



Universidad Michoacana de
San Nicolás de Hidalgo

Facultad de Químico Farmacobiología



Tesis

**Actividad anti-IL17 y toxicidad aguda dérmica de un extracto
purificado de cortezas de *Quercus crassifolia***

Que para tener el título de Química Farmacobióloga

Presenta:

p. QFB Maria del Rosario Santamaria Mojica

Director:

D.C. Martha Estrella García Pérez

Co-director:

D.C. Eréndira Valencia Avilés

Morelia, Michoacán, Julio de 2023.

EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE FARMACOGNOSIA Y FARMACOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO, BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. MARTHA ESTRELLA GARCÍA PÉREZ Y LA DRA. ERÉNDIRA VALENCIA AVILÉS. PROYECTO REALIZADO CON APOYO ECONÓMICO OTORGADO POR CIC-UMSNH.

Dedicatoria

Agradecimientos

Contenido

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABLAS.....	X
Resumen.....	XII
Abstract.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1. La piel.....	3
2.1.1. Características de la epidermis.....	3
2.1.2. Características de la dermis.....	5
2.1.3. Características de la hipodermis.....	6
2.1.4 La piel como órgano con capacidad metabólica.....	7
2.2. La psoriasis.....	10
2.2.1. Prevalencia en México y el mundo.....	11
2.2.2 La interleucina-17 (IL-17) y la patogénesis de la psoriasis.....	12
2.2.4 Nuevos medicamentos en desarrollo para el tratamiento de la psoriasis.....	19
2.3 La evaluación toxicológica preclínica: una etapa esencial del desarrollo farmacéutico para la psoriasis.....	21
2.3.1 Consideraciones regulatorias en la evaluación preclínica toxicológica. Tipos de estudios toxicológicos.....	25
2.4 El género <i>Quercus</i> en México.....	31
2.4.1 Reportes etnomedicinales relacionados con plantas pertenecientes al género <i>Quercus</i>	32
2.4.2 Actividad farmacológica y toxicológica de extractos de <i>Quercus crassifolia</i>	34
3. JUSTIFICACIÓN.....	38
4. HIPÓTESIS.....	39

5.	OBJETIVOS.....	40
5.1	Objetivo general	40
5.2	Objetivos específicos.....	40
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	41
6.1	Colecta e identificación botánica de <i>Quercus crassifolia</i>	41
6.2	Obtención del extracto purificado.....	41
6.3	Evaluación de la actividad anti-IL17 en queratinocitos HaCaT	42
6.4	Evaluación de la toxicidad dérmica aguda en ratas Wistar	42
6.4.1	Especie animal	42
6.4.2	Selección de las dosis, vía de administración y procedimiento experimental.....	43
6.4.3	Período de observación.....	43
6.4.4	Determinación de signos y síntomas de toxicidad	44
6.4.5	Análisis macroscópico	44
6.4.6	Análisis histopatológico	44
6.4.7	Determinaciones hematológicas y bioquímicas.....	44
6.4.8	Análisis estadístico	45
7.	RESULTADOS	46
7.1	Identificación botánica y obtención del extracto crudo y purificado de <i>Quercus crassifolia</i>	46
7.2	Evaluación de la actividad anti-IL17 en queratinocitos HaCaT	46
7.3	Estudio de toxicidad dérmica	47
7.3.1	Consumo de alimento y peso de ratas.....	47
7.3.2	Signos de toxicidad	49
7.3.3	Análisis macroscópico.....	49
7.3.4	Análisis histopatológico	50

7.3.4.2 Características del daño a nivel cutáneo inducido por el extracto	51
7.3.4.1 Características del daño renal inducido por el extracto	52
7.3.5 Análisis hematológico	54
7.3.6 Análisis bioquímico	55
8. DISCUSIÓN.....	56
9. CONCLUSIONES	60
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura y tipos celulares de la Epidermis (15).....	5
Figura 2. La psoriasis se puede presentar de formas diferentes, A) Pústula, B) Folicular, C) Guttata, D) Placas y E) Eritrodérmica (21).....	11
Figura 3. La subfamilia de citocinas IL-17 y sus receptores. Las citocinas IL-17 son seis (A-F), siendo IL-17A e F las más relacionadas con la psoriasis.....	13
Figura 4. Patogénesis de la psoriasis e implicación de los nuevos fármacos en desarrollo.....	18
Figura 5: Diagrama de flujo del desarrollo de la fase preclínica (31).....	24
Figura 6. Diagrama de flujo general para un proceso de evaluación del riesgo en la irritación/corrosión dérmica (Guía 404 OCDE) (40).....	30
Figura 7. Genero <i>Quercus</i> (8).....	32
Figura 8: Estrategia de valorización de los extractos de cortezas de <i>Q. crassifolia</i> emprendidos por nuestro equipo de investigación.	34
Figura 9: Compuestos identificados en <i>Q. crassifolia</i> , a) 4-hidroxibencenoetanol, b) ramnosa, c) ácido pantoténico, d) pantolactona.....	36
Figura 10. Impacto del extracto purificado de <i>Quercus crassifolia</i> sobre la producción de IL-8 en queratinocitos HaCaT estimulados con IL-17.	47

Figura 11. Evolución del peso corporal de los grupos experimentales y el grupo control después de la administración dérmica de dosis única del extracto purificado del *Quercus crassifolia*..... 48

Figura 12. Cantidad de alimento consumido por las ratas Wistar utilizadas para la prueba de toxicidad dérmica. *Los valores son expresados como Media ± DE. *Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba Tukey post hoc, p<0.05).*..... 48

Figura 13: Apariencia de la piel en las ratas Wistar tratadas con el extracto purificado del *Quercus crassifolia* 24 h después de la administración. Control (A), 200 mg/kg (B), 2000 mg/kg (C). 49

Figura 14. Análisis histopatológico a nivel de la piel después de la administración dérmica del extracto de *Quercus crassifolia*..... 52

Figura 15. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración dérmica del extracto de *Quercus crassifolia*..... 53

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas metabolizadoras de xenobióticos en la piel de diferentes especies de mamíferos. Modificado de CYP (citocromo P450), GST (glutación-S-transferasa), ADH (alcohol deshidrogenasa), NAT (N-acetil-transferasa) (17).....	9
Tabla 2. Acciones biológicas de la IL-17 (28).	14
Tabla 3. Principales acciones de la IL-17 e ILF en psoriasis (25).....	16
Tabla 4. Nuevos medicamentos en desarrollo para el tratamiento de la psoriasis (1).	20
Tabla 5. Padecimientos o enfermedades tratadas con <i>Quercus</i> (34).	32
Tabla 6: Peso relativo de los órganos de ratas Wistar grupo control, G1 y G2, tratadas con extracto purificado <i>Quercus crassifolia</i> por vía dérmica.	50
Tabla 7: Biometría hemática completa de los grupos de ratas Wistar de ensayo.....	54
Tabla 8: Pruebas de análisis bioquímico de grupos experimentales respecto al control.	55

ABREVIATURAS

DOPA: Dihidroxifenilalanina

MSH: Hormona estimulante de melanocitos

XME: Enzimas metabolizadoras de xenobióticos

GST: Glutación-S-transferasa

ADH: Alcohol deshidrogenasa

NAT: N-acetil-transferasa

TNF: Factor de necrosis tumoral

EII: Enfermedad inflamatoria intestinal

EMA: Agencia Europea de Medicamentos

OCDE: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos

DL50: Dosis letal 50

FDA: Administración de Alimentos y Fármacos

V.A: Valores absolutos

VGM: Volumen globular medio

RDW: Amplitud de distribución eritrocitaria

CMHG: Concentración media de hemoglobina globular

HCM: Hemoglobina corpuscular media

DE: Desviación estándar

µm: Micrómetros

kg: Kilogramos

mg: Miligramos

TGP: Transaminasa Glutámico Pirúvica

TGO: Transaminasa Glutámico Oxalacética

UPS: Unidad pilosebácea

Resumen

Quercus crassifolia es una especie mexicana muy apreciada por la calidad de su madera y además posee gran importancia etnomedicinal. Su explotación forestal genera una gran cantidad de residuos en forma de cortezas con pobre utilización, que podrían emplearse para el desarrollo de nuevos medicamentos de uso tópico para el tratamiento de la psoriasis, una enfermedad dermatológica incurable que afecta a más de 3 millones de mexicanos. El presente trabajo propone la evaluación *in vitro* de un extracto purificado de corteza de *Quercus crassifolia* sobre la producción de IL-8 en células cutáneas (queratinocitos HaCaT) estimuladas por IL-17, una citocina proinflamatoria involucrada en la patogénesis de la psoriasis. Además, se evalúa su toxicidad dérmica aguda en ratas Wistar a 200 y 2000 mg/kg p.c. en aras de conocer su perfil de seguridad por vía tópica, siguiendo la guía 402 de la OCDE. Los resultados obtenidos *in vitro* demuestran que este extracto posee actividad anti-IL17. Sin embargo, su exposición tópica aguda genera daño cutáneo y renal dosis-dependiente en ratas Wistar. Se requieren estudios subsecuentes a dosis más bajas en administración repetida (subaguda, subcrónica y crónica) para definir con mayor precisión el perfil de seguridad de este extracto antes de proponer su uso para el tratamiento de la psoriasis.

Palabras clave: IL-17, piel, psoriasis, *Quercus crassifolia*, toxicidad

Abstract

Quercus crassifolia is a Mexican timber species having great ethnomedicinal importance, being also highly appreciated for the quality of its wood. Its forest exploitation generates a large amount of waste in the form of poorly used bark that could be used for developing new topical medicinal products to treat psoriasis, an incurable skin disease affecting more than 3 million Mexicans. The present work proposes the *in vitro* evaluation of a purified extract of the bark from this species on the production of IL-8 in skin cells (HaCaT keratinocytes) stimulated by IL-17, a proinflammatory cytokine involved in the psoriasis pathogenesis. In addition, its acute dermal toxicity is evaluated in Wistar rats at 200 and 2000 mg/kg b.w. in order to know its safety profile by dermal route, following OECD guideline 402. The results obtained *in vitro* show that this extract has anti-IL17 activity. However, its acute topical exposure causes dose-dependent cutaneous and renal damage in Wistar rats. Further studies at lower doses at repeated administration (subacute, subchronic, and chronic) are required to better define the safety profile of this extract before proposing its use for psoriasis treatment.

Keywords: IL-17, skin, psoriasis, *Quercus crassifolia*, toxicity

1. INTRODUCCIÓN

La psoriasis es una enfermedad dermatológica incurable, caracterizada por la presencia de lesiones cutáneas en forma de placas rojas, recubiertas de escamas blanquecinas, que afecta alrededor de 3 millones de mexicanos (1). Hasta el presente, sus bases etiopatogénicas no han sido completamente elucidadas, aunque la IL17 parece jugar un papel clave en el desarrollo y evolución de la enfermedad (2). Existen en el mercado numerosos fármacos biotecnológicos anti-IL17, que han demostrado poseer una elevada eficacia para tratar la enfermedad, comparativamente con otras alternativas terapéuticas (2). Estos fármacos son proteínas, siendo generalmente administradas por vía parenteral, causando incomodidad en los pacientes, además de que poseen elevados precios y pueden generar toxicidad a largo plazo (3). Ello conlleva a que un porcentaje no despreciable de los pacientes (69%) utilicen terapias alternativas y complementarias, incluyendo plantas que en muchos casos no están suficientemente caracterizadas (4). Si se considera que esta enfermedad tiene un gran interés para la industria farmacéutica, ya que existen actualmente numerosos fármacos en fase de investigación preclínica y clínica (5) y que los pacientes usan plantas para contrarrestarla, resulta importante identificar extractos naturales prometedores para tratarla haciendo uso de estudios farmacodinámicos y toxicológicos.

México es el segundo centro de diversidad de encinos a nivel mundial (6). Estas plantas se emplean por la industria forestal, por la calidad de su madera, pero también han sido utilizadas durante años para tratar enfermedades dermatológicas por la etnomedicina mexicana (7). La explotación forestal de los encinos genera toneladas de corteza sin aprovechar, que podrían ser utilizadas para el desarrollo de nuevos productos naturales orientados a tratar la psoriasis. Es el caso de *Quercus crassifolia*, un encino mexicano que crece en forma abundante en el estado de Michoacán. Estudios anteriores realizados por nuestro equipo de investigación demostraron que la fracción purificada del extracto acuoso de este encino posee una elevada actividad antioxidante (8) y antimicrobiana (9). Sin embargo, la evaluación realizada de su toxicidad aguda y subaguda por vía oral (9,10) mostró efectos desfavorables, para ser

administrado por esta vía. La presente investigación busca evaluar el potencial farmacológico que tendría la utilización de este extracto por vía tópica para tratar la psoriasis, analizando el impacto *in vitro* del extracto de *Quercus crassifolia* sobre la producción de IL-8 en células cutáneas expuestas a IL-17. Además, se pretende evaluar la seguridad de este extracto en administración aguda por vía tópica en ratas Wistar, utilizando un protocolo estandarizado aprobado por la OCDE en su guía 423 (11). Los resultados de este trabajo permitirían proponer futuras aplicaciones de las cortezas de esta especie forestal para tratar la psoriasis, permitiendo su aprovechamiento racional en el desarrollo de nuevos productos farmacéuticos con valor agregado.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. La piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo, lo cual representa en su superficie, más de 2.5 millones de orificios pilosebáceos y funciona como una barrera biológica metabólicamente activa que separa la homeostasis interna del ambiente externo. La piel continuamente está expuesta a variaciones externas fluctuantes representadas por la radiación solar, la energía mecánica, cambios en la humedad, cambios químicos y/o biológicos (12). Un individuo de peso y estatura medios está cubierto de 1.85m² de piel, con un peso de 4 kg, un volumen es de 4 000 cm³ y tiene un espesor medio de 2.2 mm (varía de 0.4 a 4 mm en las diferentes localizaciones).

La estructura cutánea consta de tres capas superpuestas: la epidermis (considerada el epitelio de cobertura), la dermis (vascularizada y rica en anexos cutáneos y estructuras nerviosas) y la hipodermis (tejido adiposo subcutáneo) (13). También está poblada por apéndices (folículos pilosos, glándulas sebáceas, glándulas sudoríparas ecrinas, y glándulas apocrinas), nervios, corpúsculos sensoriales y vasos sanguíneos. Algunas células del sistema inmune residen en la piel e incluyen células de Langerhans, mastocitos, macrófagos y células T (12).

2.1.1. Características de la epidermis

La epidermis es un epitelio poliestratificado queratinizado que se presenta en la Figura 1 cuya estructura se renueva continuamente y dando origen a estructuras derivadas denominadas apéndices (unidades pilosebáceas, uñas y glándulas sudoríparas) (12,14). La epidermis tiene un espesor total de 0.4 a 1.5 mm, mientras que el espesor total de la piel es de 1.5 a 4.0 mm. La mayor parte de las células en la epidermis son queratinocitos formado por las siguientes capas del interior hacia la superficie (15):

Capa basal o germinativa: consta de cuatro tipos de células: queratinocitos, melanocitos, células de Merkel que forman complejos con las terminaciones nerviosas y células de Langerhans que tienen la función de captar, procesar y presentar antígenos. En esta capa los queratinocitos son las células mayoritarias y

forman una red con melanocitos interconectados. Cada melanocito está en contacto con 30 a 40 queratinocitos vecinos y sintetizan el pigmento melánico, responsable del color de la piel, y tiene acción fotoprotectora. Los melanosomas, unidades que contienen melanina, son producidos por los melanocitos y pasan a los queratinocitos, afectando la pigmentación de la piel y protegiendo contra los rayos ultravioleta. En el embrión de los vertebrados, los melanocitos provienen de la cresta neural y migran hacia la capa basal de la epidermis y los apéndices de la piel. Los melanocitos se adhieren a la membrana basal y su morfología, crecimiento, adhesión y migración están bajo control de los queratinocitos vecinos. Los queratinocitos de la piel humana controlan a los melanocitos de una manera paracrina a través de la secreción de una variedad de citoquinas y factores de crecimiento. En condiciones de exposición a rayos ultravioleta (UV), los queratinocitos secretan factores que promueven el crecimiento de los melanocitos. Los rayos ultravioletas también inducen la expresión de citoquinas proinflamatorias en los queratinocitos. Los queratinocitos no solo secretan citoquinas, sino que también expresan receptores de varias citoquinas, formando asas de autorregulación inmune en la epidermis, lo cual contribuye a una respuesta inmune eficiente. La epidermis está separada de la dermis por la membrana basal (unión dermoepidérmica). Las células de Langerhans son importantes presentadoras de antígenos y las células de Merkel forman parte del sistema celular endócrino difuso (15).

