fuente de nuevos medicamentos. Es por ello que se pueden seleccionar especies bien relacionadas filogenéticamente de plantas con actividad conocida o plantas que contienen el mismo tipo de entidad química conocidas por su actividad (18).

### **2.2.3.2 Estrategia etnofarmacológica**

La investigación etnofarmacológica la podemos definir como una integración de diferentes especialidades (botánica taxonómica, etnobotánica, química extractiva y estructural y farmacología experimental y clínica), que estudia de un modo científico las propiedades terapéuticas atribuidas por el saber tradicional a todo tipo de productos naturales que han estado en uso y se aplican actualmente (20).

Esta etapa multidisciplinaria se desarrolla en dos etapas fundamentales:

1. Un estudio de campo, que consiste en recoger los usos terapéuticos de las plantas prescritas por los sanadores, médicos tradicionales y la población local, validadas por una rigurosa identificación botánica y el cálculo de parámetros estadísticos que indiquen las especies más prometedoras.
2. Un estudio farmacológico en laboratorio que evalúa la eficacia de las medicinas tradicionales. Esta vía de investigación puede llegar a seleccionar unos tratamientos eficaces mediante la evaluación de las indicaciones terapéuticas tradicionales, y a la vez contribuir a enriquecer el universo terapéutico al permitir el descubrimiento de nuevos medicamentos a base de extractos vegetales.

En la actualidad, en muchos países en desarrollo ha ocurrido una pérdida importante del conocimiento tradicional sobre el uso de plantas medicinales y de otras plantas útiles, transmitido de generación en generación. Aunado a ello, la disponibilidad de tales plantas se ha visto reducida por la degradación de los bosques y su conversión a bosques secundarios y campos agrícolas. En consecuencia, la cadena de transmisión de dicho conocimiento se encuentra en riesgo, por lo que resulta de vital importancia rescatar el conocimiento tradicional a través de investigaciones etnofarmacológicas (21).

### **2.2.3.3 Estrategia al azahar**

Los métodos de prospección al azahar de la flora, seguida de tamizajes fitoquímicos cualitativos, siguen teniendo preferencia en la búsqueda de compuestos activos por parte de la industria farmacéutica, aunque en los últimos años se ha prestado especial atención a la utilización de la información etnobotánica para la selección de plantas en la búsqueda de compuestos con actividad biológica (18).

La estrategia al azahar no sigue, como en el caso de las dos previamente explicadas un algoritmo que implique el análisis de los metabolitos secundarios presentes en las *taxas* o el conocimiento tradicional acumulado, sino que la planta se elige, como lo

indica su nombre, siguiendo otros parámetros, como su disponibilidad, cercanía, falta de información en la literatura, etc.

### **2.2.3 La evaluación toxicológica preclínica: una etapa esencial del 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 y para ello se utilizan diversos modelos experimentales. La toxicidad que presentan las sustancias analizadas puede observarse de diferentes formas: a) estudiando la exposición accidental al compuesto ; b) realizando estudios *in vitro* utilizando células/líneas celulares; c) analizando la exposición *in vivo* en animales de experimentación (22).

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 (23).

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 (24).

#### **2.2.3.1 Consideraciones regulatorias en la evaluación preclínica toxicológica**

El objeto de la fase preclínica es caracterizar la eficacia y seguridad del medicamento en animales o sistemas “*in vitro*”. Es requisito indispensable para obtener la autorización por parte de las entidades reguladoras a proceder al ensayo en humanos presentar en un expediente toda la información preclínica obtenida.

Cada fármaco particular necesita su propio desarrollo preclínico debiendo tenerse en cuenta diversos factores: tipo de compuesto, mecanismo de acción e indicaciones clínicas. Es especialmente importante conocer el ámbito regulatorio y las guías que aplican. En este sentido es fundamental contemplar dónde se va a realizar el desarrollo clínico, ya que en ocasiones los requisitos regulatorios de EEUU (FDA, EMA (Agencia Europea de Medicamentos) o COFEPRIS) pueden diferir. Igualmente, resulta importante para definir el desarrollo preclínico más adecuado tener en cuenta el diseño del ensayo clínico, así como duración del tratamiento, vía y pauta de administración, tipo de población sujeta a estudio, etcétera (3).

### **2.2.3.2 Evaluación de la toxicidad aguda**

La toxicidad aguda es la capacidad de una sustancia de presentar efectos adversos en una sola administración utilizando dosis relativamente elevadas, 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<sub>50</sub>), aunque esta tendencia ha variado en los últimos años, con la llegada de los métodos toxicológicos alternativos.

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 (25).

- 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<sub>50</sub> 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 (25).

- 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 sí 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 (25).
- 3) Arriba y abajo: Este procedimiento solo utiliza un animal por etapa, lo más 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 produzca la muerte o no del primer animal y esto así hasta que se presente una de esta 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 (25).

### **2.2.3.3 Evaluación de la toxicidad subaguda**

En los estudios de toxicidad subaguda se utilizan dosis más bajas que las empleadas en los estudios agudos, pero la administración por períodos repetidos (semanas, límite 90 días).

En estas pruebas, la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Los principales organismos de salud requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad subaguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen

utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia (vehículo, dosis baja, media, dosis alta o vehículo, dosis baja, dosis media baja, dosis media alta y dosis alta) (26).

A partir de estos estudios se pueden calcular parámetros como el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) definida como la máxima concentración o nivel de una sustancia, hallada experimentalmente o por observación, que no causa alteraciones adversas detectables en la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida de los organismos diana, distinguibles de los observados en organismos normales (control) de la misma especie y cepa, bajo condiciones definidas de exposición (25). Es posible también determinar otros parámetros como la LOAEL, considerada como el nivel de mínimo efecto tóxico observable y entendida como la menor concentración o cantidad de una sustancia, hallada experimentalmente o por observación, que provoca una alteración adversa de la morfología, la capacidad funcional, el crecimiento, el desarrollo, o duración de la vida útil de los organismos diana, distinguibles de los observados en organismos normales (control) de la misma especie y cepa, bajo condiciones definidas e idénticas a las de exposición (25).

#### **2.2.3.4 Evaluación de la toxicidad subcrónica**

Los estudios toxicológicos subcrónicos de las sustancias permiten evaluar el potencial toxicológico y obtener información sobre la toxicidad acumulativa de una sustancia en los órganos diana, así como la tolerancia fisiológica y metabólica de un compuesto a una exposición de mayor duración que la utilizada en un estudio subagudo a bajas dosis. Para estos estudios existen regulaciones establecidas para el diseño, la conducción del ensayo y la interpretación de los resultados (27).

Los objetivos del estudio típico subcrónico se dividen en tres categorías. El primero es definir ampliamente la toxicidad (y, si se sabe, la farmacología) de dosis repetidas de un agente terapéutico potencial en un modelo animal. Esta definición es tanto cualitativa (cuáles son los órganos diana y la naturaleza de los efectos vistos) como cuantitativa (a qué niveles de dosis, o, más importante, a qué niveles plasmáticos y

tisulares, los efectos se ven y no se ven definitivamente). Además, busca caracterizar la toxicidad acumulada del fármaco en estudio. Dicha toxicidad acumulativa rara vez se predice por una dosis única de toxicidad aguda (28).

El segundo objetivo (y el que en la industria farmacéutica generalmente obliga tanto el tiempo como el compromiso de diseño y ejecución) es brindar apoyo para el inicio y/o la continuación de la realización de ensayos clínicos en humanos. Como tal, los estudios subcrónicos deben proporcionar no solo un aclaramiento adecuado (margen terapéutico) de los niveles de dosis iniciales y la duración de la dosis, sino también una guía para tomar medidas especiales o tomar precauciones en los ensayos clínicos iniciales. Establecer niveles de dosis inapropiados (demasiado bajos o demasiado altos) puede llevar a la falla de un estudio (28).

El tercer objetivo permite proyectarse en los estudios toxicológicos posteriores. El estudio subcrónico debe proporcionar información suficiente para permitir un ajuste prudente de las dosis para estudios posteriores más largos (incluidos, en última instancia, estudios de carcinogenicidad). Al mismo tiempo, este tipo de estudios también debe proporcionar una guía para las otras características de diseño (a excepción de la dosis) de los estudios a más largo plazo (como qué parámetros medir y cuándo medirlos, cuántos animales usar y cuánto tiempo usar) para realizar el estudio (28).

### **2.2.3.5 Evaluación de la toxicidad crónica**

La toxicidad crónica es la propiedad de una sustancia de causar daños a largo plazo. Estos efectos tienen un período de latencia y se manifiestan después de un largo tiempo. Los efectos tóxicos crónicos pueden resultar de una exposición simple severa o repetidas exposiciones a lo largo de un período. Los efectos crónicos pueden ser: neurológicos (daño al Sistema Nervioso), mutagénicos (daño al material genético que puede ser transmitido a futuras generaciones), cancerosos (que pueden causar cáncer), o pueden estar dirigidos hacia el sistema Reproductor (daño al

sistema reproductivo femenino/ masculino), pudiendo además ocasionar efectos teratogénicos (daño al embrión/ feto) (29).

Los estudios crónicos pueden durar seis, nueve meses o un año y también persiguen los mismos propósitos de los estudios subcrónicos, pero se realizan principalmente para cumplir con los requisitos de registro para medicamentos que están destinados a un uso continuo a largo plazo (de por vida) o un uso frecuente e intermitente (28). Los requerimientos en cuanto al número de animales varían según la duración del estudio (Tabla 1).

**Tabla 1:** Número de animales por sexo en los estudios subagudos, subcrónicos y crónicos (25).

<b>Duración del estudio</b>	<b>Ratas por sexo</b>	<b>Perros por sexo</b>	<b>Primates por sexo</b>
2-4 semanas (Subagudo)	5-10	3-4	3
3 meses (Subcrónico)	20	6	5
6/9/12 meses (Crónico)	30	8	5
Carcinogenicidad (24 meses)	50	10	10

### **2.2.3.6 Métodos de evaluación de la toxicidad dérmica**

La toxicidad dérmica aguda es el efecto adverso causado por un producto químico de prueba después de una exposición ininterrumpida por aplicación cutánea durante un corto período de tiempo, 24 h o menos (30).

En interés tanto de la ciencia como del bienestar animal, las pruebas de toxicidad dérmica aguda *in vivo* no deben considerarse hasta que todos los datos disponibles relevantes para la toxicidad dérmica potencial del producto químico de prueba se hayan evaluado en un análisis de la sustancia en estudio. Toda la información disponible sobre el producto químico de prueba debe considerarse antes de realizar

el estudio. Dicha información incluirá la identidad, el pH, poder tampón y la estructura química del producto de prueba, sus propiedades fisicoquímicas, los resultados de cualquier otro ensayo de toxicidad *in vitro* o *in vivo* en el producto químico de prueba, los datos que indiquen la relación estructura/actividad disponibles y los datos toxicológicos sobre sustancias relacionadas estructuralmente; el uso o usos anticipados del producto químico de prueba, el potencial de exposición humana relevante y el uso esperado de los datos generados. Esta información ayudará a justificar la realización de este estudio y, de ser así, a la selección de una dosis inicial adecuada. Un principio del método es que solo se usan las dosis que se espera que sean moderadamente tóxicas, y que se debe evitar la administración de dosis que se espera que sean letales (30) para evitar el sufrimiento de los animales.

En los estudios de toxicidad dérmica se emplean diferentes modelos animales siendo los más conocidos la rata, el ratón y el cerdo (31). Aunque estos modelos son de gran utilidad para predecir el comportamiento de un determinado compuesto en la piel, existen diferencias importantes con respecto a la piel humana en cuanto al grosor de los estratos cutáneos, el diámetro y densidad de los folículos pilosos y por consiguiente en la permeabilidad de los compuestos (Tabla 2), por lo que debe tomarse especial cuidado con la extrapolación de los resultados a la piel humana.

**Tabla 2:** Diferencias de la piel humana con respecto a la piel de modelos animales utilizados en los estudios toxicológicos.

Tipo de piel	Grosor del estratum corneum (µm)	Grosor de la epidermis (µm)	Grosor de la piel completa (mm)	Número de folículos pilosos/cm <sup>2</sup>	Diámetro de los folículos pilosos (µm)
Humana	16.8	46.9	2.97	11 (Abdomen)	97 (Abdomen)
Cerdo	26.4	65.8	3.43	11 (Región dorsal)	177 (Región dorsal)
Rata	18.4	32.1	2.09	289 (Región dorsal)	25 (Región dorsal)
Ratón	5.8	12.6	0.84	658 (Región dorsal)	26 (Región dorsal)

Modificado de (31).

La guía 402 de la OCDE proporciona una metodología eficaz para estudiar la toxicidad dérmica de un determinado compuesto o de mezclas de compuestos. En este procedimiento, las cohortes de animales del mismo sexo están expuestas a la sustancia de prueba en un procedimiento secuencial de escalado de dosis. La dosis se elige de modo que se esperen signos claros de toxicidad con esta concentración, pero sin efectos tóxicos graves ni mortalidad. Otros grupos de animales reciben dosis más altas o menos fuerte según la ausencia o presencia de efectos tóxicos o mortalidad. De esta manera, se continúa hasta que se identifique la dosis que causa un efecto tóxico o la muerte de un solo animal. El procedimiento también se interrumpe cuando la dosis más alta no produce ningún efecto observado o cuando la dosis más baja provoca la muerte de un animal. En esta prueba, el modelo de elección es la rata adulta. Con respecto al sexo más apropiado, se considera que hay poca diferencia en cuanto al sexo siendo las hembras más sensibles. Por eso se recomienda trabajar en hembras (30).

### **2.3 Importancia del uso de las plantas para el desarrollo de medicamentos**

Los medicamentos han formado parte de la vida del ser humano desde los tiempos remotos. Ellos hacen que nuestras vidas sean mejores por el efecto curativo que presentan ayudando a la recuperación del organismo debido a los desequilibrios producidos por las enfermedades, reduciendo los dolores, ayudando a combatir infecciones, quitando la fiebre y permitiendo la mejoría de alteraciones de salud como la presión alta o la diabetes. Además, pueden prevenir la aparición de enfermedades, impidiendo que estas lleguen a afectarnos. Su impacto en la sociedad moderna ha sido tan grande que a ellos puede atribuírseles, junto con otros factores, el que hoy tengamos una esperanza de vida que supere los 70 años (32).

Así, nos remontamos a la época antigua, los medicamentos se usaban fundamentalmente como preparados a partir de plantas u hongos medicinales. La historia de la medicina y la farmacia comienzan con las grandes civilizaciones de la antigüedad provenientes de Egipto, Mesopotamia, Irán y por supuesto las de la

América precolombina (Incas, Mayas y Aztecas). Sin embargo, no fue hasta 1805 que se logró aislar el primer alcaloide natural, la morfina, a partir de la planta *Papaver somniferum* y a partir de entonces se extendió por todo el mundo occidental el uso de compuestos puros los que se preferían en lugar de preparaciones a partir de plantas y hongos. Este sencillo hecho revolucionó el mundo de la química y dadas las propiedades analgésicas del compuesto, sentó las bases para el nacimiento de la industria farmacéutica moderna (32).

Más adelante los avances tecnológicos permitieron la obtención de medicamentos a partir de la síntesis química como los derivados del alquitrán con efectos antipiréticos (Aminopirina y Fenacetina) y el Ácido Acetil Salicílico, sintetizado en 1897 gracias a los experimentos de Félix Hoffman de Bayer quien, a partir de la salicilina presente en la corteza del sauce, logró una modificación estructural, convirtiéndose en el analgésico más popular del mundo conocido como la aspirina. En todo el mundo se estudió el uso de productos naturales, entendiéndose como tal a compuestos (metabolitos) producidos por plantas, hongos, microorganismos y organismos marinos con el objetivo de descubrir nuevos antibióticos. Así salieron a la luz otros antibióticos de origen natural actualmente utilizados tales como la estreptomina, el cloranfenicol, la cefalosporina C, la eritromicina y la vancomicina (32).

A pesar de la importancia que tuvieron los productos naturales en el descubrimiento de nuevos medicamentos hasta los años 80 del pasado siglo, a inicio de los años 90 las grandes industrias farmacéuticas comenzaron a desligarse de este tipo de investigaciones. Además, a inicios de los 90 la química combinatoria se desarrolla a gran velocidad. De hecho, a diferencia de los métodos de síntesis de la química tradicional, la química combinatoria permite producir de manera deliberada y simultánea una gran cantidad de moléculas (llamadas colectivamente bibliotecas) en forma muy eficiente, siendo capaz de suplir las necesidades cada vez más crecientes de la industria a un menor precio. Esto provocó que las grandes compañías farmacéuticas invirtieran en el desarrollo de estos métodos en lugar de costear la larga investigación que conlleva al aislamiento e identificación de compuestos a partir de matrices naturales (32).

Sin embargo, en los últimos años se ha retomado la importancia de estos productos en el desarrollo de medicamentos dada la disminución importante del número de medicamentos registrados derivados de la química combinatoria. Algunas de las ventajas que se han señalado a los productos naturales para el desarrollo de medicamentos se relacionan con el gran tamaño de sus estructuras químicas, encerrando en sí varios centros estereogénicos. Además, las mismas poseen una gran flexibilidad molecular, comparadas con las creadas por síntesis combinatoria, lo que les permite adoptar diferentes conformaciones espaciales, de forma de garantizar una unión óptima a biomoléculas implicadas en la patogénesis de enfermedades, también conocidas como dianas farmacológicas.

Si consideramos que el número de plantas superiores es aproximadamente de 500,000 especies y que solo el 15% de ellas han sido analizadas desde el punto de vista farmacológico y fitoquímico resulta lógico pensar que hay todo un universo de ellas disponibles para el descubrimiento de nuevos medicamentos en el futuro. Esto resulta más significativo en el caso de los organismos marinos y microorganismos, ya que se cree que menos del 1% de los microorganismos visibles al microscopio ha sido cultivado, y el mundo marino es casi completamente inexplorado, por lo que nos encontramos frente a un tesoro inestimable de nuevas moléculas por descubrir (32).

## **2.4 Estudios fitoquímicos y farmacológicos realizados con *Cestrum roseum***

México es un país con una gran diversidad de plantas medicinales, siendo la familia *Solanaceae* una parte importante de la biodiversidad, ya que algunas especies poseen gran interés económico. Esta familia encuentra es especialmente rica en especies y endemismos en los géneros *Solanum*, *Physalis*, *Lycianthes* y *Cestrum*, así como en géneros restringidos como *Nectouxia*, *Datura*, *Tzeltalia* o *Plowmania* (33). Una especie que se encuentra distribuida en el estado de Michoacán es *Cestrum roseum* (Figura 5) aunque ha recibido poca atención en cuanto a su análisis fitoquímico y exploración de características farmacológicas y toxicológicas.