Capa o estrato espinoso de Malpighi: compuesto de varias capas de células poliédricas, de 5 a 10 hileras dependiendo de la región del cuerpo, unidas entre sí por los desmosomas que le dan el aspecto de “espinoso”. A medida que ascienden se van aplanando (15).

Estrato granuloso: consiste en 2 o 3 hileras de células con presencia de “gránulos” que contienen queratohialina que forma los precursores de la queratina; están también los cuerpos de Odland o cuerpos lamelares que son fundamentales en la producción de los lípidos de la capa córnea (15).

Capa córnea o barrera cutánea: formada por varias capas de células aplanadas anucleadas con elevado contenido de queratina conocidas como;

corneocitos, rodeadas de una bicapa lipídica y unidos entre sí por los corneodesmosomas. Provee la función de protección mecánica y controla la pérdida transepidérmica del agua así como su emoliencia, también se encarga de la permeabilidad cutánea (13,15).

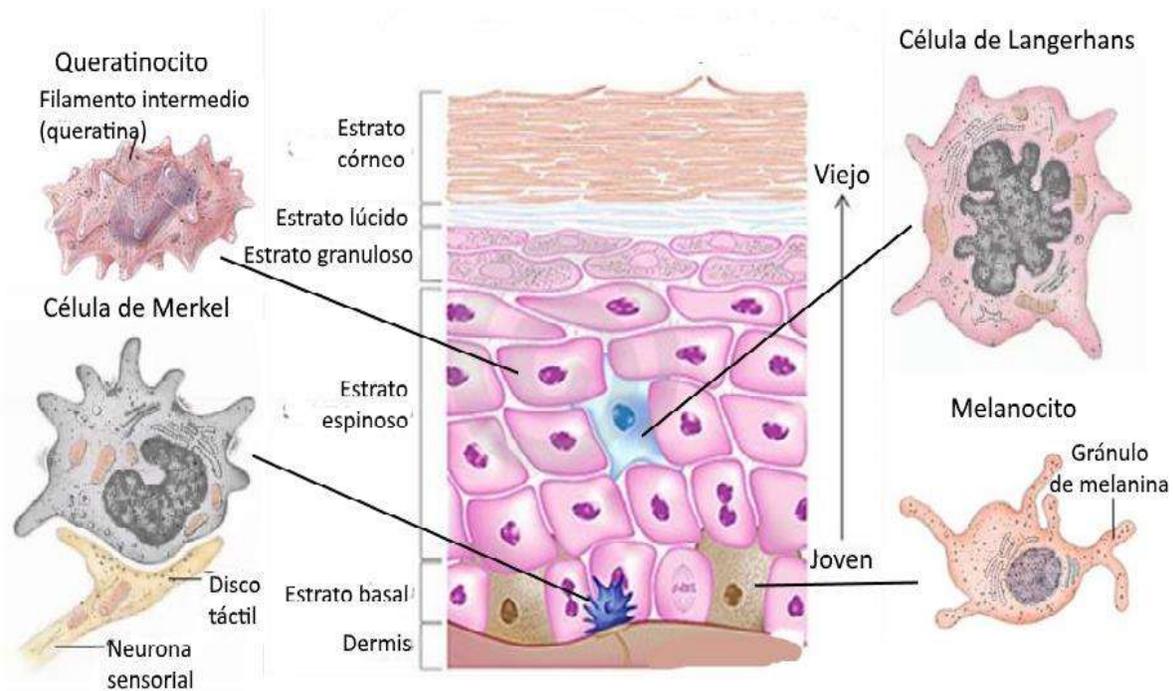


Figura 1. Estructura y tipos celulares de la Epidermis (15).

2.1.2. Características de la dermis

La dermis (corion) se interpone entre la epidermis y la grasa subcutánea. La epidermis avascular depende de la dermis, ricamente vascularizada, para su nutrición. La dermis es el constituyente mayor de la piel y le confiere su flexibilidad, elasticidad y fuerza tensil. Protege al cuerpo de las lesiones mecánicas, fija agua, contribuye a la regulación térmica e incluye receptores de los estímulos sensoriales (15). La dermis es una estructura de soporte, nutricional y de intercambio de células inmunitarias que ejerce una función inductora de crecimiento y diferenciación sobre la epidermis.

Tiene un espesor variable: de 1 a 4 mm, según las regiones; en el dorso es el máximo para soportar el esfuerzo que demanda la posición erecta (13,16). La dermis

se extiende en dos regiones principales, la dermis papilar superior y la dermis reticular más profunda. Estas dos regiones son fácilmente identificables en una sección histológica, difieren en la organización del tejido conjuntivo, densidad celular, patrones nerviosos y vasculares. La dermis papilar confina con la epidermis, se amolda a sus contornos y habitualmente tiene un espesor que no supera al doble de la epidermis. La dermis reticular constituye la masa principal de la dermis. Está compuesta principalmente de colágeno de gran diámetro, organizadas en fascículos grandes de fibras entretejidas, con fibras elásticas ramificadas que rodean a los fascículos. En los individuos normales, las fibras elásticas y los haces de colágeno aumentan de tamaño en forma progresiva hacia la hipodermis. Los fibroblastos de la dermis son células claves en la cicatrización de las heridas. Adicionalmente, la dermis contribuye a la termorregulación a través de su rica red vascular (12,15).

2.1.3. Características de la hipodermis

La hipodermis, llamada también tejido celular subcutáneo o panículo adiposo, es altamente elástica y está constituida por tejido conectivo laxo en donde hay cantidades variables de adipocitos formando la masa principal de células de la hipodermis. Están organizados en lóbulos definidos por tabiques de tejido conjuntivo fibroso, los nervios, vasos sanguíneos y linfáticos están localizados dentro de los tabiques, enervan, nutren y drenan la región. Los adipocitos están llenos de lípidos, los cuales se disponen en lóbulos separados por tabiques interlobulillares. La hipodermis está pobremente irrigada y contiene terminaciones nerviosas (corpúsculos de Pacini) que son sensibles a la presión (12,14).

El tejido de la hipodermis aísla al cuerpo, sirve como suplemento de reserva energética, protección de la piel, y permite su movilidad sobre las estructuras subyacentes. El límite entre la dermis es una transición abrupta de un tejido conjuntivo dérmico predominante fibroso a un tejido subcutáneo fundamentalmente adiposo. 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.

La síntesis y almacenamiento de grasa continúa durante toda la vida por la acumulación facilitada en las células adiposas, o por reclutamiento de nuevas células de mesénquima indiferenciado. La hormona leptina, secretada por los adipocitos, da una señal de retroalimentación de largo plazo que regula la masa de grasa. Los niveles de leptina son más altos en la grasa subcutánea que en la omental, lo que sugiere también un papel de la leptina en el control de la distribución de la grasa (15). Las células grasas están organizadas en lobulillos (o lóbulos secundarios), de aproximadamente 1 cm de diámetro, constituidos a su vez por colecciones microscópicas de lipocitos: los microlóbulos (primarios).

Los lobulillos están separados y sostenidos por tabiques intercalados de tejido conectivo, en su mayoría verticales, por donde transcurren los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. De estos tabiques se desprenden otros mucho más finos que rodean cada microlóbulo formando una trama de fibras colágenas y de reticulina con abundantes capilares terminales en sus redes. Este tipo de vascularización terminal de los lóbulos grasos, sin anastomosis ni comunicaciones capilares con dermis ni entre los microlóbulos, hace que estas estructuras sean particularmente vulnerables (16).

2.1.4 La piel como órgano con capacidad metabólica

La piel tiene una función que se regula hormonalmente, aunque posee además de la capacidad de metabolizar xenobióticos. Tal es el caso de la función sudoral realizada fundamentalmente por las glándulas sebáceas quienes están compuestas por acinos adheridos a un conducto excretor común y se encuentran en la piel de todo el cuerpo con excepción de la palma de la mano y la planta del pie. Ellas son altamente sensibles a las hormonas y llevan a cabo una gran parte del metabolismo hormonal en la piel. Las glándulas sebáceas confieren a la piel una función endocrina independiente y juegan un rol importante en el proceso de envejecimiento cutáneo inducido hormonalmente.

La función sudoral, que puede ser transpiración sensible o insensible (“perspiración”), está regulada por el sistema nervioso central (SNC), principalmente a nivel del hipotálamo y la efectúan las glándulas sudoríparas ecrinas y apocrinas. Las células de la glándula sebácea (o sebocitos) son de origen epitelial y su diferenciación

y maduración se acompaña con la acumulación de cantidades crecientes de una mezcla única de lípidos (sebo). En humanos, la composición del sebo incluye triglicéridos, ésteres de cera, escualeno, colesterol y ácidos grasos.

Entre las funciones atribuidas al sebo en los humanos están: fotoprotección, actividad antimicrobiana, actividad anti-inflamatoria y traslado de antioxidantes solubles en grasa hacia la superficie de la piel. Los sebocitos migran hacia el conducto excretor central de la UPS y eventualmente se desintegran y liberan su contenido de lípidos de una manera holocrina. La descarga de sebo representa una etapa de los estadios finales de la diferenciación de los sebocitos y es el resultado de la acumulación de gotas de lípidos en el citoplasma y la liberación de su contenido en el folículo.

La mayoría de los lípidos de la superficie de la piel se originan en las secreciones de las glándulas sebáceas y aproximadamente 25% de los lípidos sebáceos son ésteres de cera que no son sintetizados por otras células del cuerpo. La función de las glándulas sudoríparas apocrinas se encuentra bajo control de fibras postganglionares del sistema nervioso simpático. Las glándulas sudoríparas ecrinas se desarrollan en la epidermis superficial y permanecen independientes del folículo piloso. La función de la glándula sudorípara ecrina se encuentra bajo control de terminaciones postganglionares del sistema nervioso simpático. Se activan principalmente por estímulos térmicos y son esenciales para la termorregulación, la preservación de la integridad de la barrera física y la regulación del balance de electrolitos. Las células de estas glándulas expresan receptores de varias hormonas (12).

Los queratinocitos están formados por 72 a 80% de agua, y el resto por aminoácidos, principalmente cisteína; pierden su contenido hídrico de manera progresiva; en la capa granulosa tiene 10%, y en la córnea sólo 2%, con lo cual la cisteína se transforma en cistina, principal componente de la queratina, fibroproteína con alto contenido de azufre, con cierta afinidad por las grasas, resistente a ácidos y álcalis débiles, así como a enzimas; también es mala conductora de las radiaciones (12).

La síntesis de melanina, el pigmento que da color a la piel y el pelo, está regulada genéticamente y protege contra las radiaciones.

La piel sintetiza numerosas sustancias inmunológicas activas, intervienen a modo de defensa inmunológica en el reconocimiento y la internalización de antígenos, autorregula el crecimiento y la diferenciación de sus componentes celulares, participa activamente en la circulación linfocitaria y es uno de los órganos diana, en los intrincados mecanismos de la inflamación. La piel es el mayor reservorio de la interleuquina 1 (IL-1). Sus efectos son múltiples y variados, desde producir fiebre hasta poner en marcha la cascada de interleuquinas (16).

La exposición de la piel a medicamentos, productos para el cuidado de la piel, cosméticos y otros productos químicos activa las enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XME) a nivel cutáneo. La Tabla 1 muestra las enzimas que se han detectado en diferentes especies de mamíferos que tienen la capacidad metabólica. Estas características hacen de la piel más que un órgano inerte, uno capaz de activar y desactivar xenobióticos, impedir la acción de toxinas o bien activar a estas toxinas.

Tabla 1. Enzimas metabolizadoras de xenobióticos en la piel de diferentes especies de mamíferos. Modificado de CYP (citocromo P450), GST (glutatión-S-transferasa), ADH (alcohol deshidrogenasa), NAT (N-acetil-transferasa) (17).

Enzima	Piel humana	Piel de rata	Piel de ratón	Piel de cerdo
CYP 1A, 2B	✓	✓	✓	✓
CYP 3A, 2B		✓		
CYP 2B, 3A		✓	✓	
CYP2C9	✓	✓		✓
CYP2D6		✓	✓	✓
CYP2E1	✓		✓	
CYP3A	✓	✓	✓	✓
GST	✓	✓	✓	✓
ADH	✓	✓	✓	✓
NQR	✓		✓	
NAT	✓		✓	

2.2. La psoriasis

La palabra psoriasis etimológicamente deriva de la palabra griega *psor* que significa prurito y *iasis* que significa estado. Se define como una enfermedad inflamatoria crónica y recidivante de la piel, caracterizada por pápulas y placas eritematoescamosas, secas, de diferentes tamaños y configuración (redondeadas, circinadas, arcuata, serpigínea, anular, girata, gutata, rupioide) cubiertas por escamas estratificadas, imbricadas y abundantes, de color grisáceo o blanco nacarado y de localización casi siempre simétrica (18). Tiene una expresión clínica característica con lesiones eritemato-escamosas de extensión y severidad variables (19,20). En su forma típica se caracteriza por pápulas y placas eritemato-violáceas descamativas con una distribución característica. Sin embargo, existen múltiples presentaciones, incluyendo las formas en placas, guttata, pustular, eritrodérmica y folicular como se presenta en la Figura 2 (21).

La psoriasis posee una etiología desconocida que puede aparecer a una edad temprana o tardía, siendo los primeros los que suelen padecer formas más graves y en general, con antecedentes familiares positivos. Este trastorno se asocia a una predisposición poligénica aumentando de forma importante el número de hijos afectados cuando ambos padres padecen la enfermedad, llegando al 41%. Los tipos de antígenos leucocitarios humanos (HLA) que intervienen en este aumento de frecuencia son varios pero el alelo HLA-Cw6 parece ser el más relacionado con la misma. Además de los aspectos hereditarios, se habla de factores desencadenantes como traumatismo físico (fenómeno de Koebner), infecciones bacterianas, estrés, clima, fármacos y alcoholismo. Es considerada una enfermedad sistémica de base inmunológica en la que intervienen predominantemente los linfocitos T CD8+, provocando una alteración de la citocinética de los queratinocitos con un acortamiento del ciclo celular y una producción mayor de células epidérmicas (22).

El diagnóstico es fundamentalmente clínico, aunque en ocasiones hay que recurrir a la biopsia, y se caracteriza por lesiones consistentes en pápulas y placas eritematodescamativas bien definidas, muchas veces pruriginosas y con aparición de signo de Auspitz (el rascado de las escamas da lugar a pequeños puntos sangrantes)

y fenómeno de Koebner (cualquier trauma o irritación de la piel puede dar lugar a la aparición de lesiones) (19)



Figura 2. La psoriasis se puede presentar de formas diferentes, A) Pústula, B) Folicular, C) Guttata, D) Placas y E) Eritrodérmica (21).

2.2.1. Prevalencia en México y el mundo

La psoriasis, mundialmente oscila entre 0.1 y 6 %, afecta a 2 % de la población europea y de 1 a 2 % de la norteamericana y la cubana. Es más frecuente en la raza blanca que en la negra y mongoloide, y muy rara en los indios. Afecta por igual en ambos sexos y puede aparecer a cualquier edad, desde el nacimiento hasta la vejez, pero como promedio general a los 27 años (18).

En México la psoriasis afecta de 1 a 3 % de la población en general. Además de las lesiones cutáneas pueden presentarse alteraciones ungueales hasta en 55 % de los pacientes, tanto en las uñas de las manos como de los pies (20).