**Figura 5:** *Cestrum roseum*.

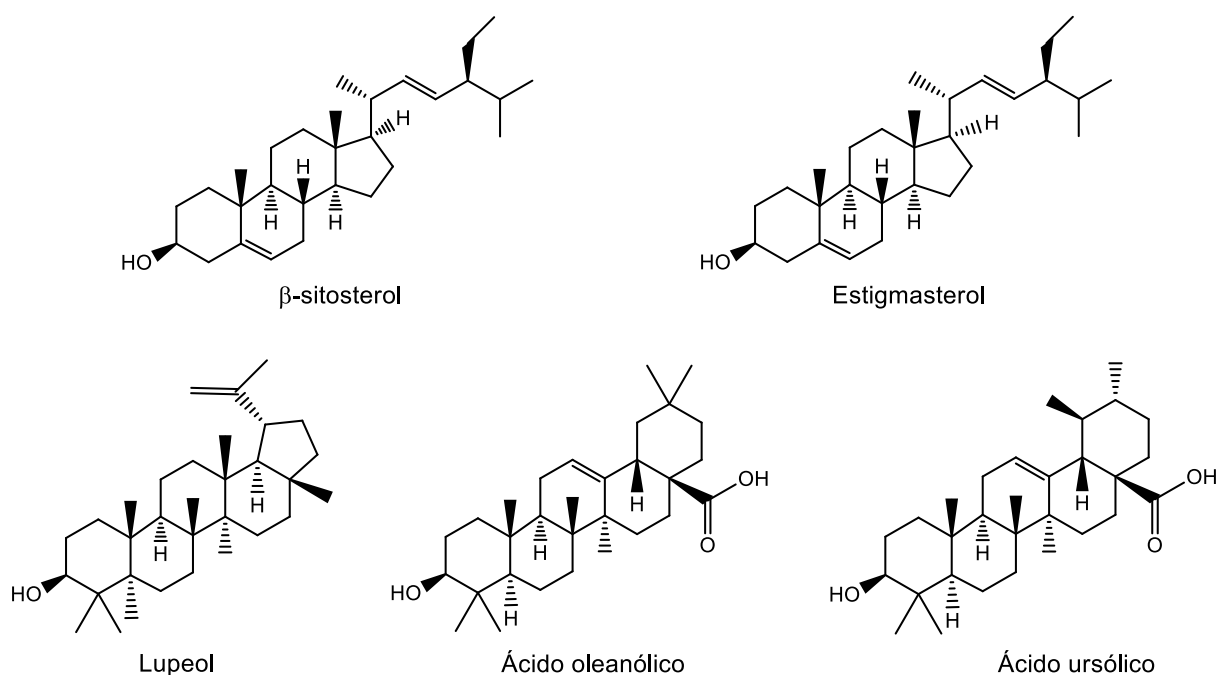
Se trata de un arbusto hasta de 2 (5) m de alto que se caracteriza por poseer ramas jóvenes de color gris-verdoso, o bien, morado pardo con peciolo de 0.6 a 2.2 cm de longitud, verde o morado; limbo ovado lanceolado u oblongo-lanceolado, de 7 a 13 cm de longitud y de 3 a 5.3 cm de ancho, ápice acuminado y base subredondeada, *C. roseum* es conocida comúnmente como “Hediondilla” (34).

Un estudio realizado previamente con la especie ha mostrado la presencia de saponinas, coumarinas y antraquinonas en el extracto metanólico de la planta completa (35). Dicho extracto también resultó ser rico en fenoles totales (419 mg/EAG), flavonoides totales (510 mg/EQ) y ácido caféico (1.6 mg/g dw). Sin embargo, el resultado más importante de este estudio fue la presencia en dicho extracto de ácido clorogénico (614.9 mg/g dw). El ácido clorogénico posee importantes propiedades farmacológicas a nivel dermatológico pudiendo inhibir el desarrollo de tumores cutáneos (36), proteger a la piel contra el daño causado por las radiaciones ultravioletas (37) y actuar como antiinflamatorio tópico (38).

En un estudio ulterior, se realizó un análisis fitoquímico completo de extractos de la planta por tejidos y se observó la presencia en los extractos hexánicos de cadenas

hidrocarbonadas correspondientes al ácido pentanoico, ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido hexadecanoico, ácido octadecanoico, ácido-9-octadecenoico, ácido 9,12- octadecadienoico, pentacosano y al octacosano (Tabla 3). También se identificó como compuestos mayoritarios a los triterpenos  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, lupeol, ácido oleanólico y ácido ursólico (Figura 6) (39), los cuales muestran una tendencia aparecer en los extractos de baja polaridad, así como en menor cantidad en los extractos de mayor polaridad. Cabe mencionar que estos compuestos tienen actividad biológica como antiinflamatorios, antibacterianos, antifúngicos y antimicrobianos (31).

En los extractos metanólicos de tallo y raíz se identificaron los compuestos 4'-hidroxi-fenetil-*trans*-ferulato y 4'-hidroxi-3'-metoxi-fenetil-*trans*-ferulato, considerados ésteres fenilpropanoides. Cabe resaltar que fueron aislados por primera vez en el género *Cestrum* (41).



**Figura 6:** Compuestos mayoritarios aislados durante el estudio fitoquímico de *Cestrum roseum* (41).

**Tabla 3:** Compuestos en mayor abundancia de los extractos crudos de cada una de las partes de *Cestrum roseum* (41).

Nombre	Nombre común	Flores	Fruto	Tallo	Hojas	Raíz
Ácido pentanoico $C_5H_{10}O_2$	Ácido valérico	✓		✓		
Ácido hexanoico $C_6H_{16}O_2$	Ácido caproico		✓			
Ácido octanoico $C_8H_{16}O_2$	Ácido caprílico		✓			
Ácido dodecanoico $C_{12}H_{24}O_2$	Ácido láurico		✓			
Ácido tetradecanoico $C_{14}H_{28}O_2$	Ácido mirístico	✓	✓			✓
Ácido hexadecanoico $C_{16}H_{32}O_2$	Ácido palmítico	✓	✓	✓	✓	✓
Ácido octadecanoico $C_{18}H_{36}O_2$	Ácido esteárico	✓	✓	✓		
Ácido-9-octadecenoico $C_{18}H_{34}O_2$	Ácido oleico	✓	✓	✓		
Ácido 9,12-octadecadienoico $C_{18}H_{32}O_2$	Ácido linoleico		✓		✓	✓
Pentacosano $C_{25}H_{52}$			✓			
Octacosano $C_{28}H_{58}$		✓	✓			✓

### 3. JUSTIFICACIÓN

*Cestrum roseum* es una especie distribuída en el estado de Michoacán que ha sido pobremente estudiada con respecto a su bioactividad. A pesar de esto, estudios anteriores demuestran la presencia en sus tejidos de moléculas bioactivas tales como el ácido clorogénico, ácido ursólico y lupeol lo que la convierte en una especie interesante a ser explorada por vía tópica para el tratamiento de múltiples enfermedades dermatológicas.

Considerando que, durante el desarrollo farmacéutico, la evaluación toxicológica por la vía pretendida de administración del candidato terapéutico resulta esencial para determinar las concentraciones seguras con las que podrá ser evaluado en estudios farmacodinámicos y farmacocinéticos, en el presente estudio se llevó a cabo un estudio de toxicidad dérmica aguda en ratas Wistar siguiendo los lineamientos de la OCDE. Los resultados de este estudio resultan cruciales para definir el potencial tóxico del extracto por vía cutánea, realizar estudios ulteriores de toxicidad y determinar las dosis de partida para estudios farmacológicos futuros.

## 4. HIPÓTESIS

El extracto etanólico de raíces de *Cestrum roseum* presenta una baja toxicidad dérmica aguda en ratas Wistar, lo que le permitirá proseguir con etapas sucesivas de su desarrollo farmacéutico como candidato terapéutico dermatológico.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

- ✓ Determinar la toxicidad dérmica aguda de un extracto etanólico de raíces de *Cestrum roseum* en ratas Wistar según los lineamientos de la OCDE.

### 5.2 Objetivos específicos

- ✓ Determinar la presencia de signos y síntomas de toxicidad sistémica y dérmica en ratas Wistar expuestas a concentraciones de 200, 1000 y 2000 mg/kg de un extracto etanólico de raíces de *Cestrum roseum*.
- ✓ Determinar el impacto de la administración tópica del extracto de la raíz de *Cestrum roseum* sobre el peso corporal de los animales tratados.
- ✓ Determinar la alteración consecuente a la administración tópica del extracto respecto al análisis macroscópico e histopatológico de órganos diana.
- ✓ Determinar la influencia de la exposición tópica del extracto en parámetros hematológicos y bioquímicos.

## **6 MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Colecta e identificación botánica de *Cestrum roseum***

*Cestrum roseum* fue colectada en Miguel Hidalgo, Las Cruces, Michoacán el 11 de junio de 2017. La especie se distingue fácilmente por sus pelos ramificados en forma de estrella. Tiene las flores tubulares y su olor característico de *Cestrum* (41).

### **6.2 Obtención del extracto etanólico**

El material vegetal colectado se sometió a secado a temperatura ambiente por 15 días a la sombra. La raíz de *Cestrum roseum* se molió mediante métodos mecánicos y fue macerado con etanol al 96% por 5 días. Completado el tiempo de extracción, el extracto se filtró y secó a presión reducida con un rotoevaporador a 40 °C para eliminar el etanol. Posteriormente este extracto seco se pesó y se almacenó en viales de vidrio ámbar refrigerados y protegidos de la luz (42). Para la realización de la prueba de toxicidad, los extractos fueron redisueltos en agua a las concentraciones adecuadas tal y como establece la guía 402 de la OCDE.

### **6.3 Evaluación de la toxicidad dérmica aguda en ratas Wistar**

La evaluación de la toxicidad dérmica aguda del extracto etanólico de raíces de *Cestrum roseum* se realizó siguiendo la guía 402 de la OCDE (30). Para ello se utilizaron grupos de animales, de un solo sexo (hembras), quienes se expusieron por vía tópica al extracto en un procedimiento por etapas utilizando dosis fijas apropiadas. La elección de las hembras se realiza siguiendo la guía 402, dado que en general las hembras presentan una mayor sensibilidad a los efectos tóxicos agudos que los machos (30). El nivel de dosis inicial se seleccionó a 2000 mg/kg, siguiendo las indicaciones de la guía 402 que establece esta concentración como una dosis donde se espera que se produzcan signos claros de toxicidad sin causar efectos tóxicos graves ni mortalidad. Otros grupos de animales se probaron a dosis inferiores de 1000 y 200 mg/kg. Este procedimiento intenta identificar la dosis que

causa toxicidad y la concentración. La prueba establece además que los animales que mueran durante el ensayo se sometan a una autopsia y, al final de la prueba, los animales supervivientes se sacrifiquen, realizando luego un análisis macroscópico e histopatológico a los órganos para detectar los órganos diana de toxicidad. La clasificación del producto químico de prueba se define luego en función del resultado observado.

### **6.3.1 Especie animal**

Se utilizó como modelo biológico ratas Wistar de 8 a 10 semanas de edad, se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Químico Farmacobiología 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 h de luz y 12 h de oscuridad, alimento y agua *ad libitum*.

### **6.3.2 Selección de las dosis, vía de administración y procedimiento experimental**

Aproximadamente 24 horas antes del inicio del ensayo el pelo fue cortado y afeitado en una proporción de no menos del 10% de la superficie corporal del área dorsal de cada animal, tal y como especifica la guía 402 de la OCDE. Se asignaron cuatro ratas al grupo control y el mismo número a los tres restantes grupos de estudio denominados G1, G2 y G3. El grupo control (Ctrl) recibió el vehículo (agua destilada) en aplicación tópica en la región dorsal, al grupo G1 se le administró una dosis de 200 mg/kg de la solución acuosa del extracto de *Cestrum roseum*, posteriormente se administró al grupo G2 con una dosis de 1000 mg/kg mientras que el grupo G3 recibió una dosis de 2000 mg/kg. La sustancia se aplicó por vía dérmica manteniendo en contacto la piel con una gasa porosa que contenía el extracto y una cinta no irritante durante al menos 24 horas.



### **6.3.3 Período de observación**

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.

### **6.3.4 Determinación de signos y síntomas de toxicidad**

Durante el período de exposición se determinó si los animales presentaban signos de toxicidad tales como cambios en piel (irritación) así como en el aspecto físico (posiciones extrañas, piloerección, posición de la cola, lagrimeo, excretas), comportamiento (consumo de agua y alimentos, actividad/inactividad, comportamiento exploratorio, agresividad, sedación). Del mismo modo se prestó una atención especial a la detección de temblores musculares, convulsiones, parálisis, alteración de los reflejos, tamaño de pupila y opacidad corneal ya que los mismos son indicativo de daño a nivel del Sistema Nervioso Central como consecuencia de una acción sistémica del producto de prueba.

### **6.3.5 Análisis macroscópico**

Al culminar los ensayos las ratas fueron sacrificadas, por dislocación cervical. Se realizó la necropsia, procediéndose a la observación macroscópica de las superficies externas del cuerpo, todos los orificios y cavidades (craneal, torácica y abdominal) y sus contenidos. Además, se extrajeron y se pesaron los siguientes órganos: corazón, hígado, bazo, timo, riñones, glándulas adrenales, encéfalo y piel por considerarse las dianas más frecuentes de efectos tóxicos.

### **6.3.6 Análisis histopatológico**

Para el análisis histopatológico los órganos (corazón, hígado, bazo, timo, riñones, glándulas adrenales, encéfalo y piel) se fijaron con formaldehído al 4%, se

prepararon con parafina, se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron bajo un microscopio óptico. El análisis histopatológico fue realizado por dos patólogos independientes entrenados del Laboratorio de Citología y Patología, CYPAT, S.A., ubicado en Morelia, Michoacán, México. El análisis de las diapositivas de patología fue ciego a los patólogos para confirmar la concurrencia en la interpretación de los resultados.

### **6.3.7 Determinaciones hematológicas y bioquímicas**

Las muestras de sangre se tomaron mediante una punción cardíaca y se utilizaron para las determinaciones hematológicas siguientes: leucocitos totales, linfocitos, bandas, segmentos, monocitos, eosinófilos, basófilos, eritrocitos, 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 y ancho de distribución de las plaquetas. Además, se realizaron las determinaciones bioquímicas siguientes: glucosa, creatinina, urea, fosfatasa alcalina, proteínas totales, bilirrubina total, alanina amino-transferasa (ALT), aspartato amino-transferasa (ALP) y gamma glutaril-transferasa (GGT). Estas pruebas se llevaron a cabo en el laboratorio Edulab, ubicado en Morelia, Michoacán, México. Antes de realizar los experimentos, se estandarizaron las técnicas para el uso del plasma y el suero de la rata. Las pruebas hematológicas se determinaron por impedancia eléctrica utilizando el equipo CELL-DYN Emerald, Abbott, mientras que el análisis bioquímico se determinó mediante una técnica colorimétrica con el analizador Cobas c111 de Hoffman-La Roche Ltd. No se realizaron pruebas de coagulación.

## **7 RESULTADOS**

### **7.1 Colecta e identificación botánica**

La raíz de *Cestrum roseum* tiene un gran interés por sus metabolitos secundarios (poco polares y polares) con gran importancia para la investigación farmacológica. La identificación botánica realizada permitió constatar que efectivamente se trataba de la especie en cuestión. La planta fue identificada por el Dr. J. Rzedowski, conservándose un ejemplar en el Instituto de Ecología de Pátzcuaro (voucher #00243992).

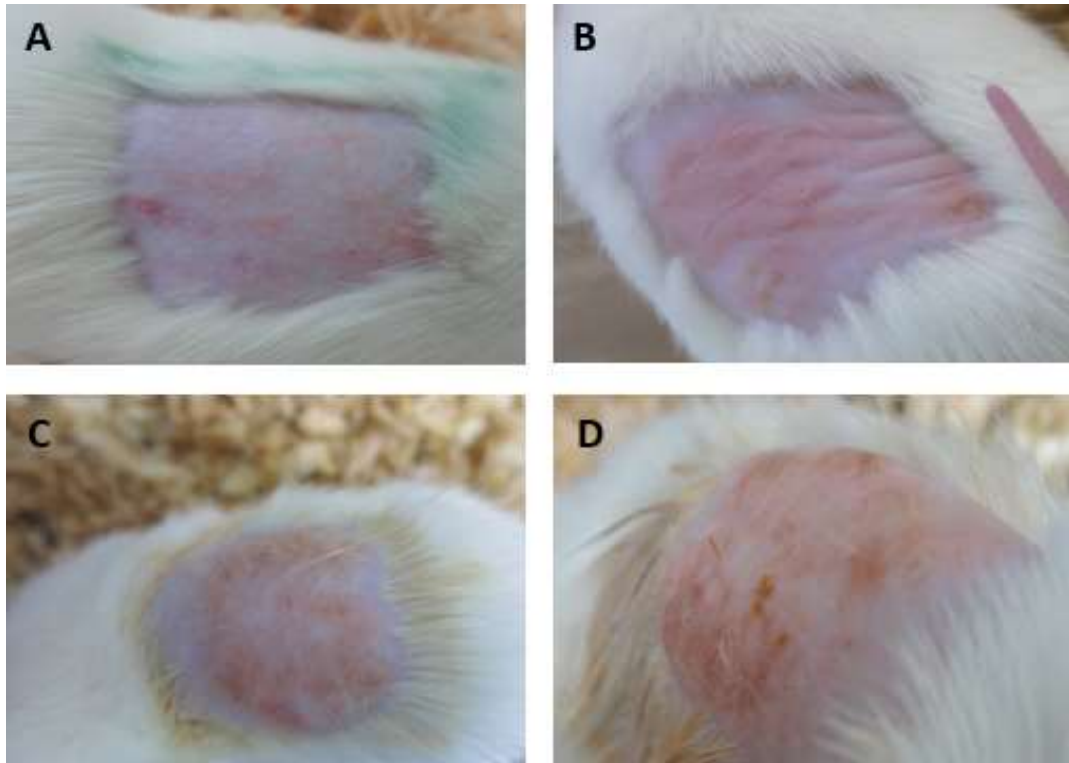
### **7.2 Obtención del extracto de *Cestrum. roseum***

El procedimiento de extracción realizado permitió obtener un rendimiento de extracción de 1.17% lo que permitió que se tuviera una cantidad de extracto suficiente para realizar el estudio de toxicidad dérmica.