Por otra parte, en un estudio descriptivo, participaron un total de 209 mexicanos, que fueron divididos en dos grupos: el primero estuvo conformado por 103 pacientes con psoriasis y el segundo, por 106 personas voluntarias libres de la

enfermedad. Se trató de individuos que acudieron a la consulta externa del Hospital General Dr. Manuel Gea González durante el periodo de febrero de 2010 a febrero de 2011. La edad media del grupo con psoriasis fue de 48.37 (\pm 15) años; hubo 56 (54.4 %) mujeres y 47 (45.6 %) hombres. En lo referente al grupo con psoriasis, la mayoría de los pacientes presentaron psoriasis leve a moderada, con una media de 15.72 (\pm 14.60) puntos con base en el sistema PASI; 75 (72.8 %) pacientes presentaron psoriasis leve; en 25 (24.3 %) de ellos se observó psoriasis moderada y 3 (2.9 %) pacientes tuvieron psoriasis grave. La psoriasis en placas fue la forma de presentación clínica más común, representando el 94.2% de los pacientes (23).

2.2.2 La interleucina-17 (IL-17) y la patogénesis de la psoriasis

En la actualidad no existe una hipótesis definitiva acerca de la patogénesis de la psoriasis, sin embargo, una de las más aceptadas por la comunidad científica presupone que esta enfermedad tiene lugar a circuitos inflamatorios complejos donde el sistema inmune y las células cutáneas interactúan a través de mediadores pro-inflamatorios dentro de los que se destacan las citocinas, especialmente el factor de necrosis tumoral (TNF) y la IL-17. El impacto de ambas citocinas en la enfermedad se ha demostrado considerando la eficacia clínica de los tratamientos que las bloquean.

La IL-17 fue descrita inicialmente en 1995 y 1998 se iniciaron los reportes de detección de IL-17 en las lesiones psoriásicas. El descubrimiento de las células Th17 en 2005, despertó el interés de estudiarlas en enfermedades autoinmunitarias, como la artritis reumatoide, la enfermedad de Crohn, la esclerosis múltiple y la psoriasis, las cuales se han considerado hasta ese entonces como debidas a un perfil Th1 (24).

Existen seis miembros en la familia de citocinas de la interleucina 17 (IL-17), incluyeron la IL-17A (comúnmente conocida como IL-17), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (también conocida como IL -25) e IL-17F. Entre todos los miembros, la función biológica y la regulación de IL-17A e IL-17F son las que mejor se comprenden. Estas dos citocinas comparten la homología de secuencia más fuerte (25,26).

Esta familia de citoquinas presenta secuencias muy conservadas en mamíferos, de tal forma que entre las isoformas humanas y murinas de IL-17 existe una homología de secuencia entre el 62 % en la IL-17A y el 88 % en la IL-17B1. Los dos miembros

que presentan mayor homología entre sí son la IL-17A y la IL-17F, que pueden formar heterodímeros. La IL-17A, inicialmente denominada antígeno citotóxico humano asociado a linfocitos T, fue aislada por primera vez en 1993 a partir de un hibridoma de células T. A nivel molecular, IL-17A es una glicoproteína de 155 aminoácidos y con un peso molecular de 35 kDa, aunque de manera general da lugar a la formación de homodímeros unidos entre sí por un puente disulfuro. Las citoquinas IL-17 activan receptores de la misma familia, los IL-17R que constan de 5 miembros, nombrados desde IL-17RA hasta IL-17RE, y que también pueden formar homo y heterodímeros entre sí (Figura 3) (26).

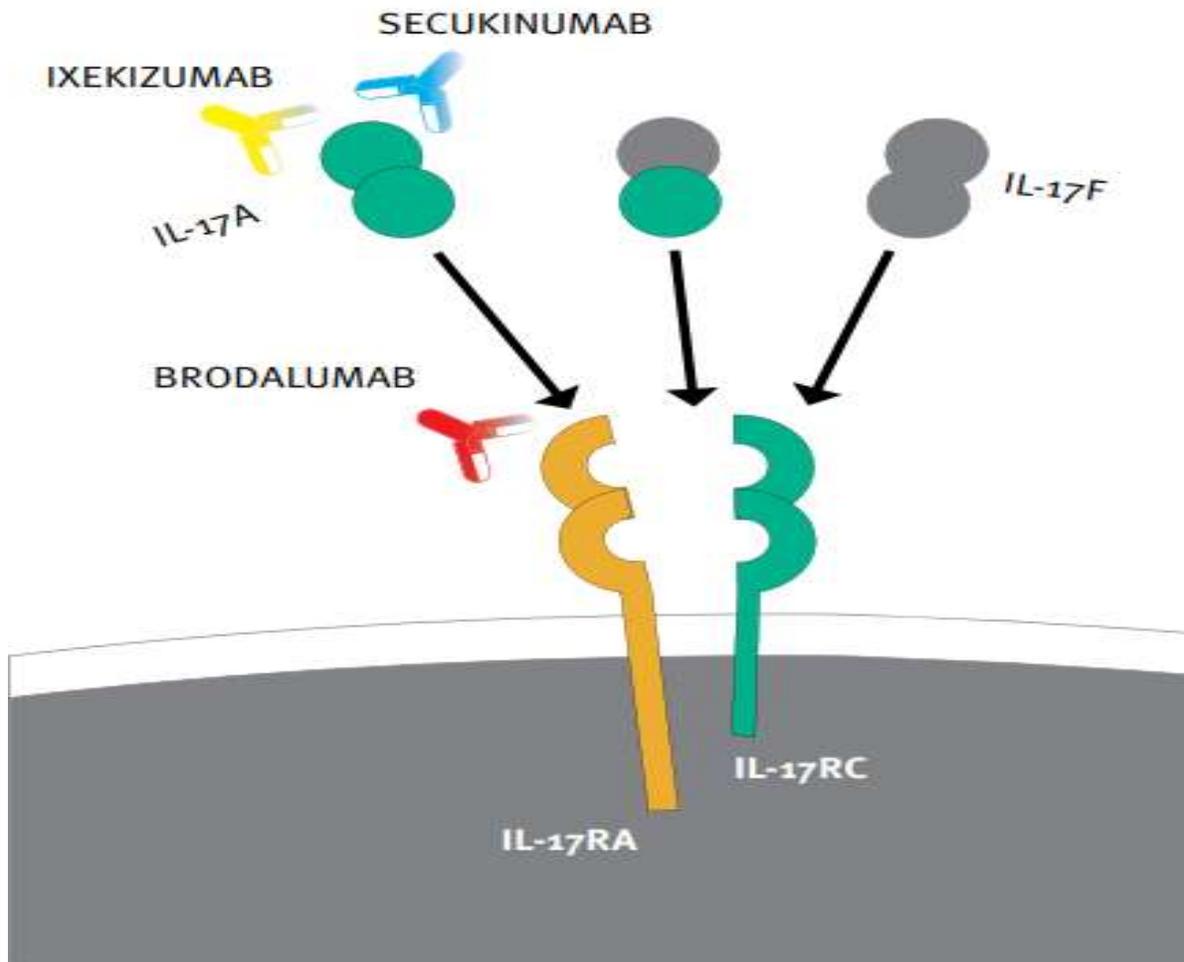


Figura 3. La subfamilia de citoquinas IL-17 y sus receptores. Las citoquinas IL-17 son seis (A-F), siendo IL-17A e F las más relacionadas con la psoriasis.

El efecto de IL-17A y F está compuesto por las subunidades IL-17RA e IL-17RC. Secukinumab e ixekizumab bloquean la IL-17A, mientras que brodalumab bloquea el receptor, IL-17RA (25).

La IL-17, producida por los LT CD4+ activados, también denominan células Th17, tiene actividad sobre las células epiteliales. Entre sus funciones se han descrito, dependiendo de su cantidad y concentración, el aumento de la IL-6 que induce proliferación de queratinocitos, así como la IL-8 la cual es quimiotáctica para neutrófilos y de ICAM-1. A diferencia de la piel sana, en biopsias de lesiones psoriásicas se puede detectar ARNm de IL-17, lo que indica que esta interleuquina puede amplificar y mantener la inflamación en la psoriasis. La interleucina 17A (juega un papel importante en la defensa frente a patógenos extracelulares y hongos, también participa en el desarrollo y cronicidad de trastornos inflamatorios. Mientras que su deficiencia produce una reducción en el control de infecciones extracelulares y fúngicas, su sobreproducción puede constituir la base patogénica de varias enfermedades crónicas inflamatorias, como la espondilitis anquilosante, la artritis psoriásica, la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple, la psoriasis, la uveítis y la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Tabla 2) (27).

Tabla 2. Acciones biológicas de la IL-17 (27).

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA IL-17
Inducen respuestas proinflamatorias al aumentar la producción de:
<ul style="list-style-type: none"> ▪ Quimiocinas: CXCL₁, CXCL₈, CXCL₁₀ ▪ Citocinas: TNF-α, IL-1, IL-6, GM-CSF, G-CSF ▪ Péptidos antimicrobianos: mucinas, β defensinas, S_{1000A7-9} ▪ Proteínas de remodelado tisular: amiloide sérico A, MMP₁, activador de ligando de NF-κB
Sinergismo con otras citocinas: TNF-α, IL-1, IFN-α
Promoción de granulopoyesis
Reclutamiento, movilización y activación de neutrófilos
Conexión de inmunidad innata y adaptativa

Respuesta a infecciones por bacterias Gram positivas y Gram negativas

Protección contra infecciones por bacterias y hongos extracelulares.

Las células Th17 se caracterizan por producir IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y IL-26. Aunque la producción de IL-17 por los linfocitos T es importante, la mayor proporción de esta citocina es producida por células de la inmunidad innata, como neutrófilos y mastocitos, presentes en las lesiones psoriásicas. La IL-23 y la IL-1 β inducen la degranulación de los mastocitos. Otras células productoras de IL-17 e IL-22 son los linfocitos T $\gamma\delta$ y las células linfoides de la inmunidad innata, las cuales son más frecuentes en los epitelios y reconocen patógenos mediante los receptores de inmunidad innata. Son reclutadas a la piel por las quimiocinas liberadas por los queratinocitos activados y las células dendríticas. En general, la IL-17 producida, no solo por células de la inmunidad adaptativa, sino también por células de la inmunidad innata, juega un papel importante en la fisiopatología de la psoriasis y posiblemente en otras enfermedades mediadas por el eje de citocinas IL-17 e IL-23 (24).

En psoriasis, la IL-17 ejerce su acción en los queratinocitos, en los que induce la expresión de quimiocinas y péptidos antimicrobianos, al igual que la expresión de CCL20 que, a su vez, recluta células que expresen su ligando, CCR6, específicamente células dendríticas mieloides y células Th17. Aumenta la expresión de las quimiocinas CXCL 1, 3, 5, 6 y 8, que activan el receptor CXCR2, presente en los neutrófilos. Además, incrementa la producción de péptidos antimicrobianos, como las b-defensinas, S100A7, S100A8, S100A9, con lo cual contribuye al estímulo proinflamatorio. Se ha demostrado en modelos animales que los ratones deficientes para IL17RA, son más resistentes a la inducción de psoriasis por la aplicación de imiquimod (análogo de TLR7), lo que sugiere la importancia de la vía de IL-17 en psoriasis (Tabla 3) (24).

Tabla 3. Principales acciones de la IL-17 e ILF en psoriasis (24).

IL-17A	IL-17F
<p>Recluta neutrófilos, células dendríticas y células Th17. Angiogénesis. Remodelado. Inflamación vascular. Arterioesclerosis. Inducen la expresión de IL-6, CCL20 y moléculas de adhesión. Induce la producción de péptidos antimicrobianos y TNF-α.</p>	<p>Induce la producción de IL-8 por queratinocitos. Quimiotaxis de neutrófilos. Inhibe la apoptosis de queratinocitos.</p>

2.2.3 Medicamentos utilizados para la psoriasis

Existen terapias que son muy utilizadas para psoriasis como lo es la **terapia tópica** representada por la antralina, glucocorticoides, Vitamina D3 y sus análogos la misma se caracteriza por colocarse directamente en el área afectada. La **terapia sistémica** por su parte utiliza fármacos como el metotrexato, ciclosporina, retinoides, mofetil micofenolato, glucocorticoides sistémicos, leflunomida. Por su parte, la **fotoquimioterapia (PUVA)**; combina un fotosensibilizante potente como es el 8-metoxipsoraleno (8-MOP) con la exposición a radiación UV (UVA: 320-400 nm), lo que suprime irreversiblemente la síntesis de ADN y la mitosis en las células epiteliales, con la subsecuente inhibición de su proliferación, disminución de la producción de IL-2, inhibición de la actividad quimiotáctica y disminución de la presentación antigénica. Además, favorece el desarrollo de repuestas Th2 (desviación inmune). Los últimos tratamientos para la psoriasis incluyen a la **terapia biológica**; dirigida a interrumpir la migración de los linfocitos T activados desde el endotelio hasta la dermis y la epidermis; inhibir la activación y proliferación de linfocitos T; modular la liberación y los efectos biológicos de las citoquinas inflamatorias (TNF- α) y promover mecanismos de desviación inmune (Alafcept, Efalizumab, HuMax-CD4, Etarnecept) (28).

También se han utilizado el ustekinumab y briakinumab, los cuales son anticuerpos que atacan la subunidad p40 de las IL-23 y IL-12, producidas por las

células Th17 en la psoriasis; así como de inhibidores de la IL-17 o de su receptor (secukinumab, ixekizumab, brodalumab) (1,29).

El éxito de los tratamientos se debió a la realización de investigaciones en las que se establecieron hipótesis en modelos biológicos con posibilidad de trasladarse rápidamente al campo clínico, al mismo tiempo que esta experiencia clínica servía de base para refinar los conceptos etiopatogénicos. Este proceso bidireccional ha garantizado el éxito en la generación de tratamientos que ha permitido la salida al mercado de nuevos fármacos, contribuyendo a la mejoría en la calidad de vida de los pacientes (Figura 4) (1).

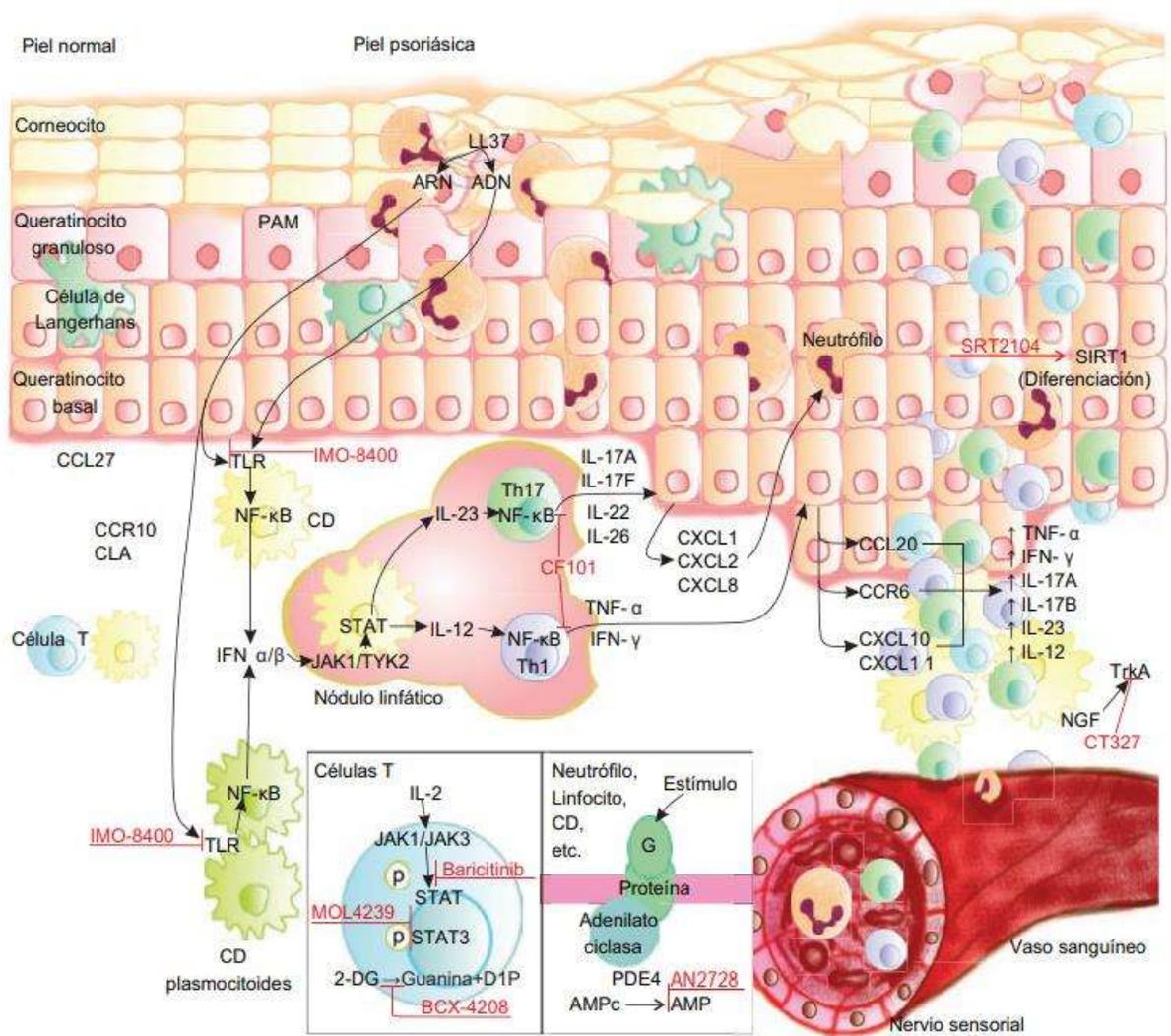


Figura 4. Patogénesis de la psoriasis e implicación de los nuevos fármacos en desarrollo.

La psoriasis implica la interacción compleja entre neutrófilos, células dendríticas (CD), linfocitos T (Th1 y Th17) y queratinocitos. La activación de los queratinocitos por una lesión inicial induce la producción de péptidos antimicrobianos (PAM), propiciando que las CD liberen citocinas (IFN- α y β , IL-12 e IL-23) implicadas en la diferenciación de linfocitos Th1 y Th17, que producen mediadores (IL-17A, IL-17F, IL-22, TNF- α e IFN- γ) que estimulan la generación de quimiocinas (CXCL y CCL) en los queratinocitos, con el consecuente reclutamiento de más inmunocitos en la piel. Algunos de los nuevos fármacos antipsoriásicos en investigación actúan en: a) el bloqueo de la vía de señalización JAK/STAT (baricitinib, MOL4239, BCX-4208); b) la inhibición de enzimas como la PDE4 (AN2728) y la PNP (BCX-4208); c) el bloqueo de los receptores TLR (IMO-8400); d) la inhibición del receptor de la TrkA (CT327); e) la activación de la SIRT1 (SRT2104) y del A3AR (CF101). 2-DG = 2-dexosiguanosina, A3AR = receptor de adenosina A3, AMPc = monofosfato de adenosina cíclico, D1P = dexosiribosa-1-fosfato, JAK = Janus

cinasa, NF- κ B, factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas, NGF = factor de crecimiento nervioso, PNP = fosforilasa de nucleósidos de purina, STAT = transductor de señal y activador de la transcripción, SIRT1 = sirtuina-1, TLR = receptores tipo Toll, TrkA = tropomiosina cinasa A (27).

Teniendo en cuenta todas las moléculas que participan en la patogenia de la psoriasis, los principales tratamientos desarrollados hasta ahora se han dirigido a bloquear o inhibir algunas de estas citocinas. Así, dentro de las terapias biológicas con indicación en psoriasis destacan las siguientes: infliximab y adalimumab son anticuerpos monoclonales que se unen o bloquean el TNF- α ; etanercept es una proteína de fusión que se une y bloquea el TNF- α , y ustekinumab es un anticuerpo monoclonal que se une y bloquea la IL-12 y la IL-23. Por último, están los anticuerpos monoclonales que se unen y bloquean específicamente la IL-17A, como secukinumab e ixekizumab. Brodalumab es un anticuerpo que se une a la subunidad IL-17RA del receptor de la IL-17A y otras citocinas de la familia IL-17, impidiendo su función. Todos ellos han mostrado su eficacia, tolerabilidad y seguridad en el tratamiento de la psoriasis (24,27).

2.2.4 Nuevos medicamentos en desarrollo para el tratamiento de la psoriasis

Existen 18 fármacos antipsoriásicos asociados con nuevos objetivos, los cuales que están siendo desarrollados por múltiples compañías farmacéuticas en el mundo. A pesar de estas alentadoras noticias, la psoriasis sigue siendo una enfermedad incurable y existen todavía varios aspectos que pueden dificultar el desarrollo futuro de fármacos, que deben ser profundizados en su integración con esquemas de medicina traslacional (Tabla 4) (1).

Tabla 4. Nuevos medicamentos en desarrollo para el tratamiento de la psoriasis (1).

Fármaco	Mecanismo de acción/objetivo terapéutico (compañía farmacéutica)	Fase del desarrollo
AN2728	Inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa 4 (Pfizer).	Fase II
CT327	Inhibidor selectivo del receptor de la tropomiosina cinasa A (TrkA) (Creabilis, S.A).	Fase II
IMO-8400	Bloqueo de la activación de los receptores de tipo Toll (TLR) 7, 8 y 9 (Idera Pharmaceuticals).	Fase II
SRT2104	Activa a la sirtuina-1 (SIRT1) modulado la función de NF-kB y p53, inhibe la proliferación de queratinocitos (GlaxoSmithKline).	Fase II
AZDO284	Agonista inverso del receptor de ácido retinoide asociado con el receptor nuclear huérfano (AztraZeneca).	Fase II
CF101	Agonista del receptor de adenosina A3 (A3AR) (Can-Fite BioPharma Ltd).	Fase II
BCX-4208	Inhibidor de la fosforilasa de nucleósidos de purina (PNP) (BioCryst Pharmaceutical, Inc/Hoffman-La Roche).	Fase II
Namilumab (MT-203)	Anticuerpo monoclonal que neutraliza de forma potente y específica al factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (Takeda Pharmaceutical).	Fase II
Ponesimod (ACT-128800)	Agonista selectivo del receptor de esfingosina-1-fosfato (S1P) reduce la disponibilidad de células efectoras B/T circulantes. (Actelion Pharmaceutical).	Fase II

RWJ-445380	Inhibidor de la cetapsina S (Alza Corporation, DE).	Fase II
Ruxolitinib	Inhibidor de la familia de las cinasas Janus JAK1/JAK2 (Incyte Corporation).	Fase II
Baricitinib	Inhibidor de la familia de las cinasas Janus JAK1/JAK2 (Eli Lilly).	Fase II
GSK2586184	Bloqueador selectivo de JAK1 (GlaxoSmithKline).	Fase II
INCB039110	Bloqueador selectivo de JAK1 (Incyte Corporation).	Fase II
Lestaurtinib	Inhibidor del receptor de tirosina cinasa FLT3 y de JAK2 (Teva Pharmaceutical).	Fase II
ASP015K	Inhibidor selectivo de JAK3 (Astellas Pharma).	Fase II
MOL4239	Inhibidor de la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) Moleculin, LLC).	Fase II
KD025	Inhibidor de la quinasa 2 asociada con Rho (ROCK2) bloqueando la fosforilación de STAT3 y la producción de IL-17 e IL-21 (Kadmon Holdings, Inc)	Fase II

2.3 La evaluación toxicológica preclínica: una etapa esencial del desarrollo farmacéutico para la psoriasis

El objetivo principal de la evaluación preclínica toxicológica es definir los efectos toxicológicos de un fármaco, estos permitirán identificar una posible dosis segura, los órganos blanco de efectos tóxicos y proporcionar parámetros seguros para el

monitoreo clínico. El desarrollo preclínico toxicológico se incluye en la fase de evaluación preclínica e involucra diversos ensayos del compuesto seleccionado para confirmar que será segura su administración en humanos (Figura 5) (30).

Estos estudios constituyen una etapa fundamental en el proceso de desarrollo de un fármaco, ya que la evidencia de toxicidad permite la toma de decisiones con respecto a la reestructuración de las investigaciones previas y es necesario, detener las etapas futuras. Los ensayos preclínicos toxicológicos implican el uso de animales, los que se seleccionan cuidadosamente tomando en cuenta: la edad, el estado fisiológico y la estabilidad del material de prueba en las condiciones de aplicación. En efecto, los animales de experimentación constituyen la unidad experimental en los estudios toxicológicos *in vivo*, y su empleo está regido por regulaciones con vistas a un adecuado uso, según los requerimientos de estudio y tomando en cuenta principios éticos (31).

Entre las especies más usadas se encuentran los: roedores, perros, cerdos, primates no humanos y para casos muy específicos, animales transgénicos. La cantidad de animales en un ensayo preclínico es fundamental ya que en una población muy pequeña tal vez no se observe algún evento tóxico y se genera información falsa. Para los resultados sobre las relaciones dosis-respuesta de fármacos de dosis únicas, que son aquellas en las que los animales solo se exponen a una dosis alta del fármaco, pueden ser obtenidos a través de la realización de un único estudio de toxicidad con animales modelo (31).

Desde la pasada década, como resultado de los avances científicos y por razones éticas y prácticas, se han introducido cada vez más los denominados métodos alternativos en la evaluación toxicológica, con el objetivo de reducir el número de animales empleados en cada ensayo y refinar procedimientos existentes para disminuir su estrés y el sufrimiento (31).

La evaluación toxicológica de nuevos candidatos terapéuticos a ser utilizados en la psoriasis posee una gran relevancia, considerando las características de esta enfermedad, particularmente en lo relativo a su cronicidad y alta frecuencia de comorbilidades. Al ser una enfermedad crónica, los pacientes utilizan los tratamientos durante gran parte de sus vidas, por lo que la probabilidad de que desarrollen efectos

tóxicos es mayor. En este contexto, la evaluación de nuevos candidatos terapéuticos desde la realización de estudios a dosis únicas, hasta los estudios a dosis repetida reviste una gran importancia (32).

Los productos naturales presentan numerosas ventajas para el desarrollo de nuevos medicamentos antipsoriásicos ya que poseen una amplia gama de farmacóforos con alta complejidad estereoquímica, lo que favorece la unión sobre dianas complejas que implican interacciones proteína-proteína como las que se presentan en los circuitos inflamatorios mediados por citocinas. Otra ventaja del uso de productos naturales para la psoriasis se relaciona con el hecho de provenir directamente de la naturaleza, ya que se ha sugerido que numerosos compuestos exitosos como fármacos tienen la propiedad de “semejanza de metabolitos” (“metabolite-likeness”), que significa que tales compuestos no solo son biológicamente activos, sino que también pueden ser sustratos para uno o más sistemas transportadores, facilitando la cesión de los compuestos activos a su sitio de acción intracelular (33,34). Sin embargo, su seguridad debe ser establecida a través de estudios toxicológicos antes de proponer un uso terapéutico para la psoriasis.

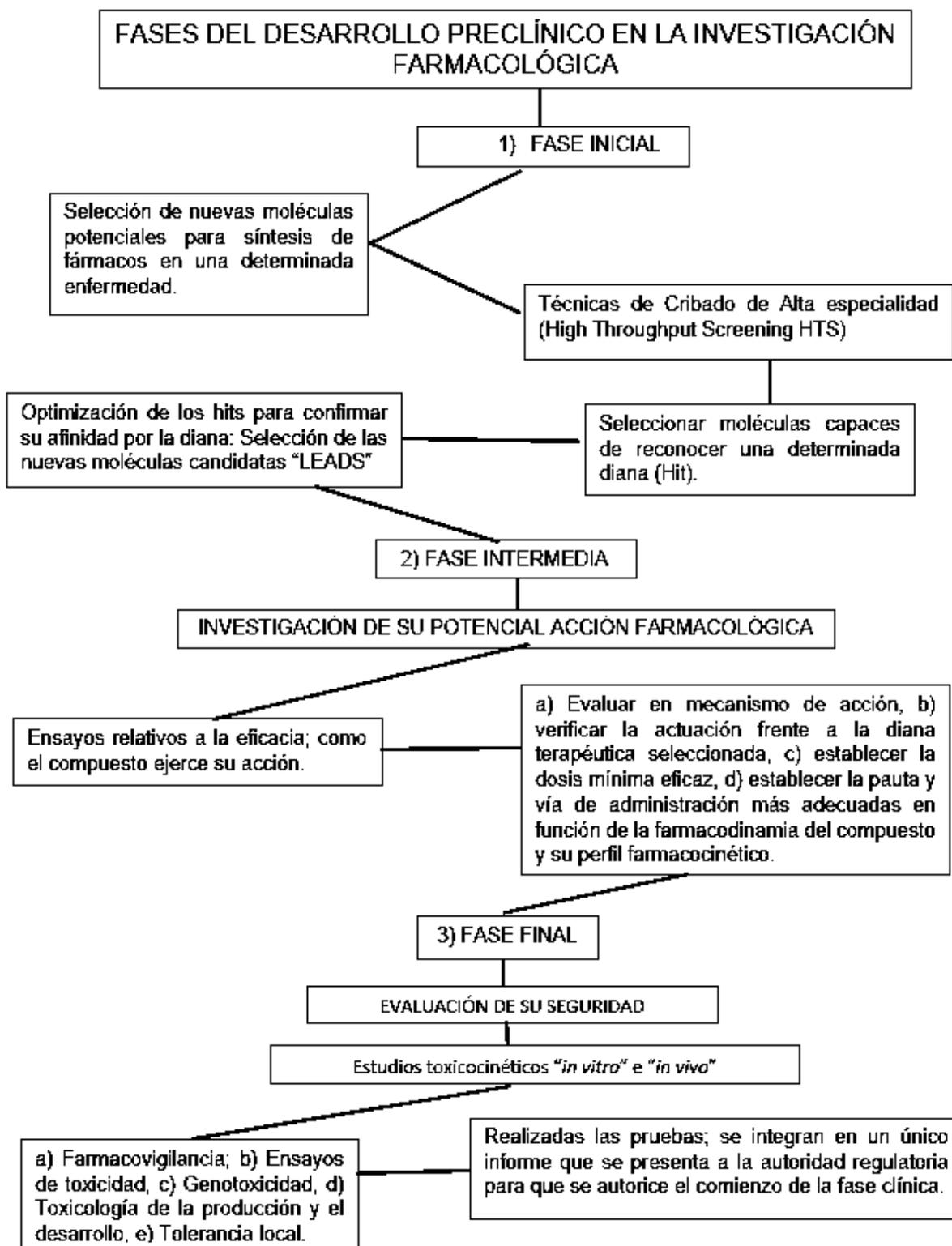


Figura 5: Diagrama de flujo del desarrollo de la fase preclínica (30).

2.3.1 Consideraciones regulatorias en la evaluación preclínica toxicológica. Tipos de estudios toxicológicos

La evaluación preclínica toxicológica está ampliamente regulada por directrices internacionales como aquellas establecidas por Comisión de la Unión Europea, la Organización para la cooperación y el desarrollo económico (OCDE), mientras que en América la FDA (Food and Drug Administration, en inglés) tiene sus propias directivas, aunque también se acepta la normatividad de la OCDE. En México la agencia que regula estas directivas es la COFEPRIS. Todas las agencias reguladoras poseen un comité científico asesor en materia de toxicología y ecotoxicología, que evalúa los riesgos sanitarios y medioambientales, integrado por expertos en estas áreas quienes actualizan las directrices y elaboran informes que deben ser acatadas e incluidos en legislación nacional (35). De manera general los estudios toxicológicos regulatorios involucran la exposición a las sustancias de interés durante diferentes periodos de tiempo en diferentes niveles de dosis, para evaluar el impacto de la exposición del producto sobre los órganos dianas.

Los estudios toxicológicos preclínicos *in vitro* e *in vivo* para la evaluación de medicamentos pertenecen a los siguientes estudios:

Estudios agudos: Estos estudios se conocen también como estudios de dosis única y se realizan empleando dos especies, una de ellas debe ser de roedor. Tradicionalmente el objetivo de los estudios de toxicidad aguda era determinar la Dosis Letal Media (DL50) es decir aquella dosis que ocasione la muerte a la mitad de los animales en experimentación. Actualmente los estudios de toxicidad aguda tienen establecidas dosis límite, por lo general a 1000 o 2000 mg/kg, debido a que los estudios clínicos difícilmente utilizaran dosis mayores. Una variante de los estudios de toxicidad aguda son los estudios de irritación dérmica e irritación ocular que se realizan para evaluar efectos de medicamentos cuya vía de administración es en órganos específicos como ojos y piel (30).