### **7.3 Estudio de toxicidad dérmica**

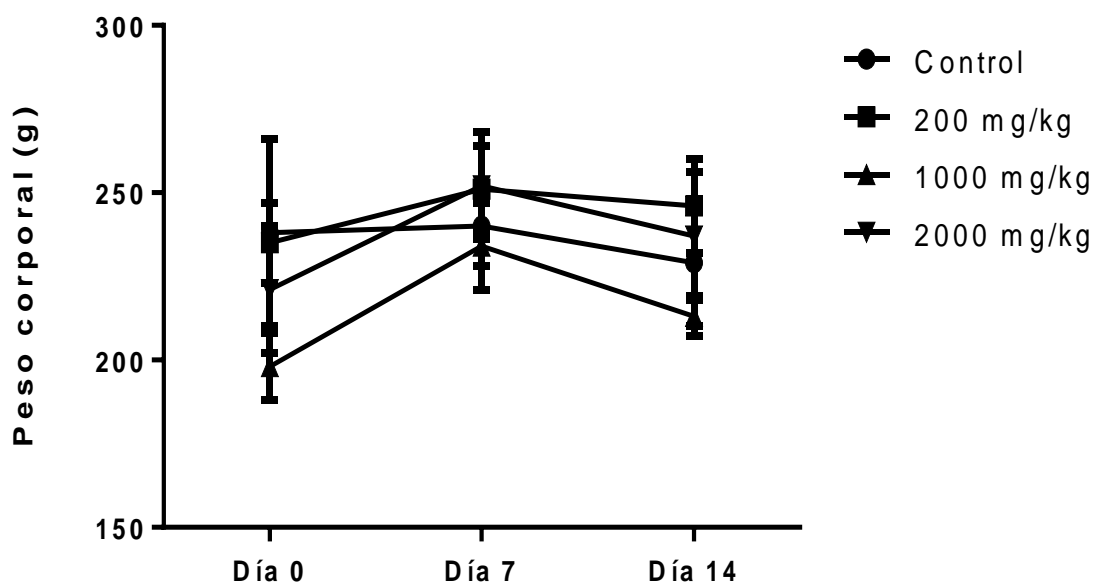
#### **7.3.1 Peso corporal y signos de toxicidad**

La figura 7 muestra la apariencia de la piel de los animales en los cuatro grupos experimentales 24 h después de la administración del extracto. No se presentaron signos ni síntomas de toxicidad relativos al comportamiento durante el periodo de tratamiento de los grupos experimentales con respecto al del control. En cuanto a la observación de la piel, puede constatarse la presencia de dermatitis dependiente de la dosis caracterizada por el eritema y vesiculación que desapareció posteriormente 72 horas después de la administración tópica.



**Figura 7:** Apariencia de la piel en los animales tratados con el extracto etanólico de *C. roseum* 24 h después de la administración. *Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D).*

En cuanto al peso corporal, la figura 8 muestra la evolución del peso en los animales tratados y el grupo control. En todos los grupos experimentales se observó un incremento del peso corporal al séptimo día después de la administración, mientras que el día 14 se evidenció un ligero descenso no significativo en cuando al peso corporal que también fue constatado para el grupo control.



**Figura 8:** Evolución del peso corporal de los grupos experimentales y el control antes y después de la administración tópica del extracto etanólico de la raíz de *Cestrum roseum*. Los valores son expresados como media  $\pm$ DE. \*Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.2 Análisis macroscópico

En términos del análisis macroscópico de los órganos no se observaron alteraciones en cuanto a su posición, aspecto y/o morfología de los grupos experimentales en relación al control. En la tabla 4 se observan los pesos relativos de los órganos de las ratas tanto del grupo control con relación al de cada grupo. Como puede observarse, no se registraron diferencias significativas en lo relativo al peso de los órganos que pudiera indicar que el extracto de *Cestrum roseum* causa un efecto tóxico significativo sobre estos órganos.

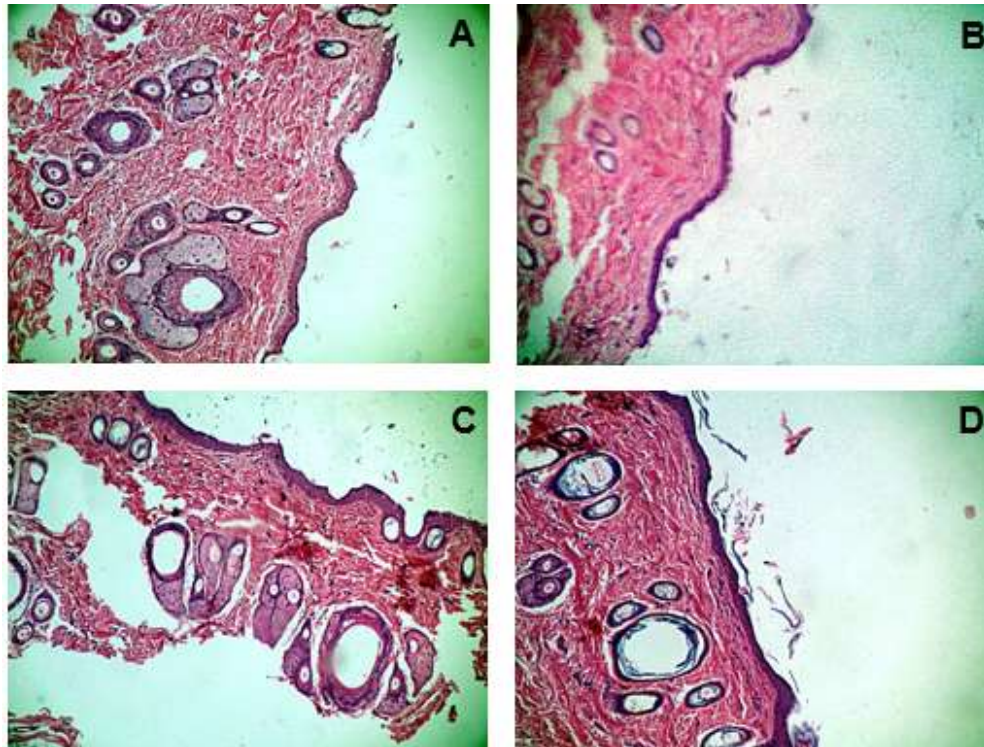
**Tabla 4:** Pesos de los tejidos de ratas Wistar grupo control, G1, G2 y G3.

<b>ÓRGANOS</b>	<b>GRUPO CONTROL (g)</b>	<b>DOSIS (200mg/kg) (g)</b>	<b>DOSIS (1000mg/kg) (g)</b>	<b>DOSIS (2000mg/kg) (g)</b>
<b>Bazo</b>	0.63±0.09	0.80±0.09	0.66±0.05	0.72±0.03
<b>Corazón</b>	0.82±0.19	1.05±0.18	0.79±0.02	0.87±0.08
<b>Encéfalo</b>	1.79±0.12	1.64±0.32	1.76±0.08	1.70±0.23
<b>Suprl Izq</b>	0.04±0.01	0.16±0.14	0.03±0.01	0.04±0.007
<b>Suprl Dr</b>	0.04±0.008	0.07±0.04	0.04±0.003	0.05±0.009
<b>Hígado</b>	9.01±2.06	9.88±0.79	8.61±1.40	11.18±2.78
<b>Riñón Izq</b>	0.86±0.07	0.98±0.11	0.90±0.05	1.00±0.100
<b>Riñón Dr</b>	0.92±0.13	1.02±0.15	0.93±0.06	1.04±0.11
<b>Timo</b>	0.29±0.15	0.43±0.09	0.39±0.100	0.34±0.02

Los valores son expresados como media ±DE. \*Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

### 7.3.3 Análisis histopatológico

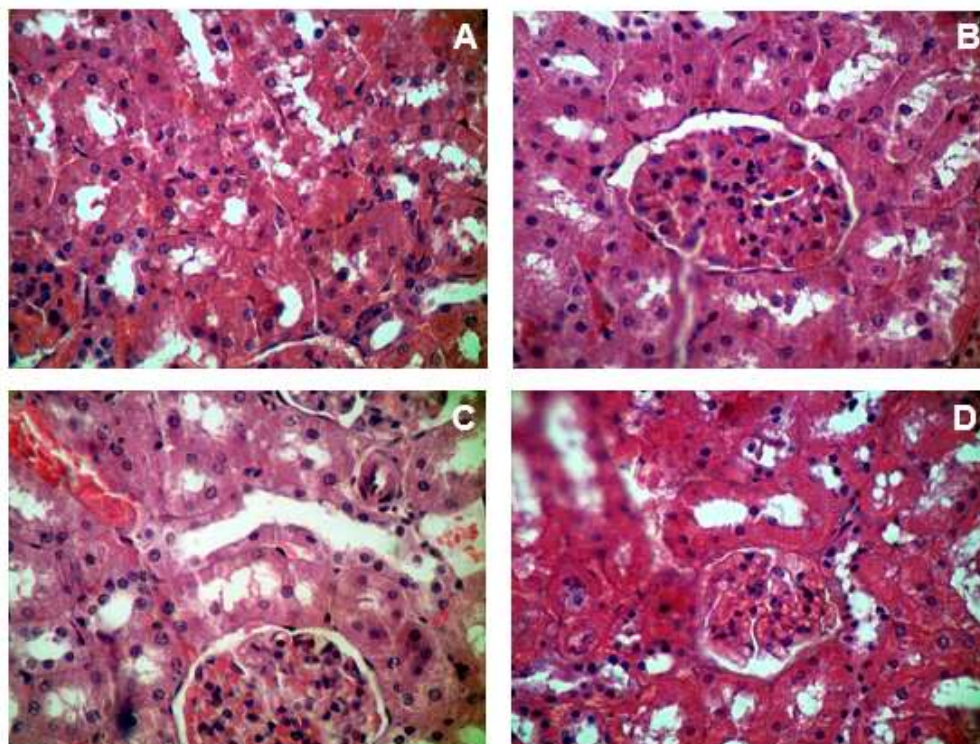
El análisis histopatológico del encéfalo, hígado y corazón no evidenció diferencias significativas entre los grupos experimentales y el control. La figura 9 ilustra los cortes de piel luego de la tinción Hematoxilina-Eosina, donde se observa que no hay presencia de dermatitis, ni ninguna alteración en los grupos control y los grupos experimentales G1, G2 y G3.