Estudios Subagudos: los estudios subagudos se definen como los efectos tóxicos que se manifiestan tras la administración repetida de una sustancia durante un corto período de tiempo, generalmente entre 14 y 30 días. Este ensayo tiene como objetivo obtener información para la selección de los niveles de dosis que serán

empleados en los estudios subcrónicos y crónicos, así como la identificación de los efectos tóxicos que pudieran aparecer bajo estas condiciones de experimentación (31).

Estudios Subcrónicos: determinan los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que representa, aproximadamente, el 10 % de la vida del animal. Esto propicia la detección de los efectos aditivos debido a la administración del producto, y permite definir la máxima dosis con la que no se aprecia toxicidad relacionada con la droga (NOEL), así como la dosis máxima tolerada (DMT). El estudio subcrónico no es capaz de detectar aquellos efectos que se manifiestan tras un mayor período de latencia; sin embargo, brinda una valiosa información sobre los órganos dianas, y constituye la base para la selección de los niveles de dosis a evaluar en los estudios crónicos (31).

Estudios Crónicos: se realizan con el objetivo de determinar potencial toxicológico de la sustancia luego de una prolongada y repetida administración. El tiempo de administración varía para especies roedoras y no roedoras. Así, en roedores es entre 6 y 12 meses, y en no roedores de 9 y 12 meses, períodos suficientes como para que se manifieste el efecto tóxico de una sustancia por su uso crónico. El ensayo debe ser realizado en al menos dos especies: una roedora, preferiblemente en ratas (al menos 20 animales/sexo/grupo); y una no roedora, siendo los perros (al menos 4 animales/sexo/grupo) una de las más empleadas. El empleo de otras especies en estudios crónicos es poco frecuente, y ha de realizarse teniendo en cuenta argumentos sólidos que demuestren la necesidad del empleo de la misma. Su diseño se encamina a detectar los efectos tóxicos generales, incluidos los neurológicos, fisiológicos, bioquímicos, conductuales y patológicos, como resultado de la prolongada acción y la incrementada concentración de la sustancia administrada o sus metabolitos. En estos estudios es conveniente poder determinar la relación dosis respuesta y NOEL. Los niveles de dosis a utilizar se seleccionan de acuerdo a toda la información fármaco-toxicológica precedente, y ésta se analiza como un todo durante el diseño experimental, debido a lo costoso que resulta este tipo de ensayo. La máxima dosis a emplear, la cual no debe exceder 1 000 mg/kg de peso corporal por día, debe inducir signos de toxicidad sin que ponga en peligro la supervivencia de los animales, para lo

cual es necesario basarse en los hallazgos indicativos de toxicidad del estudio subcrónico precedente. Por su parte, la dosis menor no debe inducir evidencias de toxicidad, mientras que en la dosis intermedia se debe manifestar una disminución de los síntomas y signos indicativos de toxicidad observados en la dosis mayor (31).

2.3.1.1 Evaluación de la toxicidad aguda: métodos clásicos y alternativos

El término método alternativo en la experimentación animal describe cualquier cambio en los protocolos oficiales que contribuya al refinamiento de las técnicas, la reducción del número de animales utilizados o el reemplazo de los mismos. Estos principios se conocen como 3Rs y fueron definidos por Russell y Burch en su libro *The principles of humane experimental technique*. Las 3Rs provee una estrategia para el acercamiento racional a minimizar en los experimentos el uso y sufrimiento animal unido a un compromiso con la calidad del trabajo científico (36).

El proceso de validación de métodos alternativos garantiza que sean científicamente validados y eventualmente aceptados por las autoridades reguladoras para la clasificación, etiquetado, producción y seguridad. Requieren ser validados, aquellos métodos empleados en la valoración de riesgo. Para otros objetivos, los métodos experimentales no han de seguir este proceso de validación y aceptación reguladora. La validación es un proceso basado en principios científicos que demuestran la fiabilidad y relevancia de un ensayo, método o proceso desarrollado para un propósito específico. La fiabilidad es una medida objetiva de la reproducibilidad dentro de un laboratorio, cuando el ensayo se ha realizado siguiendo el mismo protocolo estandarizado (36).

Una vez que un método ha sido científicamente validado, entra en el proceso de aceptación regulatoria y adopción como directriz, lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración de riesgo. La aceptación regulatoria varía de un país a otro e incluso de una agencia regulatoria a otra dentro del mismo país; por lo tanto, la OECD fomenta la armonización de la aceptación regulatoria internacionalmente a través de la Guía para la Validación y Aceptación Internacional de Nuevos Ensayos o Ensayos Modificados para la Evaluación de Riesgo. Observar

los principios definidos en las Directrices Generales de la OECD incrementa las probabilidades de adopción de métodos nuevos o modificados (36).

En diciembre de 2002 quedó abolida por la OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) la ejecución del test clásico para la determinación de toxicidad aguda y la dosis letal 50 (DL₅₀) que fue sustituido por tres métodos alternativos cuyo objetivo común es reducir el número de animales empleados y minimizar el sufrimiento de éstos, estos métodos comprenden el test de Clasificación Tóxica Aguda o Método de las Clases de Toxicidad (Toxic Class Method, TCM), Procedimiento de Sube y Baja (Up-and-Down Method, UDP) y Procedimiento de Dosis Fijas (Fixed Dose Procedure, FDP). El Procedimiento de Dosis Fijas fue adoptado en la Guía No. 420 de la OECD como alternativa a la prueba clásica aguda. El método se basa en la evaluación de dosis prefijadas (5, 50, 300 y 2000 mg/kg) para discernir la clasificación tóxica de una sustancia según el Sistema Global Armonizado (SGA) La dosis seleccionada debe ser no letal, no dolorosa y no estresante, además de no ser corrosiva ni severamente irritante (37).

2.3.1.2 Métodos de evaluación de la toxicidad dérmica

La evaluación de la capacidad de una sustancia para producir corrosión o irritación dérmica es, uno de los estudios de toxicidad requeridos por las agencias reguladoras para los compuestos químicos que serán empleados por la vía tópica. Tradicionalmente, se utilizaban animales de laboratorio para evaluar la corrosión e irritación dérmica usando el método publicado en 1944 por John Draize, que usa conejos albinos. En los últimos años, el test de Draize ha recibido numerosas críticas tanto por la subjetividad inherente al procedimiento de evaluación como por la posibilidad que tiene de causar daños severos y dolor a los animales usados en el estudio. Además, existe una gran presión social liderada por las sociedades y organizaciones protectoras de animales que promueven una legislación restrictiva del mercado de productos cuyos ingredientes han sido testados en animales. Por esta razón, en la actualidad, la predicción de la toxicidad dérmica aguda inducida por compuestos químicos es un área en la que se están haciendo considerables esfuerzos dirigidos al desarrollo y validación de métodos alternativos (38).

Se han propuesto varios tipos de métodos alternativos para valorar la posible corrosión e irritación dérmica, entre ellos los métodos in vitro. De hecho, la Guía 404 de la OCDE para la evaluación de la corrosión/irritación dérmica, propone la aplicación de una estrategia secuencial razonable, que combina datos experimentales derivados de un amplio rango de métodos alternativos (técnicas fisicoquímicas, estudios SAR, test in vitro, etc.) y ensayos en animales (Figura 6). Según esta estrategia, los ensayos en animales deben ser llevados a cabo sólo si son necesarios. De este modo se aporta la vía más efectiva para intentar predecir la toxicidad, y al mismo tiempo se reduce el número de animales de laboratorio usados en los estudios (39).

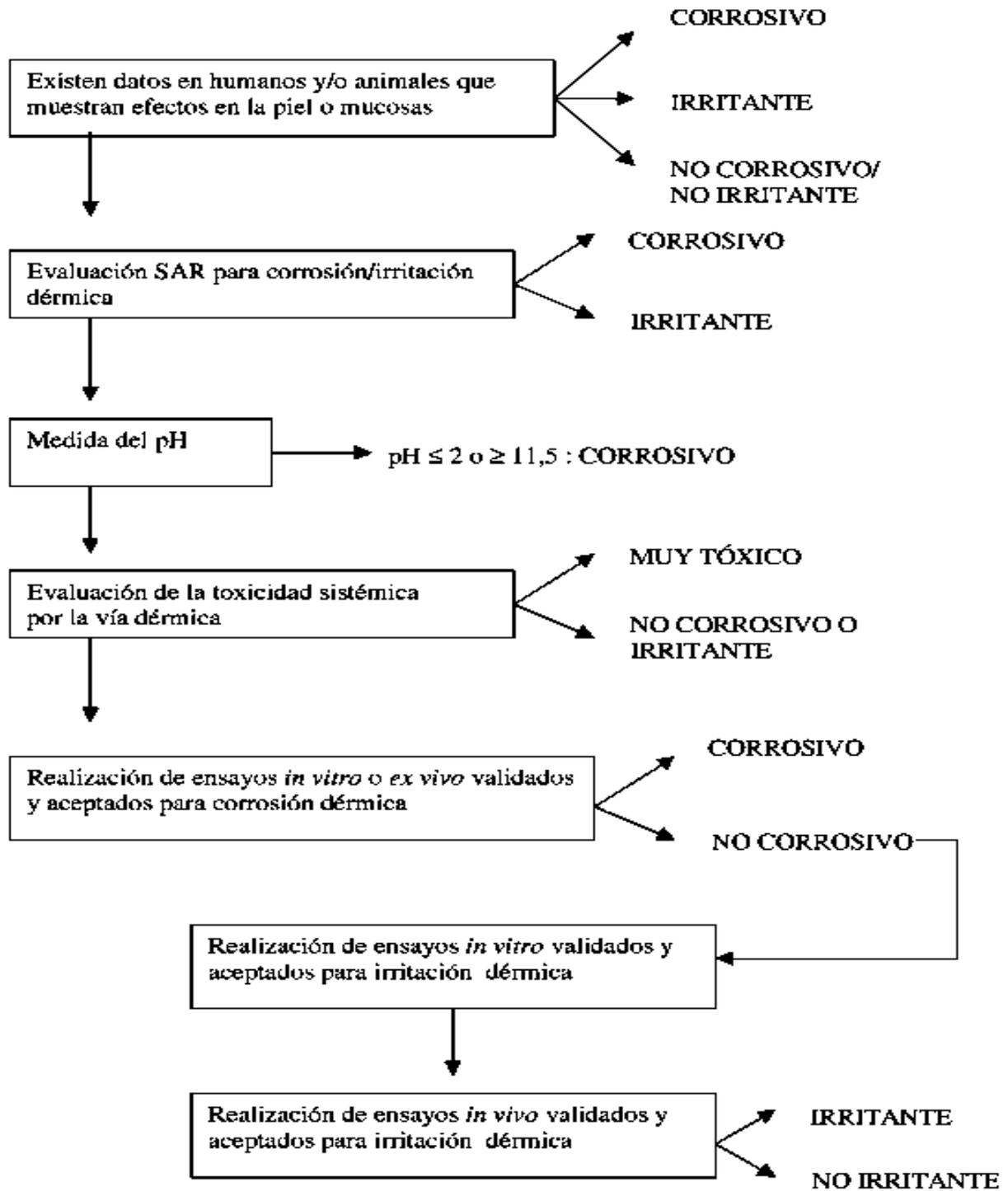


Figura 6. Diagrama de flujo general para un proceso de evaluación del riesgo en la irritación/corrosión dérmica (Guía 404 OCDE) (39).

2.4 El género *Quercus* en México

En México, los encinos (*Quercus sp*) constituyen la segunda especie forestal más importante después de los pinos, generalizándose en consecuencia múltiples desechos de su exploración forestal, incluyendo las cortezas. La estimación más reciente reconoce 161 especies en el país, de las cuales 81 pertenecen a la sección *Quercus* L. (encinos blancos), 76 a *Lobatae* (encinos rojos) y cuatro a *Protobalanus* (encinos intermedios); del total de especies, 109 son endémicas. La elevada riqueza de especies de *Quercus* presentes en México lo ubica como el segundo centro de diversificación del género en el mundo (40,41). Los estados con mayor diversidad de especies son Oaxaca, Nuevo León, Jalisco, Chihuahua y Veracruz. Las especies con distribución más amplia en nuestro país son *Q. candicans*, *Q. castanea*, *Q. crassifolia*, *Q. laeta*, *Q. microphylla*, *Q. obtusata* y *Q. rugosa*. Altitudinalmente las especies de *Quercus* se desarrollan entre 0 y 3,500 m, pero son más frecuentes entre 1,000 y 3,000 m (42).

Los encinos representan uno de los componentes florísticos notables en diversas comunidades templadas y tropicales del país. Los estudios que han abordado el uso de los encinos en México resaltan su uso maderable debido a sus propiedades físicas, mecánicas y anatómicas. Estos atributos hacen de la madera un recurso adecuado para la elaboración de recipientes culinarios, pisos, postes, durmientes, chapa, embarcaciones, muebles, mangos para herramientas y partes de instrumentos musicales, entre otros. A nivel nacional, la madera de encino ocupa el segundo lugar de aprovechamiento y los usos a los que se destina principalmente son: celulosa (54 %), escuadría (30 %), leña (7 %) y carbón (6 %). Si bien el uso maderable y los derivados de los encinos son ampliamente reconocidos, a diferencia de su utilidad no maderable o no leñosa ha sido poco valorada, no obstante que en diversas comunidades étnicas y mestizas del país la obtención y elaboración de diversos productos medicinales o alimenticios forman parte de su cultura. Este hecho se constata al encontrar registro del uso de los encinos con fines medicinales en el Códice de la Cruz-Badiano (7).

Desde el punto de vista taxonómico, *Quercus* es considerado como un género complicado para identificar, debido a su gran variedad morfológica, a la capacidad de

formar híbridos y a que sus estructuras reproductivas no se han estudiado (Figura 7) (43).



Figura 7. Genero *Quercus* (8).

2.4.1 Reportes etnomedicinales relacionados con plantas pertenecientes al género *Quercus*

En los usos no leñosos de los encinos en México destacan algunas especies como *Q. crassifolia*, que se utiliza como medicina y alimento, *Q. rugosa*, que es un recurso medicinal, alimenticio y de forraje, y *Q. affinis*, que se aprovecha como medicina, alimento, forraje y artesanía.

Para el uso medicinal se emplean casi todos los órganos de la planta: corteza, hojas, flores, raíces y agallas. Se registraron 31 enfermedades relacionadas con los diferentes aparatos y sistemas del cuerpo humano (Tabla 5), de las cuales las relacionadas con el aparato digestivo y la piel son las que utilizan el mayor número de especies y cuyas recetas incluyen principalmente el uso de la corteza y hojas (7).

Tabla 5. Padecimientos o enfermedades tratadas con *Quercus* (7).

Aparato o sistema	Padecimiento
Aparato bucal	Inflamación y sangrado de encías, dolor de garganta y de muelas, dientes flojos, estomatitis, hematitis, úlceras bucales, gingivitis.

Aparato digestivo	Gastritis, dolor de estómago, diarrea, disentería, hemorragias intestinales, cáncer de estómago e intestinos, inflamación intestinal, acedías.
Piel	Heridas, granos, quemaduras, llagas, infección de la piel, caída de cabello.
Aparato reproductor	Lavados vaginales, hemorragias vaginales, desviación de la matriz, baño posparto, enfriamiento después del parto, concepción, alteraciones ginecobstétricas.
Aparato circulatorio	Corazón, circulación de la sangre.
Aparato urinario	Mal de orín, para el dolor al orinar.
Aparato respiratorio	Pulmones y tos.
Aparato nervioso	Excitación nerviosa, contra los ataques.
Sistema muscular	Dolor muscular.
Otros	Diabetes, hemorragias.

2.4.2 Actividad farmacológica y toxicológica de extractos de *Quercus crassifolia*

Investigaciones previas realizadas en nuestro equipo de investigación han demostrado que los extractos de cortezas de *Q. crassifolia*, poseen propiedades antioxidantes para captar especies reactivas de oxígeno y nitrógeno relevantes en múltiples enfermedades. La Figura 8 muestra un resumen de estas investigaciones encaminadas a demostrar la bioactividad y seguridad de extractos de esta especie.