**Figura 9:** Histopatología de la piel. Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D).

Sin embargo, alteraciones histopatológicas importantes pudieron constatarse en los cortes de riñón en forma dependientes de la dosis correspondiente a cada grupo experimental (Figura 10), donde se obtuvieron alteraciones que demuestran que el extracto de *Cestrum roseum* causa daño renal. Las alteraciones son las siguientes:

- ✓ Grupo Control. Sin alteraciones.
- ✓ Grupo 200mg/kg: Congestión de los capilares glomerulares con formación de microtrombos.
- ✓ Grupo 1000mg/kg: Engrosamiento de las membranas basales glomerulares y congestión de los capilares glomerulares.
- ✓ Grupo 2000mg/kg: Engrosamiento importante de las membranas basales glomerulares y congestión de los capilares glomerulares, así como aumento del espacio de Bowman con disminución del penacho glomerular.



**Figura 10:** Histopatología del riñón. *Control (A), 200 mg/kg (B), 1000 mg/kg (C), 2000 mg/kg (D).*

### **7.3.4 Análisis hematológico**

En la tabla 5 se exponen los resultados correspondientes a la biometría hemática completa del grupo control y grupos experimentales que recibieron dosis de 200, 1000 y 2000 mg/kg, en los cuales no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas respecto al control.



**Tabla 5:** Biometría hemática completa de los grupos de ratas de ensayo.

<b>HEMOGRAMA</b>	<b>GRUPO CONTROL</b>	<b>DOSIS (200mg/kg)</b>	<b>DOSIS (1000mg/kg)</b>	<b>DOSIS (2000mg/kg)</b>
<b>Eritrocitos</b>	6.74±0.21	6.67±0.28	6.58±0.10	6.64±0.37
<b>Hemoglobina</b>	15.1±0.14	15.07±0.63	14.7±0.36	15.22±0.51
<b>Hematocrito</b>	37.85±0.35	37.02±2.10	37.33±0.94	38.45±1.78
<b>VGM</b>	56±1.41	55.47±1.82	56.73±0.57	57.87±1.43
<b>HCM</b>	22.35±0.63	22.6±0.75	22.36±0.73	22.87±0.47
<b>CMHG</b>	35.95±5.72	40.75±0.93	39.43±1.44	39.57±0.67
<b>RDW</b>	10.9±0.14	10.7±0.14	11.73±0.51	11.22±0.51
<b>Leucocitos</b>	2,550±212.13	4,675±1532.69	3,333±577.35	2,625±892.09
<b>Neutrófilos</b>	11±5.65	17±7.87	16.66±6.65	11±6.68
<b>Linfocitos</b>	83.5±3.53	73.75±7.18	81.66±4.93	87.5±7.85
<b>Monocitos</b>	5.5±2.12	8.75±7.13	1.33±2.30	0.75±0.95
<b>Eosinofilos</b>	0±0	0.5±0.57	0.33±0.57	0.75±0.95
<b>Basófilos</b>	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>V.A Neutrofilos</b>	286.5±167.58	776.75±451.97	580±334.51	166.8±115.94
<b>V.A Linfocitos</b>	2,126±86.97	3,441±1142.86	2,703±291.94	2,346±962.81
<b>V.A Monocitos</b>	138±42.42	433±310.03	40±69.28	15.5±21.68
<b>V.A Eosinofilos</b>	0±0	23.75±31.30	10±17.32	17.25±20.02
<b>V.A Basofilos</b>	0±0	0±0	0±0	0±0
<b>Plaquetas</b>	898,500±160513.23	791,750±497533.49	604,667±461585.67	617,000±593798.50
<b>Volumen plaquetario</b>	6.8±0.56	6.77±0.15	7.15±0.070	6.42±0.28

Los valores son expresados como media ±DE. \*Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba de Tukey (p<0.05).

### 7.3.5 Análisis bioquímico

La tabla 6, muestra la química sanguínea realizada al grupo control y grupos experimentales, no teniendo diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros a nivel experimental.

**Tabla 6:** Química sanguínea de ratas control, G1, G2 y G3.

<b>QUÍMICA SANGUÍNEA</b>	<b>GRUPO CONTROL</b>	<b>DOSIS (200mg/kg)</b>	<b>DOSIS (1000mg/kg)</b>	<b>DOSIS (2000mg/kg)</b>
<b>Glucosa</b>	114.63±18.79	147.7±64.79	98.68±16.43	114.97±27.61
<b>Urea</b>	39.23±5.49	40.24±4.32	46.39±11.90	42.03±12.75
<b>Creatinina</b>	0.32±0.05	0.35±0.05	0.30±0	0.32±0.05
<b>Colesterol</b>	55.83±10.66	64.16±10.45	66.31±13.24	66.97±7.53
<b>Proteínas totales</b>	6.65±1.12	7.1±0.71	5.96±0.35	5.97±0.25
<b>Albúmina</b>	4.84±0.10	4.96±0.35	4.82±0.27	4.92±0.23

Los valores son expresados como media ±DE. \*Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba de Tukey (p<0.05).

La tabla 7 muestra los valores obtenidos respecto al perfil hepático de los grupos experimentales respecto al control. De acuerdo con los resultados obtenidos es posible constatar que no existen diferencias significativas en cuanto a estos valores en los grupos experimentales respecto al control.

**Tabla 7:** Pruebas de perfil hepático grupo control, G1, G2 y G3.

<b>Perfil Hepático</b>	<b>GRUPO CONTROL</b>	<b>DOSIS (200mg/kg)</b>	<b>DOSIS (1000mg/kg)</b>	<b>DOSIS (2000mg/kg)</b>
<b>Aspartato aminotransferasa</b>	295.77±265.02	341.10±458.13	644.86±225.56	234.42±71.07
<b>Alanino aminotransferasa</b>	67.5±39.02	80.525±70.72	117.43±29.19	62.45±14.66
<b>Gamma glutamil transpeptidasa</b>	5.02±7.20	4.225±2.41	1.53±1.01	0.67±0.40

Los valores son expresados como media ±DE. \*Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba de Tukey (p<0.05).

## 8 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el extracto etanólico de la raíz de *Cestrum roseum* presenta una muy baja toxicidad a nivel cutáneo en ratas Wistar pero dada la toxicidad presentada a nivel renal, otros estudios subagudos, subcrónicos y crónicos deben realizarse antes de establecer su empleo por vía tópica utilizando dosis seguras.

Algunas especies del género *Cestrum* se han documentado por sus efectos farmacológicos positivos a nivel cutáneo. Es el caso de *Cestrum nocturnum* quien ha demostrado su efecto como cicatrizante en un modelo animal de incisión de heridas (43). Ungüentos al 2 y 5% de extractos etanólicos de las hojas de *C. nocturnum* promovieron significativamente la cicatrización de heridas comparativamente con el control, con una alta tasa de cicatrización, una disminución del período de reepitelización, una alta resistencia a la fractura cutánea y un elevado contenido de hidroxiprolina (43). Adicionalmente, esta especie del género *Cestrum* también ha mostrado efectos como agente anti-envejecimiento, en varios modelos *in vitro* (44). Otras especies como *Cestrum parqui*, conocidas por su efecto dermatológico sobre alergias cutáneas, herpes e impétigo (45) han demostrado un carácter antiinflamatorio (46) pudiendo ser usadas para enfermedades de la piel donde la inflamación está implicada.

Aunque la actividad farmacológica de *C. roseum* como posible candidato a investigar para tratar enfermedades dermatológicas no ha sido explorada, el hecho de que la planta presente concentraciones importantes de compuestos como lupeol, ácido ursólico y ácido clorogénico (5) sugiere que podría mostrar una actividad interesante a este nivel. El lupeol se ha documentado como un agente inhibidor del cáncer cutáneo en varios estudios (47–49). Adicionalmente, este triterpeno es capaz de promover la cicatrización (50) en ratas. El ácido ursólico por su parte posee efectos antiproliferativos siendo identificado como candidato terapéutico a ser explorado en el cáncer cutáneo (51,52). Además, este compuesto se ha sugerido como inductor de

la síntesis de colágeno y ceramidas en queratinocitos y fibroblastos, lo que demuestra su efecto antienvjecimiento (53). En cuanto al ácido clorogénico, es bien conocida su actividad antioxidante (54), anticancerosa (36) y su efecto como protector cutáneo contra el daño inducido por la radiación UV (37). Aunque estos estudios farmacológicos demuestran que especies del género *Cestrum* poseen potencial para tratar patologías cutáneas, poco se conoce de su toxicología, lo cual es una limitación importante para su utilización segura en estudios ulteriores realizados en otras especies o en seres humanos por vía tópica.

La literatura científica reporta la intoxicación del ganado por ingestión de *Cestrum diurnum* (55). Adicionalmente, cabras alimentadas por vía oral con *Cestrum laevigatum* presentaron intoxicación con daño hepático caracterizado por necrosis, y hemorragia coagulativa centrolobular (55). Del mismo modo, ovejas alimentadas con altas dosis de *Cestrum laevigatum* mostraron intoxicación caracterizada por hepatosis con lobulación acentuada y necrosis coagulativa centrilobular, hemorragia y congestión. Además, se constataron alteraciones encefálicas con altas dosis de esta planta (56). *Cestrum elegans* ha sido reportada como una planta tóxica por una tribu de Indonesia debido a su contenido de alcaloides (57). Estos estudios sugieren que metabolitos presentes en especies del género *Cestrum* pueden generar toxicidad por vía oral. Como la toxicidad de una sustancia puede variar en dependencia de la ruta de administración por la que sea utilizado, los resultados obtenidos de una vía a la otra no pueden ser extrapolables.

Aunque se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva acerca de la toxicología por vía dérmica de especies pertenecientes al género *Cestrum*, se pudo constatar que hay ausencia de estudios experimentales con especies de este género por lo que la investigación realizada es novedosa y muestra que los metabolitos del extracto de la planta a altas dosis son capaces de penetrar el estrato córneo, alcanzar la circulación sistémica e inducir un daño renal, sin causar daños histopatológicos cutáneos. La penetración del estrato córneo es el paso que limita la velocidad en la absorción percutánea. Si la barrera es dañada como ocurre durante la dermatitis aguda que se

presentó cuando el extracto se expuso a la piel, la absorción aumentará y por consiguiente los metabolitos podrán alcanzar la circulación sistémica y causar daño en los órganos diana. La capacidad de una toxina para provocar una respuesta cutánea o sistémica no solo depende de su absorción, sino de su potencia tóxica relativa.

En general, la toxicología dérmica debe considerar tanto el efecto directo de las toxinas sobre la piel como los efectos sistémicos de la absorción cutánea (25). Para ello, debe considerarse que, en ocasiones, la toxicidad sistémica y dérmica pueden diferir. Por ejemplo, en el caso del agente antifúngico itraconazol que se acumula en la queratina con una afinidad especial por la piel. A la inversa, muchas toxinas dérmicas absorbidas pueden tener poco efecto directo sobre la función cutánea, pero poseen profundos efectos sistémicos. Un ejemplo de ello es el plastificante fosfato de triortocresilo, quien al absorberse por vía dérmica se considera como una neurotoxina con bajo efecto a nivel dermatológico (25). El extracto etanólico de *Cestrum roseum* tiene un efecto similar, causando una baja toxicidad en piel, aunque ocasionó efectos nocivos a nivel renal.

Aunque el extracto indujera dermatitis inicial a las 24 horas de administración, no se demostraron daños en piel cuando se realizó el análisis histopatológico 14 días después de la exposición tópica al extracto. Esta baja toxicidad dérmica podría justificarse por la presencia en el extracto de metabolitos como el ácido ursólico y oleanólico, los que han demostrado poseer efectos cicatrizantes con efectos positivos sobre el restablecimiento de la función de barrera de la piel después de una lesión y la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos (58).

Desafortunadamente, no se encontraron reportes en la literatura sobre la toxicidad renal de los metabolitos principales identificados en el extracto de *Cestrum roseum*. Sin embargo, al tratarse de un extracto etanólico polar es probable que el mismo sea rico en compuestos polifenólicos, metabolitos omnipresentes en el reino de las plantas que pueden ser fácilmente extraídos con solventes polares. Se ha

documentado que compuestos polifenólicos como la quercetina, un flavonoide ampliamente distribuido en el reino vegetal, pueden inducir nefrotoxicidad (59) (60). De hecho, se ha sugerido que los conjugados polifenol-glutación que pueden formarse como resultado de las reacciones metabólicas tienen alta reactividad debido a sus propiedades electrofílicas y redox, pudiendo ser transportados a tejidos capaces de acumularlos como el riñón, donde puede inducirse toxicidad. Estudios previos realizados en nuestro equipo de investigación han demostrado que extractos ricos en fenoles pertenecientes al género *Quercus* son capaces de inducir toxicidad importante a nivel renal (61). Por todo lo anterior, resulta de vital importancia el estudio toxicológico de extractos bioactivos afín de establecer las dosis seguras que permitan su utilización en estudios farmacodinámicos posteriores.

## 9 CONCLUSIONES

La presente investigación demuestra que la administración por vía tópica de altas dosis del extracto etanólico de la raíz de *Cestrum roseum* (200, 1000 y 2000 mg/kg) generó dermatitis a nivel cutáneo que desapareció 72 horas después de la administración, sin ocasionar otros signos y síntomas de toxicidad en ratas Wistar ni alteraciones del peso corporal. Este extracto tampoco indujo cambios a nivel macroscópico e histopatológico de los órganos diana, excepto en el riñón, donde se observaron efectos nocivos dependientes de la dosis que demuestran que el extracto es capaz de atravesar la piel, llegar a circulación sistémica y generar daño en la arquitectura renal. Por todo lo anterior se considera que, dado que las dosis utilizadas son muy elevadas como corresponde a un estudio de toxicidad aguda, otros estudios toxicológicos a dosis repetida de mayor duración (subagudos, subcrónicos y crónicos) y menores niveles de dosificación son requeridos para establecer las concentraciones seguras a las que el extracto pudiera ser utilizado como candidato terapéutico por vía tópica.

## 10 RECOMENDACIONES

- ✓ Continuar con estudios toxicológicos subagudos y subcrónicos que permitan establecer la toxicidad acumulativa del extracto etanólico de la raíz de *Cestrum roseum*, luego de su administración repetida.
- ✓ Si el perfil de toxicidad fuera aceptable, realizar estudios farmacodinámicos utilizando la vía dérmica que demuestren si el extracto etanólico de la raíz de *Cestrum roseum* podría ser utilizado como alternativa terapéutica para el tratamiento de alteraciones dermatológicas de impacto en la población.



## 11 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Contreras MV. La piel: un enfoque integral más allá de la función de barrera. octubre de 2016;14:2.
2. Comprendiendo la piel [Internet]. [citado el 2 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.eucerin.com.mx/acerca-de-la-piel/conocimientos-basicos-sobre-la-piel/estructura-y-funcion-de-la-piel>
3. Mercedes de Miguel, Cristina García. Guía de desarrollos preclínicos - PDF [Internet]. 2012 [citado el 3 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://docplayer.es/2923140-Guia-de-desarrollos-preclinicos.html>
4. Sánchez Lamar Á, Fonseca López G, Capiro Trujillo N, Fernández Fuentes D. Propuesta de ruta crítica para la evaluación genotóxica de lantanas medicinales en Cuba. Rev Cuba Farm. abril de 2000;34(1):34–43.
5. Leco-González M. Estudio fitoquímico de los extractos polares de *Cestrum roseum* [Tesis de Maestría en Ciencias Químicas]. [Morelia, Michoacán, México]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2018.
6. Riviere JE, editor. Dermal absorption models in toxicology and pharmacology. Boca Raton: Taylor & Francis; 2005. 374 p.
7. 4.3.1. Defenses front a malalties infeccioses (A). Immunitat inespecífica. [Internet]. 2012 [citado el 18 de julio de 2019]. Disponible en: <https://biolulia.wordpress.com/ciencies-per-al-mon-contemporani/tema-4-salut-i-malaltia/4-2-1-malalties-infeccioses/4-3-3-defenses-front-a-malalties-sistema-immunitari/>
8. Unknown. Dermatología pregrado: ¿Qué es la piel?, ¿Qué la compone? La epidermis. [Internet]. Dermatología pregrado. 2011 [citado el 18 de julio de 2019]. Disponible en: <http://dermatologiapregrado.blogspot.com/2011/12/que-es-la-piel-que-la-compone-la.html>
9. Veinmon. SALUD SIGLO XXI: TIPOS DE CÉLULAS [Internet]. SALUD SIGLO XXI. 2010 [citado el 18 de julio de 2019]. Disponible en: <http://elmercaderdelasalud.blogspot.com/2010/11/tipos-de-celulas.html>
10. Thomas B.Fitzpatrick, Dermatología En Medicina General 7 edición - de búsqueda [Internet]. [citado el 3 de mayo de 2019]. Disponible en: [https://mx.search.yahoo.com/search;\\_ylt=AwrgeEbG.l8xcL5EA3kzD8Qt.;\\_ylc=X1MDMjExNDcxMjAwMwRfcgMyBGZyA21jYWZlZQRncHJpZAN6dEdnYUpTU1RRLk8uemNyeWwxemdBBG5fcNsdAMwBG5fc3VnZwMwBG9yaWdpbgNteC5zZWYy2gueWFob28uY29tBHBvcwMwBHBxc3RyAwRwcXN0cmwDMARxc3RybAM2MwRxdWVyeQNUaG9tYXMIMjBCLkZpdHpwYXRyaWNrJTJDRGVybwWF0b2xvZyVDMjYBRGEIMjBFbiUyME1lZGJjYW5hJTlwR2VuZXJhbCUyMDclMjBIZ](https://mx.search.yahoo.com/search;_ylt=AwrgeEbG.l8xcL5EA3kzD8Qt.;_ylc=X1MDMjExNDcxMjAwMwRfcgMyBGZyA21jYWZlZQRncHJpZAN6dEdnYUpTU1RRLk8uemNyeWwxemdBBG5fcNsdAMwBG5fc3VnZwMwBG9yaWdpbgNteC5zZWYy2gueWFob28uY29tBHBvcwMwBHBxc3RyAwRwcXN0cmwDMARxc3RybAM2MwRxdWVyeQNUaG9tYXMIMjBCLkZpdHpwYXRyaWNrJTJDRGVybwWF0b2xvZyVDMjYBRGEIMjBFbiUyME1lZGJjYW5hJTlwR2VuZXJhbCUyMDclMjBIZ)

GljaW9uBHRfc3RtcAMxNTU2OTEyMDk5?p=Thomas+B.Fitzpatrick%2CDermatolog%C3%ADa+En+Medicina+General+7+edicion&fr2=sb-top&fr=mcafee&type=D211MX714G0

11. Guerrero GAM. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. 2009;260–4.
12. Proceso de investigación, desarrollo y aprobación de un fármaco | MSD Salud [Internet]. [citado el 3 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.msdsalud.es/recursos-de-salud/guias-para-pacientes/proceso-investigacion-desarrollo-aprobacion-farmaco.html>
13. Peláez F. Paradigmas actuales en las etapas tempranas del proceso . de descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos. Quím. 2011;10.
14. Rendo,P. Desarrollo de nuevos medicamentos, la experiencia clínica al mercado: Una perspectiva desde la industria. En 2015. p. 177–82.
15. Delgadoa RG, Travesedob EE, Romeroa AS. Uso racional de la medicación tópica en dermatología. :7.
16. Monge, A. El descubrimiento de fármacos a partir de plantas medicinales. 2003;
17. Avello L M, Cisternas F I. Fitoterapia, sus orígenes, características y situación en Chile. Rev Médica Chile [Internet]. octubre de 2010 [citado el 3 de mayo de 2019];138(10). Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-98872010001100014&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872010001100014&lng=en&nrm=iso&tlng=en)
18. Abreu Guirado OA, Cuéllar Cuéllar A. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. Rev Cuba Plantas Med. septiembre de 2008;13(3):0–0.
19. Avendaño C. Los productos naturales en la búsqueda de nuevos fármacos. Una visión de conjunto. An Real Acad Nac Farm [Internet]. el 14 de abril de 2011 [citado el 3 de mayo de 2019];77(1). Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/aranf/article/view/1150>
20. Porredón DTA. Etnofarmacología. En: Etnofarmacología. 14a ed. NATURA MEDICATRIX; 1998. p. 13.
21. María A. Oliveira Miranda, Dilia Velázquez, Alexis Bermúdez. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. Revista de ciencia y tecnología de América. 2005;30:453–9.