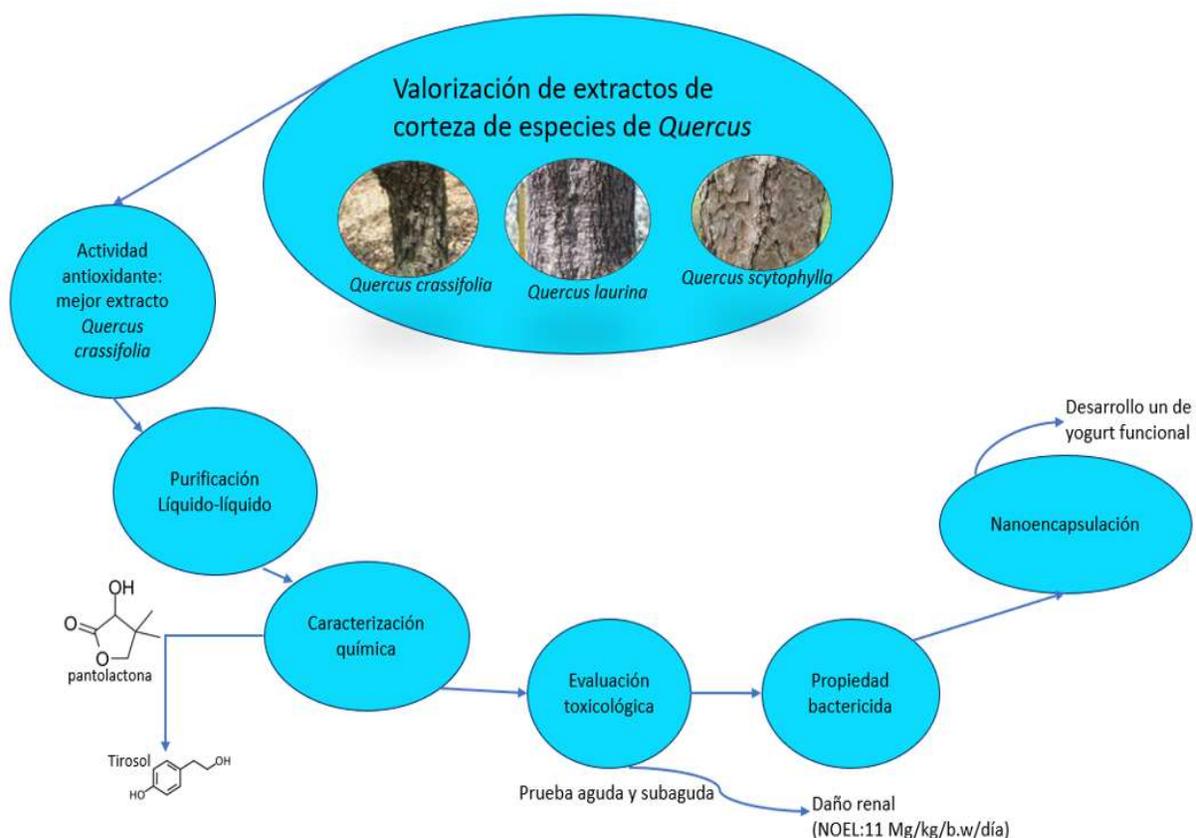


Figura 8: Estrategia de valorización de los extractos de cortezas de *Q. crassifolia* emprendidos por nuestro equipo de investigación.

Para ello, se determinó y comparó el potencial antioxidante de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de cortezas de diferentes especies mexicanas pertenecientes al género *Quercus* (*Q. crassifolia*, *Q. laurina*, *Q. scytophylla*). Además, dichos extractos se caracterizaron en términos de su contenido en fenoles totales, flavonoides, ácidos hidroxycinámicos y proantocianidinas. La capacidad antioxidante estuvo determinada por la capacidad de capturar radicales y especies oxidantes de relevancia biológica

como hidroxilo (OH•), superóxido (O₂•⁻), peróxido (ROO•), H₂O₂, óxido nítrico (NO•) y ácido hipocloroso (HClO) y los resultados se compararon con los de Oligopin®, un extracto antioxidante comercial de la corteza de *Pinus marítima* (8).

Entre los extractos probados, el extracto de agua caliente de *Q. crassifolia* fue considerado como el extracto más prometedor debido a su alto rendimiento de extracción (20,0 % p/p de corteza seca), contenido total de fenoles (746 mg EAG/g) contenido de flavonoides (25,4 % p/p). mg EQ/g), y capacidad de captura de aniones superóxido y radical hidroxilo (CE50=80,5 y 918 µg/mL, respectivamente). En consecuencia, se purificó con acetato de etilo por extracción líquido-líquido para concentrar la mezcla de polifenoles. Este extracto purificado (QCe) mostró, en general, mejores características antioxidantes que Oligopin®, siendo un buen candidato para desarrollar nuevos alimentos funcionales con alta actividad antioxidante (8). Considerando que el mercado de yogurt en México está creciendo rápidamente, se consideró desarrollar un nuevo yogurt funcional conteniendo el QCe. El yogurt es un producto lácteo fermentado semisólido en el que la actividad de una mezcla simbiótica de cultivos de *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* es muy importante (9).

El uso combinado de extractos polifenólicos como el de *Quercus crassifolia* con estas bacterias probióticas podría mejorar los efectos nutricionales en comparación con el yogurt tradicional, incluida la promoción de la salud y la prevención de enfermedades. Aunque la inclusión de QCe en un yogurt funcional es una estrategia interesante, también se examinaron las desventajas de esta metodología. Se identificaron dos desventajas principales: 1) los polifenoles tienen acción antibacteriana, lo que podría afectar la viabilidad de las bacterias probióticas durante la vida útil de yogurt, y 2) su uso regular podría generar efectos tóxicos, considerando que las cortezas de *Quercus crassifolia* no son utilizadas como alimento por la población (9)

En consecuencia, se realizó una investigación para estudiar las propiedades antibacterianas del QCe sobre bacterias utilizadas en la producción de yogurt (*S. thermophilus* y *L. bulgaricus*) y sobre una bacteria patógena (*Escherichia coli*). Además, se determinó su toxicidad aguda y subaguda in vivo en ratas Wistar siguiendo las directrices de la ODCE 423 y 407 respectivamente. El QCe mostró efectos

bacteriostáticos sobre bacterias probióticas fue significativamente menor que el mostrado por los antibióticos gentamicina y ciprofloxacina. Curiosamente, cuando el extracto se expuso a *E. coli* (500 y 750 µg/mL) provocó una inhibición sobre el crecimiento de esta bacteria significativamente mayor que el de la ciprofloxacina (9). En cuanto a la evaluación toxicológica aguda de este extracto, los resultados mostraron que la administración oral de QCe provocó daño renal y cerebral en ratas Wistar a partir de 300 mg/kg p.v. (44).

En una investigación posterior, se evaluó el impacto de su administración oral repetida durante 28 días a dosis más bajas (9). Se observó daño renal caracterizado por hiperplasia endotelial en la corteza y en la médula con 33 y 100 mg/kg pc/día. En consecuencia, se consideró que el nivel subagudo con el mínimo efecto adverso observado (LOAEL) para el daño renal fue de 33 mg/Kg p.v./día (9). El perfil GC-MS de este extracto mostró la presencia de una alta proporción de compuestos fenólicos (205 de todos los compuestos identificados). Las moléculas predominantes fueron la pantolactona, estrechamente relacionada con el ácido pantoténico y la ramnosa, y el 4-hidroxi-bencenoetanol, también conocido como tirosol, un compuesto descrito en el vino y el aceite de oliva (Figura 9) (44).

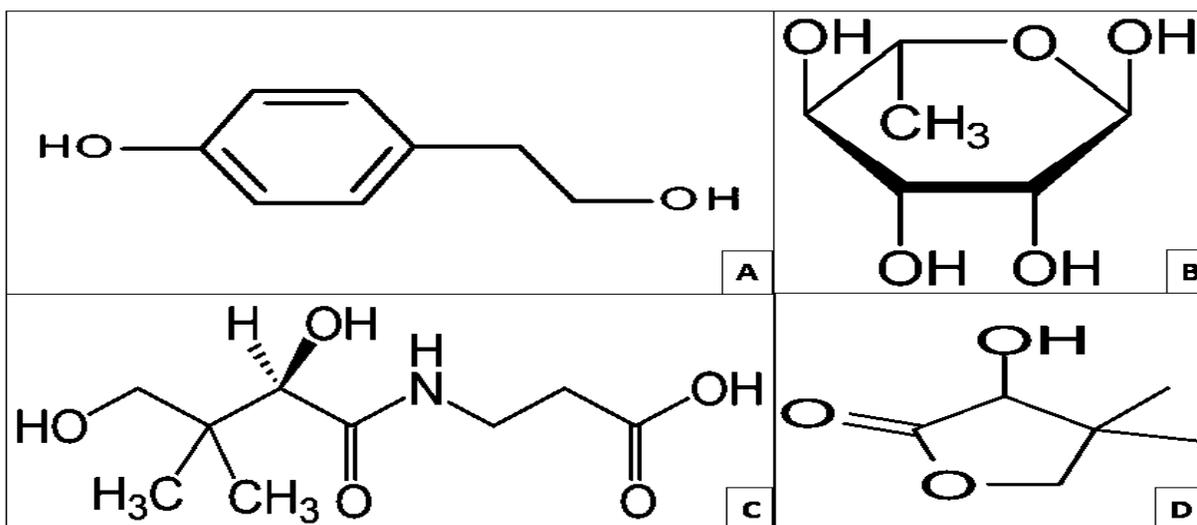


Figura 9: Compuestos identificados en *Q. crassifolia*, a) 4-hidroxi-bencenoetanol, b) ramnosa, c) ácido pantoténico, d) pantolactona.

El extracto purificado de *Q. crassifolia* se nanoencapsuló para mejorar su biodisponibilidad, mejorar su solubilidad, tránsito digestivo y enmascarar su sabor dentro del yogurt funcional (44).

Posteriormente, se realizó una evaluación funcional del yogurt que contenía estas nanocápsulas (24,5%), utilizando un modelo de hámsters en los que se indujo dislipemia mediante una dieta rica en colesterol y aceite de coco. Los resultados mostraron que el yogurt funcional condujo a una disminución de la concentración plasmática de colesterol y triglicéridos. Esto sugirió que el uso de alimentos funcionales enriquecidos con QCe podría ser beneficioso para contrarrestar los efectos nocivos de las dietas ricas en grasas, previniendo así las complicaciones asociadas con la dislipidemia (44).

Aunque los estudios toxicológicos previos muestran que el extracto de *Quercus crassifolia* pudiera utilizarse en concentraciones inferiores a 11 mg/kg por vía oral, a dosis superiores causa daño renal y cerebral, lo que podría limitar su uso por esta vía de administración en forma crónica para la psoriasis, sobre todo en caso de intoxicación o sobredosis. Considerando que la capa córnea de la piel ofrece una barrera al paso de los xenobióticos hacia la circulación sistémica, es probable que el empleo de este extracto por esta vía de administración sea más aconsejable para tratar la psoriasis que la vía oral. Sin embargo, para establecer su uso, debe aún conocerse el impacto de la toxicidad de este extracto por vía tópica.

3. JUSTIFICACIÓN

Investigaciones previas realizadas por nuestro equipo de investigación han demostrado que el extracto de cortezas de *Quercus crassifolia*, un encino mexicano, es rico en compuesto fenólicos antioxidantes, particularmente en tirosol. Este encino ha sido utilizado por la medicina tradicional mexicana para tratar padecimientos cutáneos. Considerando su uso etnofarmacológico, su importancia como recurso forestal en México, así como el hecho de que su explotación genera una cantidad elevada de residuos en forma de cortezas, la presente investigación propone el aprovechamiento de un extracto de cortezas de *Q. crassifolia* para el desarrollo potencial de un nuevo producto orientado a tratar la psoriasis, una enfermedad dermatológica incurable que afecta a 3 millones de mexicanos. Para ello, se propone el estudio dicho extracto sobre la producción de IL-8 en células cutáneas (queratinocitos) estimulados por IL-17, una diana farmacológica involucrada en la patogénesis de la enfermedad. Dado que la toxicidad de este extracto por vía tópica es desconocida, se evalúa su toxicidad aguda dérmica en aras de conocer el perfil de seguridad de este extracto por esta vía de administración.

4. HIPÓTESIS

El extracto purificado de cortezas de *Quercus crassifolia* posee una actividad antiinflamatoria anti-IL17 en queratinocitos epidérmicos y presenta baja toxicidad dérmica en administración aguda en ratas Wistar.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Evaluar el potencial antiinflamatorio anti-IL17 *in vitro* de un extracto de cortezas de *Quercus crassifolia* y determinar su toxicidad aguda dérmica *in vivo* en ratas Wistar.

5.2 Objetivos específicos

- Evaluar la acción antiinflamatoria del extracto sobre la producción de IL-8 en queratinocitos epidérmicos estimulados por IL-17.
- Evaluar la influencia del extracto sobre la evolución del peso corporal y el consumo de alimentos de ratas Wistar después de su exposición aguda por vía tópica.
- Evaluar el impacto de la administración dérmica aguda sobre parámetros hematológicos y bioquímicos en el modelo animal.
- Determinar la influencia del extracto sobre el peso relativo de los órganos y su histología.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Colecta e identificación botánica de *Quercus crassifolia*.

La colecta fue realizada en una plantación forestal en Ciudad Hidalgo, Michoacán, México, donde se obtuvieron muestras de la corteza de encino (*Quercus crassifolia*), así como hojas y ramas de este para su identificación botánica, la que fue realizada en el Instituto de Ecología, Centro Regional del Bajío (INECOL) por el Dr. Emmanuel Pérez Calix. La corteza fue lavada y fraccionada en trozos de 5x5cm, colocada en hornos a 40 °C durante 48 h para su secado; posteriormente se pulverizó en un molino de bolas y tamizadas con malla #40 (tamaño de partícula <0.4mm). El polvo de corteza fue almacenado en bolsas negras a temperatura ambiente con el fin de protegerlo de la luz y preservar su integridad.

6.2 Obtención del extracto purificado

La obtención del extracto purificado se realizó en dos etapas que consistieron en obtener primeramente el extracto crudo y posteriormente la fracción purificada. Durante la primera etapa, se pesaron 50 g de polvo de corteza y se realizó la extracción con 500 mL de agua caliente (90 °C) con reflujo durante 1 h. Los sólidos resultantes se separaron por filtración con papel filtro Whatman No. 42, y se lavaron con 500 mL de agua caliente. La fase acuosa correspondiente al extracto crudo fue posteriormente liofilizada y almacenada en frascos ámbar a 4 °C. Para la obtención del extracto purificado, se suspendieron 6 gramos de extracto crudo liofilizado en 100 mL de agua, la solución se filtró con un crisol Gooch (Pyrex 40-60 µm) y fue desengrasada con hexano (5 x 100 mL), la fracción acuosa recuperada fue concentrada ulteriormente con acetato de etilo (5 x 100 mL). Esta fracción purificada se concentró en un rotavapor con sistema al vacío, a 55°C. El extracto así concentrado se suspendió en agua y se liofilizó. El polvo resultante, correspondiente al extracto purificado de *Quercus crassifolia* se utilizó para el resto de los experimentos llevados a cabo en esta investigación.

6.3 Evaluación de la actividad anti-IL17 en queratinocitos HaCaT

La línea celular de queratinocitos humanos HaCaT se adquirió de AddexBio y se cultivó en DMEM utilizando un alto contenido de glucosa con piruvato de sodio (Sigma Aldrich) y se complementó con 100 U/mL de penicilina (Sigma Aldrich), 100 µg/mL de estreptomina (Sigma Aldrich) y 10 % de suero fetal bovino (Thermo Fisher Scientific) en una incubadora humidificada que contiene 5 % de CO₂ a 37 °C. Posteriormente, las células HaCaT se sembraron en placas de 24 pocillos y se cultivaron en las condiciones antes mencionadas hasta el 80 % de confluencia. En ese momento, se sincronizaron por privación de suero durante 12 h. Pasado este tiempo, las células fueron pretratadas o no durante 10 h con dexametasona (Dex, 5 µM, Sigma Aldrich), y el extracto purificado (25, 50, 100 µg/mL). Posteriormente, se añadió IL-17 (50 ng/mL, Thermo Fisher Scientific) a los cultivos celulares durante 14 h para inducir la producción de IL-8. Las cantidades de IL-8 en los sobrenadantes de IL-17 HaCaT se midieron con el kit Human IL-8/CXCL8 DuoSet ELISA (R&D Systems) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El límite de detección para la producción de IL-8 fue de 30 pg/mL.

6.4 Evaluación de la toxicidad dérmica aguda en ratas Wistar

La toxicidad dérmica aguda del extracto purificado de corteza de *Quercus crassifolia* (EPQC), se determinó según el método de clases de toxicidad propuesto por la OECD en la guía 423 (45).

6.4.1 Especie animal

Se emplearon ratas hembra albinas de la cepa Wistar con un peso de 165 a 215 g (6 y 7 semanas de nacidas) provistas por el bioterio del Instituto de Neurobiología de la UNAM, campus Juriquilla, Querétaro. A su llegada al Laboratorio de Farmacognosia y Farmacología experimental, Facultad de QFB de la UMSNH, se dejaron 7 días de aclimatación en el bioterio bajo las siguientes condiciones: 22±3 °C, humedad 70%, luz artificial con períodos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad, alimento

y agua *ad libitum*. Antes de iniciar los experimentos, los animales se asignaron de manera aleatoria al grupo control (C1) o a los grupos de estudio (G1, G2) (n=4 animales por grupo).

6.4.2 Selección de las dosis, vía de administración y procedimiento experimental

El extracto purificado de *Q. crassifolia* (EPQC) fue administrado a 200 y 2000 mg/kg p.c en dosis única por vía dérmica. Para ello, las ratas se anestesiaron con clorhidrato de ketamina [No. Q-0449-265], (20 mg/Kg, i.p.) y clorhidrato de xilacina [No. Q-7833-099], (10 mg/Kg, i.p.); mientras que al grupo control se le administró agua destilada. Al séptimo día, las ratas se pesaron y se les administró una dosis única del EPQC en concentración de 200 mg/kg (grupo G1) y 2000 mg/kg (G2) cuidando de no exceder 1 mL/100 g de peso del animal.

El día catorce después de la administración, los grupos experimentales se mantuvieron en ayuno durante 12 h y se procedió al sacrificio de las ratas Wistar con una sobredosis de Pentobarbital [No. Q-0449-124] de uso veterinario. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardíaca para las determinaciones bioquímicas y hematológicas. Además, se extrajeron los órganos quienes fueron utilizados para el análisis macroscópico e histopatológico.

6.4.3 Período de observación

En aras de registrar la evolución del peso corporal, las ratas fueron pesadas a los 0, 7 y 14 después de la administración. El día de la administración tópica del EPQC todos los grupos se mantuvieron en observación constante durante la primera media hora, cada media hora las primeras 4 horas y cada hora durante las siguientes 24 h. Posteriormente, se observaron una vez al día durante 13 días siguientes para determinar muerte o presencia de signos de toxicidad.

6.4.4 Determinación de signos y síntomas de toxicidad

Los signos de toxicidad evaluados fueron los siguientes; aspecto físico (posiciones extrañas, piloerección, posición de la cola, orejas, lagrimeo, excretas), comportamiento (consumo de agua y alimento, actividad/inactividad, comportamiento exploratorio, agresividad, sedación), exámenes físicos (temblores musculares, convulsiones, parálisis, alteraciones de los reflejos, tamaño de pupila, opacidad corneal, lesiones en la piel) (46).

6.4.5 Análisis macroscópico

Para el análisis macroscópico se extrajeron y se pesaron los siguientes órganos: corazón, pulmones, hígado, riñones, cerebro-encéfalo y piel, los cuales fueron depositados para su conservación en solución de formaldehído, tamponada a un pH de 7.0. El peso relativo de cada órgano se calculó sobre la base de lo siguiente: peso relativo del órgano (%) = peso del órgano/peso corporal en el sacrificio x 100 (47).

6.4.6 Análisis histopatológico

Para el análisis histopatológico, se deshidrataron los órganos antes mencionados en concentraciones de alcoholes ascendentes. Además, se aclararon con un líquido diafanizador (xilol) HYCEL [CAS:1330-20-7] al 10%, dándole un aspecto translúcido a la muestra, brindándole la solubilidad que requiere para su posterior inclusión en parafina Paraplast Leica®. Los cortes histopatológicos se realizaron en el Laboratorio Patología de la Facultad de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo con un micrótopo de rotación RM2125 Leica Microsystems Nussloch GmbH, se realizaron cortes a 3 µm a excepción de la piel los cortes fueron a 7 µm, se montaron a una laminilla para su posterior tinción con la técnica de hematoxilina-eosina.

6.4.7 Determinaciones hematológicas y bioquímicas

Las muestras de sangre obtenidas por punción cardíaca se utilizaron para realizar determinaciones bioquímicas (glucosa, creatinina, urea, bilirrubina total,

alanina amino-transferasa, aspartato amino transferasa y gamma glutaril-transferasa) y hematológicas (leucocitos totales, linfocitos, neutrófilos en banda, segmentados, monocitos, eosinófilos, basófilos, glóbulos rojos, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio, volumen corpuscular medio de la hemoglobina, concentración de hemoglobina corpuscular media, amplitud de distribución de glóbulos rojos, conteo de plaquetas, volumen corpuscular medio de las plaquetas). Los análisis fueron realizados por el laboratorio EDULAB, situado en la Ciudad de Morelia, Michoacán.

6.4.8 Análisis estadístico

Para llevar a cabo los análisis de datos, se emplearon los softwares de análisis estadístico JMP 6, GraphPad Prism 8 y XLSTAT 2018.5 de Addinsoft. Las determinaciones fueron realizadas por triplicado y expresadas como la media \pm la desviación estándar. Se analizaron las variables mediante las pruebas de Shapiro-Wilk y Levene. Los resultados fueron analizados con un análisis de varianza (ANOVA) ($p < 0.05$) seguida de una prueba post hoc de Tukey y/o Dunnett.

7. RESULTADOS

7.1 Identificación botánica y obtención del extracto crudo y purificado de *Quercus crassifolia*

La corteza colectada correspondió a *Quercus crassifolia* Bonpl. (Fagaceae), obteniéndose un rendimiento de extracción del extracto crudo del 21.03% con relación a la corteza seca, mientras que el porcentaje de rendimiento del extracto purificado fue del 2.70 % (10).

7.2 Evaluación de la actividad anti-IL17 en queratinocitos HaCaT

La Figura 10 muestra la influencia del extracto de *Quercus crassifolia* en la producción de IL-8 en queratinocitos estimulados con IL-17. Es posible apreciar que a todas las concentraciones probadas (25, 50 y 100 µg/mL) el extracto fue capaz de inhibir significativamente la producción de IL-8 comparativamente a los queratinocitos que solamente recibieron IL-17 y esta disminución fue mayor que la de los queratinocitos control, que no fueron estimulados con IL-17, a concentraciones de 25 y 50 µg/mL. La dexametasona por su parte mostró la mayor actividad inhibitoria sobre la producción de IL-8 en este modelo *in vitro*.

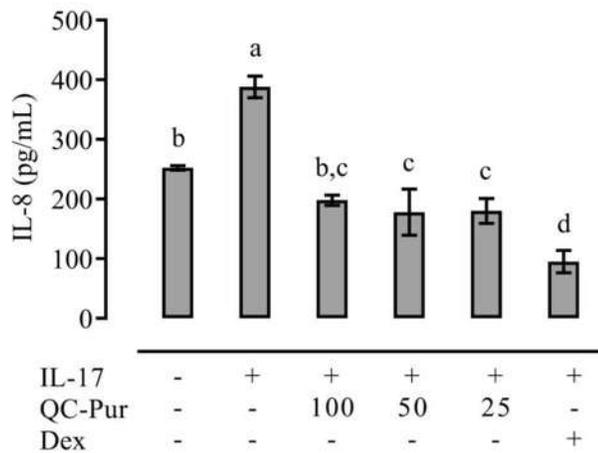


Figura 10. Impacto del extracto purificado de *Quercus crassifolia* sobre la producción de IL-8 en queratinocitos HaCaT estimulados con IL-17.

Extracto purificado (QC-Pur; 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$); IL-17 (50 ng/ml); Dexametasona (DEX, 5 μM)

7.3 Estudio de toxicidad dérmica

La administración del extracto purificado del *Quercus crassifolia* no generó ningún signo o síntoma de toxicidad al grupo control y a los grupos de estudio, sobreviviendo todas las ratas al experimento a los diferentes niveles de dosis administrados.

7.3.1 Consumo de alimento y peso de ratas

Entre los parámetros críticos para la evaluación toxicológica son los cambios en el peso corporal, el comportamiento y la ingesta de alimentos. En la Figura 11 se muestra la evolución del peso de las ratas de los grupos experimentales y del grupo control. En todos los grupos experimentales se observó un incremento en el peso corporal al séptimo día después de la administración, al día 14 el incremento continuó en los grupos experimentales, en tanto que en el grupo control el peso corporal mostró una tendencia ascendente.

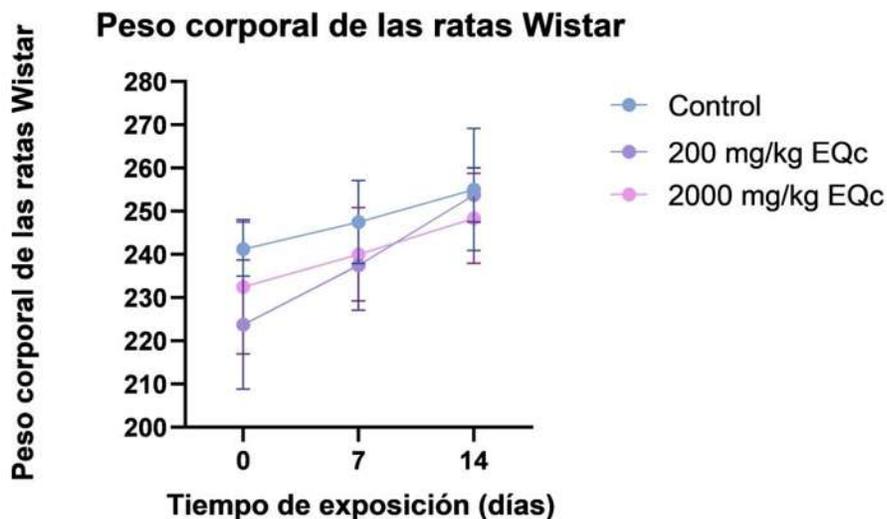


Figura 11. Evolución del peso corporal de los grupos experimentales y el grupo control después de la administración dérmica de dosis única del extracto purificado del *Quercus crassifolia*. Los valores son expresados como media \pm DE. *Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba Tukey post hoc, $p < 0.05$).

En la Figura 12 se observa la cantidad de alimento consumido por las ratas control y los grupos experimentales. No hubo diferencias significativas ($p < 0.05$) en comparación al grupo control y los grupos que se les administró el extracto de EQc.

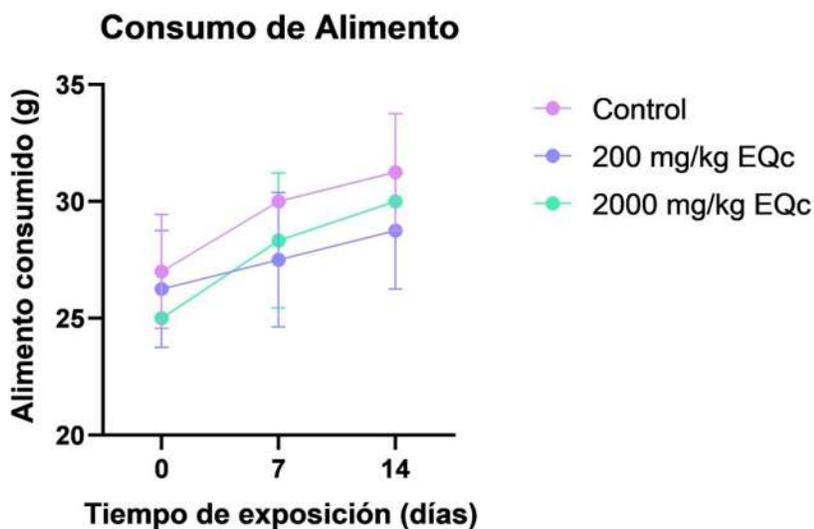


Figura 12. Cantidad de alimento consumido por las ratas Wistar utilizadas para la prueba de toxicidad dérmica. Los valores son expresados como Media \pm DE. *Diferencias significativas estadísticamente comparadas con ANOVA y Prueba Tukey post hoc, $p < 0.05$).

7.3.2 Signos de toxicidad

La Figura 13 muestra la piel de los animales en los tres grupos experimentales, 24 h después de la administración del extracto purificado del *Quercus crassifolia*. No se presentaron signos ni síntomas de toxicidad relativos al comportamiento durante el periodo de tratamiento de los grupos experimentales con respecto al de control. En cuanto a la piel, se puede observar la presencia de dermatitis dependiente de la dosis caracterizada por el eritema y vesiculación, que desapareció después de 72 horas de la administración tópica.

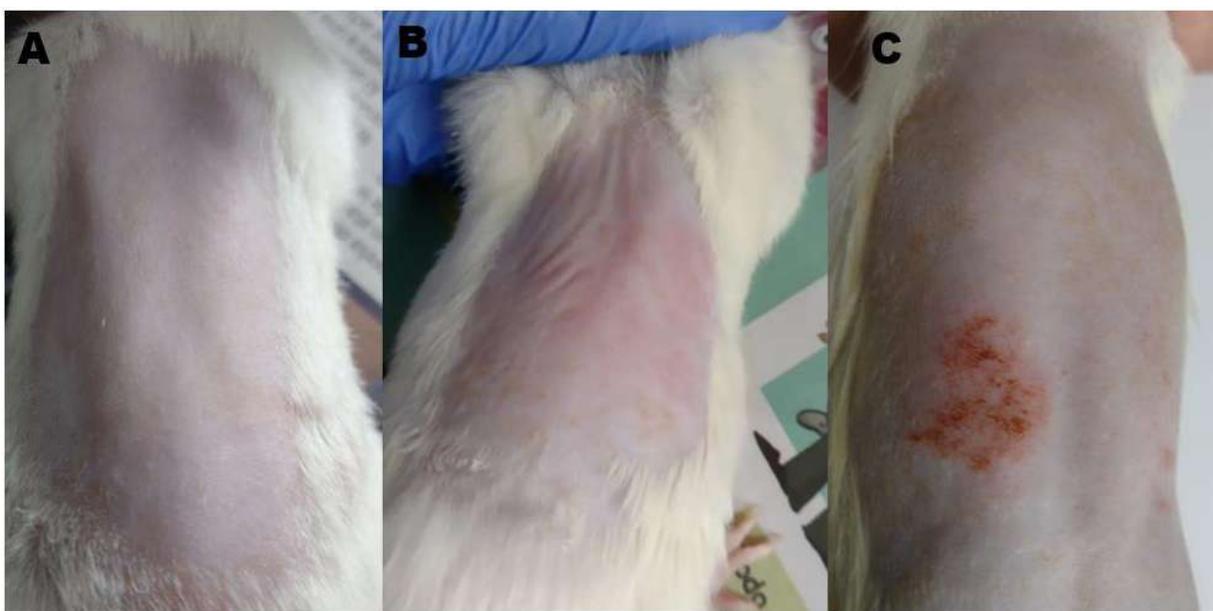


Figura 13: Apariencia de la piel en las ratas Wistar tratadas con el extracto purificado del *Quercus crassifolia* 24 h después de la administración. Control (A), 200 mg/kg (B), 2000 mg/kg (C).