22. Estudios Pre-clínicos y Clínicos - PDF [Internet]. [citado el 3 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://docplayer.es/6018391-Estudios-pre-clinicos-y-clinicos.html>
23. Gámez, Rafael. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. En: Revista CENIC Ciencias Biológicas. 2007. p. 204–8.
24. L.S.R del Barrio. Desarrollo de nuevos fármacos: desde la invención a la Farmacia [Internet]. studylib.es. [citado el 3 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://studylib.es/doc/5172650/desarrollo-de-nuevos-fármacos--desde-la-invencción-a-la-fa...>
25. Repetto Jiménez M, Repetto Khun G. Toxicología fundamental. Madrid: Díaz de Santos; 2010.
26. Víctor Hugo Reyna Torres. Evaluación de la Toxicidad Aguda y Subcrónica del Extracto Acuoso de Chiranthodendron pentadactylon Larreat. [Mexico,DF]; 2012.
27. Dra. Juana Tillán Capó. Toxicología subcrónica del extracto acuoso de Plectranthus amboinicus (Lour.) Spreng. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). 2007;9.
28. Gad, S. C. Preclinical Development Handbook: Toxicology. New Jersey: Wiley-Interscience; 2007.
29. García E, Valverde E, Agudo MA, Novales J, Luque MI. 2.13. Toxicología clínica. Farm Hosp. :45.
30. OECD/OCDE 402. 2017.
31. Methods for in vitro percutaneous absorption studies II. Animal models for human skin - ScienceDirect [Internet]. [citado el 9 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0041008X82901491>
32. Ernesto Aguilar Rodríguez, Adriana Gazol Patiño, Daniele Colosi. Lectura Científica Nivel Medio-Superior. Primera. Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación de Michoacán: Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e Innovación (CECTI); 2015. 100 p.
33. Martínez M, Rodríguez A. Catálogo nomenclatural de las Solanaceae de México. :41.
34. Rzedowski, G. C. de, J. Rzedowski. Flora Fanerogámica del Valle de México. INECOL 2010. Pátzcuaro,Michoacán; 2005.

35. Alberto M-EJ, Imelda P-M, Clarenc AR, Susana P-G, Edgar S-P, Bernarda G-O. Pharmacological and phytochemical potential study of plants collected in Amecameca, State of Mexico, Mexico. 2016;15(1):6.
36. Huang M-T, Smart RC, Wong C-Q, Conney AH. Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. :7.
37. Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. - Free Online Library [Internet]. [citado el 9 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.thefreelibrary.com/Efficient+topical+delivery+of+chlorogenic+acid+by+an+oil-in-water...-a0350680054>
38. Tsang MSM, Jiao D, Chan BCL, Hon K-L, Leung PC, Lau CBS, et al. Anti-Inflammatory Activities of Pentaherbs Formula, Berberine, Gallic Acid and Chlorogenic Acid in Atopic Dermatitis-Like Skin Inflammation. Mol Basel Switz. el 20 de abril de 2016;21(4):519.
39. Novelo, Carlos Javier Quintal. Actividad citotóxica de metabolitos aislados de *Diospyros cuneata* Stand. Maest EN Cienc Biotecnol PLANTAS. 2009;87.
40. Muñoz O. Plantas medicinales de uso en Chile: química y farmacología. Editorial Universitaria; 2001. 346 p.
41. Q.F.B. Miriam Leco González. Estudio fitoquímico de los extractos polares de *Cestrum roseum*. [Morelia, Michoacán]: Michoacana de San Nicolás De Hidalgo; 2018.
42. Buznego Rodríguez MT, Cuba Peña A, Garriga Sarría E, Cuéllar Cuellar A, Pérez-Saad H. Efecto de los extractos acuoso y etanólico de *Cestrum nocturnum* L. sobre la conducta exploratoria y pruebas de analgesia. Rev Cuba Plantas Med. agosto de 2005;10(2):0-0.
43. Nagar HK, Srivastava AK, Srivastava R, Kurmi ML, Chandel HS, Ranawat MS. Pharmacological Investigation of the Wound Healing Activity of *Cestrum nocturnum* (L.) Ointment in Wistar Albino Rats [Internet]. Journal of Pharmaceutics. 2016 [citado el 17 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.hindawi.com/journals/jphar/2016/9249040/abs/>
44. Bravo K, Alzate F, Osorio E. Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. Ind Crops Prod. el 1 de julio de 2016;85:341-52.
45. Antiinflammatory and Antipyretic Activities of *Cuscuta chilensis*, *Cestrum parqui*, and *Psoralea glandulosa*: International Journal of Pharmacognosy: Vol 34, No 1

[Internet]. [citado el 17 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1076/phbi.34.1.53.13176>

46. Shehnaz D, Hamid F, Baqai FT, Ahmad VU. Effect of the crude extract of *Cestrum parqui* on carrageenin - induced rat paw oedema and aggregation of human blood platelets. *Phytother Res.* el 1 de agosto de 1999;13(5):445–7.
47. Sultana S, Saleem M, Sharma S, Khan N. Lupeol, a triterpene, prevents free radical mediated macromolecular damage and alleviates benzoyl peroxide induced biochemical alterations in murine skin. *IJEB Vol4108 August 2003* [Internet]. agosto de 2003 [citado el 17 de mayo de 2019]; Disponible en: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/17115>
48. Lupeol modulates NF-  $\kappa$  B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice | *Oncogene* [Internet]. [citado el 17 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/1207641>
49. Nigam N, Prasad S, George J, Shukla Y. Lupeol induces p53 and cyclin-B-mediated G2/M arrest and targets apoptosis through activation of caspase in mouse skin. *Biochem Biophys Res Commun.* el 3 de abril de 2009;381(2):253–8.
50. Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3- $\beta$ -protein with isolated triterpenoid lupeol in rats - *ScienceDirect* [Internet]. [citado el 17 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711307002863>
51. Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K, Ito Y. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.* el 1 de diciembre de 1986;33(3):279–85.
52. Inhibition of Skin Tumorigenesis by Rosemary and Its Constituents Carnosol and Ursolic Acid | *Cancer Research* [Internet]. [citado el 17 de mayo de 2019]. Disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/54/3/701.short>
53. Both DM, Goodtzova K, Yarosh DB, Brown DA. Liposome-encapsulated ursolic acid increases ceramides and collagen in human skin cells. *Arch Dermatol Res.* el 1 de enero de 2002;293(11):569–75.
54. Antioxidant activity of polyphenolics in diets: Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen and nitrogen - *ScienceDirect* [Internet]. [citado el 17 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416596001511>
55. Durand R, Figueredo JM, Mendoza E. Intoxication in cattle from *Cestrum diurnum*. *Vet Hum Toxicol.* febrero de 1999;41(1):26–7.

56. Van der Lugt JJ, Nel PW, Kitching JP. Experimentally-induced *Cestrum laevigatum* (Schlecht.) poisoning in sheep. 1992 [citado el 17 de mayo de 2019]; Disponible en: <https://repository.up.ac.za/handle/2263/32470>
57. Oktavia AI, Batoro J, Indriyani S. Phytochemical and Histochemical Screening of Toxic Plant Based on Knowledge of Tengger Tribe in Ngadiwono Village, Pasuruan. *J Exp Life Sci.* el 4 de septiembre de 2017;7(1):50–4.
58. Lim SW, Hong SP, Jeong SW, Kim B, Bak H, Ryoo HC, et al. Simultaneous effect of ursolic acid and oleanolic acid on epidermal permeability barrier function and epidermal keratinocyte differentiation via peroxisome proliferator - activated receptor -  $\alpha$  [Internet]. *The Journal of Dermatology.* 2007 [citado el 17 de julio de 2019]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1346-8138.2007.00344.x>
59. Ferry R. Phase I Clinical Trial of the Flavonoid Quercetin: Pharmacokinetics and Evidence for in Vivo Tyrosine Kinase Inhibition. *Clin Cancer Res.* :11.
60. Monks TJ, Lau SS. The Pharmacology and Toxicology of Polyphenolic-Glutathione Conjugates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38(1):229–55.
61. Valencia E, Martinez-Flores H, Garcia-Perez M, Melendez E, García-Pérez M. Investigation of the Antibacterial Activity and Subacute Toxicity of a *Quercus crassifolia* Polyphenolic Bark Extract for its Potential Use in Functional Foods. *J Food Sci.* el 17 de junio de 2019;