7.3.3 Análisis macroscópico

En el análisis macroscópico de los órganos no se observaron cambios morfológicos visibles en cuanto al color y alteraciones de la posición del cerebro-encéfalo, timo, pulmones, estómago, hígado, bazo, corazón, páncreas y riñón de los grupos experimentales en relación al control. En la Tabla 6 se observan los pesos relativos de los órganos de las ratas del grupo control con relación a los grupos experimentales, no se registraron diferencias significativas en lo relativo al peso de los

órganos que pudiera indicar que el extracto purificado de *Quercus crassifolia* causa un efecto tóxico significativo sobre estos órganos.

Tabla 6: Peso relativo de los órganos de ratas Wistar grupo control, G1 y G2, tratadas con extracto purificado *Quercus crassifolia* por vía dérmica.

ÓRGANOS	GRUPO CONTROL (C) (H ₂ O)	DOSIS (G1) (200mg/kg)	DOSIS (G2) (2000mg/kg)
Hígado (g)	3.95±0.73 ^a	3.47±0.39 ^a	3.81±0.24 ^a
Páncreas (g)	0.37±0.02 ^a	0.43±0.09 ^a	0.34±0.04 ^a
Pulmón derecho (g)	0.32±0.05 ^a	0.32±0.03 ^a	0.43±0.08 ^a
Pulmón izquierdo(g)	0.26±0.01 ^a	0.23±0.04 ^a	0.25±0.04 ^a
Riñón derecho	0.43±0.03 ^a	0.45±0.01 ^a	0.47±0.05 ^a
Riñón izquierdo (g)	0.41±0.03 ^a	0.23±0.04 ^a	0.45±0.04 ^a
Bazo(g)	0.30±0.04 ^a	0.34±0.04 ^a	0.33±0.07 ^a
Corazón (g)	0.36±0.02 ^a	0.38±0.03 ^a	0.43±0.03 ^a
Estomago (g)	0.66±0.03 ^a	0.64±0.08 ^a	0.70±0.15 ^a
Intestino delgado	44.90±10.08 ^a	42.98±11.79 ^a	36.82±8.59 ^a
Intestino grueso	18.53±7.08 ^a	20.51±7.61 ^a	25.20±3.55 ^a
Cerebro y Cerebelo (g)	0.76±0.03 ^a	0.83±0.07 ^a	0.83±0.04 ^a
Timo (g)	0.17±0.02 ^a	0.17±0.03 ^a	0.20±0.02 ^a

Los valores son expresados como media ± DE. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control. (ANOVA de una vía con prueba de Tukey y Dunnett post hoc, p<0.05).

7.3.4 Análisis histopatológico

En el análisis histopatológico realizado no se observaron alteraciones microscópicas en el hígado, páncreas, pulmones, bazo, corazón, estómago, cerebro-cerebelo y timo, no evidenció diferencias entre los grupos experimentales con relación del grupo control. Sin embargo, pudo evidenciarse daño a nivel del riñón y piel. Los datos más significativos serán explicados a continuación.

7.3.4.2 Características del daño a nivel cutáneo inducido por el extracto

La Figura 14 muestra la histopatología correspondiente a los hallazgos generales en la piel en todos los grupos experimentales administrados por vía dérmica con el extracto purificado de *Quercus crassifolia*. El grupo control presentó una epidermis fina con epitelio plano estratificado queratinizado y una dermis formada por tejido conectivo laxo, fibroso, denso e irregular, con vasos sanguíneos. La dermis y la epidermis se observan estrechamente unidas. El colágeno presentó una morfología de fibras compactas formando una red con escasos leucocitos polimorfonucleares, fibroblastos y macrófagos. En los grupos tratados con *Quercus crassifolia* a 200 mg/kg se observó en algunas zonas de la epidermis el epitelio plano estratificado queratinizado con hiperplasia y desprendimiento desorganizado de la queratina y en algunas otras zonas de la dermis presentó disminución del número y tamaño de las células. También se observó escasos fibroblastos y macrófagos. En el grupo experimental de 2000 mg/kg se evidenció la presencia de una epidermis con ruptura del epitelio plano estratificado queratinizado con queratinocitos necróticos y pérdida de la diferenciación celular, así como, disminución en número y tamaño de las células. La dermis presenta una zona con edema entre las fibras de colágeno, folículos pilosos necróticos y escasos fibroblastos. Además, se observó un infiltrado inflamatorio perivascular, leucocitos polimorfonucleares y macrófagos, característica principal de inflamación aguda.

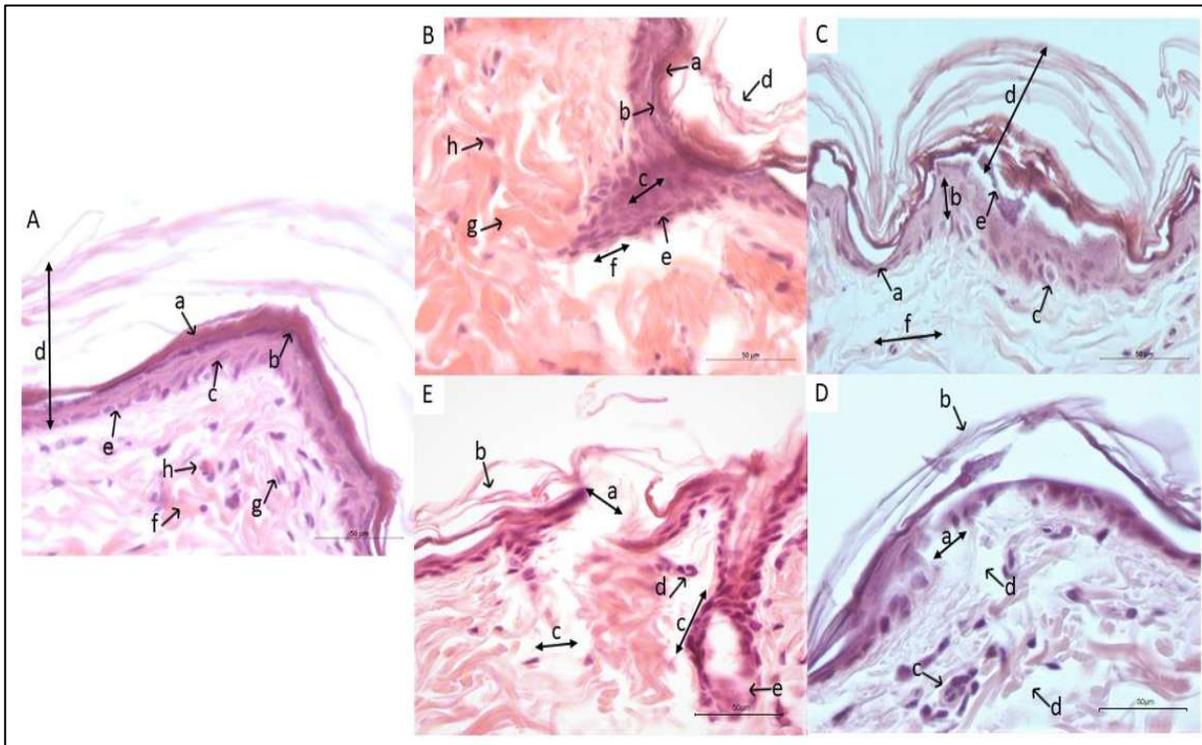


Figura 14. Análisis histopatológico a nivel de la piel después de la administración dérmica del extracto de *Quercus crassifolia*.

A) grupo control; a: queratina, b: estrato granuloso, c: estrato espinoso, d: epidermis, e: estrato basal, g: fibroblastos, f: tejido conectivo denso irregular, h: vaso sanguíneo. **B)** grupo de 200 mg/kg; a: estrato corneo, b: estrato granuloso, c: hiperplasia del epitelio plano estratificado, d: desprendimiento de queratina, e: estrato basal, f: edema de tejido conjuntivo, g: fibras de tejido conectivo, h: escasos fibroblastos. **C)** 200 mg/kg; a: disminución en número y tamaño de células, b: hiperplasia del epitelio plano estratificado, c: edema intercelular en la capa basal, d: rompimiento del estrato córneo, e: desprendimiento del estrato granuloso, f: escasas fibras de colágeno con escasos leucocitos polimorfonucleares. **D)** grupo de 2000 mg/kg; a: disminución en número y tamaño de células, b: desprendimiento de queratina, c: infiltrado inflamatorio perivascular por leucocitos polimorfonucleares, d: edema del tejido conectivo. **E)** 2000 mg/kg; a: ruptura del epitelio plano estratificado, b: desprendimiento de queratina, c: edema del tejido conectivo, d: escasos macrófagos, e: folículo piloso. Coloración HE, 40x.

7.3.4.1 Características del daño renal inducido por el extracto

La Figura 15 representa los daños evidenciados a nivel renal luego de la exposición por vía dérmica al extracto purificado de *Quercus crassifolia* en dosis de 200 y 2000 mg/Kg. Al evaluar los cambios histopatológicos, pudo constatar que las

ratas controles presentaron glomérulos con ovillo capilar normocelular, cápsula de Bowman intacta, aparato yuxttaglomerular y macula densa bien definida, así como un sistema tubular conservado con relación al túbulo contorneado proximal. Sin embargo, el tratamiento con el extracto de *Quercus crassifolia* generó alteraciones glomerulares en forma de dosis-dependiente.

De hecho, a la dosis de 200 mg/kg se observó entre un 7% de glomérulos con hiperplasia glomerular y un 5% y 10 % de glomérulos con atrofias, el glomérulo marcó disminución en el tamaño y número de células, además del desprendimiento de la capsula de Bowman parietal. A la dosis de 2000 mg/kg se observó entre un 5% de glomérulos con hiperplasia, así como 30% y 50% de glomérulos con atrofias. Del mismo modo, pudo constatarse el glomérulo con marcado aumento en el número de células, perdiéndose prácticamente en su totalidad el espacio urinario, además se observan microtrombos de fibrina dentro del glomérulo.

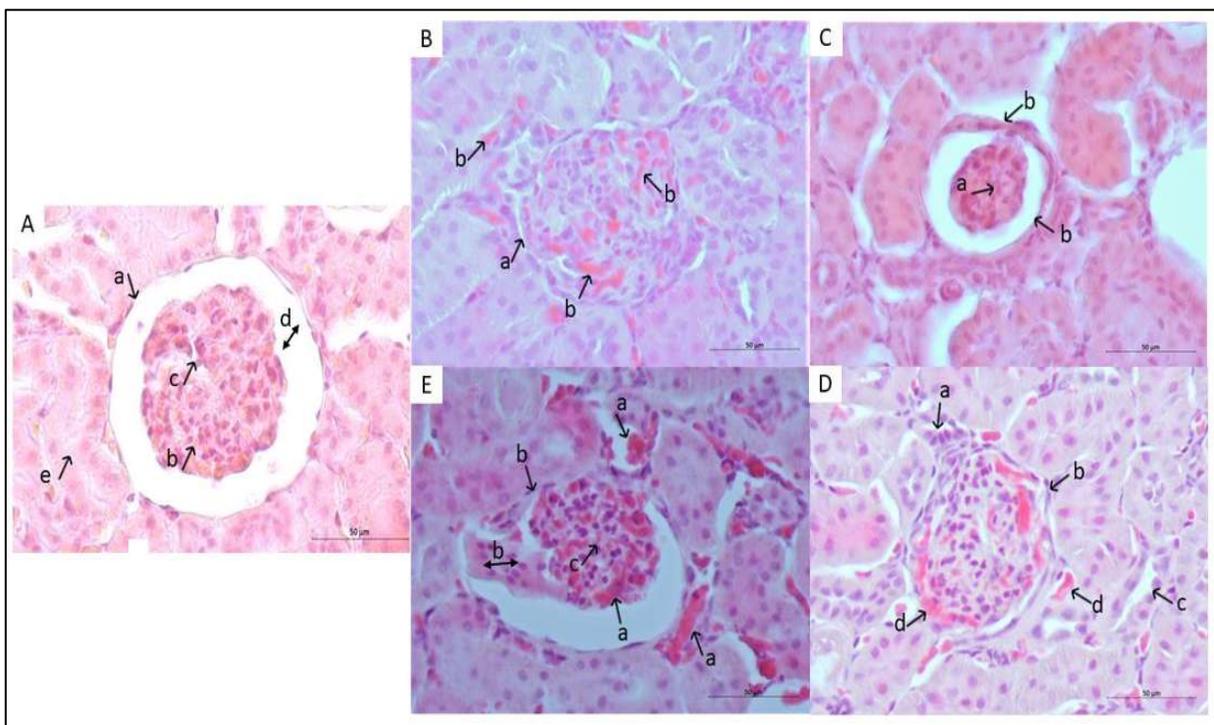


Figura 15. Análisis histopatológico a nivel renal después de la administración dérmica del extracto de *Quercus crassifolia*.

A) grupo control; a: capsula de Bowman, b: podocitos, c: capilar, d: espacio urinario, e: túbulo contorneado. B) grupo de 200 mg/kg; a: hiperplasia glomerular, b: microtrombos de fibrina. C) 200 mg/kg; a: atrofia de glomérulo: capsula de Bowman parietal desprendida del tejido. D) grupo de 2000 mg/kg; a: macula densa, b: hiperplasia glomerular, c: túbulo contorneado distal, d: microtrombos de fibrina. E) 2000 mg/kg; a: microtrombos de fibrina, b: hiperplasia y desprendimiento de las células mesangiales extraglomerulares, c: atrofia glomerular. Coloración HE, 40x.

7.3.5 Análisis hematológico

En la Tabla 7 se muestran los resultados correspondientes a la biometría hemática completa del grupo control y grupos experimentales que recibieron dosis de 200 y 2000 mg/kg

Tabla 7: Biometría hemática completa de los grupos de ratas Wistar de ensayo.

HEMOGRAMA	GRUPO CONTROL (H ₂ O)	DOSIS (G1) (200 mg/kg)	DOSIS (G2) (2000 mg/kg)
Eritrocitos (X10 ⁶ /uL)	8.16±0.06 ^a	8.02±0.08 ^a	7.86±0.62 ^a
Hemoglobina (g/dL)	16.20±0.20 ^a	16.43±0.33 ^a	16.48±1.42 ^a
Hematocrito (%)	46.10±0.75 ^a	46.43±0.91 ^a	45.13±0.80 ^a
VGM (fL)	57.73±2.22 ^a	57.60±1.66 ^a	58.88±0.51 ^a
HCM (pg)	20.30±0.79 ^a	20.50±0.67 ^a	20.98±0.17 ^a
CMHG (g/dL)	35.17±0.15 ^a	35.55±0.47 ^a	35.63±0.51 ^a
RDW (%)	11.93±0.58 ^a	11.43±0.21 ^a	11.85±0.42 ^a
Leucocitos totales (u/L)	4,083.33±1,529.23 ^a	4,253.00±1,141.50 ^a	4,266.67±1,279.31 ^a
Neutrófilos %	25.00±4.24 ^a	21.00±6.08 ^a	21.25±5.44 ^a
Linfocitos %	74.00±8.00 ^a	76.00±15.10 ^a	73.00±6.78 ^a
Monocitos %	5.00±4.36 ^a	5.25±3.30 ^a	3.75±1.71 ^a
Eosinófilos %	2.00±1.00 ^a	1.25±0.50 ^a	2.00±1.41 ^a
Basófilos %	0.33±0.58 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
V.A. Neutrófilos (u/L)	706.53±506.54 ^a	595.33±355.16 ^a	639.65±288.72 ^a
V.A. Linfocitos (u/L)	3,041.40±1,300.38 ^a	3,039.73±1,317.15 ^a	2,309.48±1,380.24 ^a
V.A. Monocitos (u/L)	238.50±257.25 ^a	211.45±143.29 ^a	138.20±139.80 ^a
V.A. Eosinófilos (u/L)	89.00±58.62 ^a	48.50±22.01 ^a	57.68±37.74 ^a
V.A. Basófilos (u/L)	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a
Plaquetas (u/L)	958,000.00±105,787.52 ^a	882,500.00±99,754.70 ^a	820,500.00±117,967.51 ^a

Volumen plaquetario (fL)	6.60±0.20 ^a	6.58±0.43 ^a	6.53±0.17 ^a
---------------------------------	------------------------	------------------------	------------------------

Los valores son expresados como media ± DE. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control. (ANOVA de una vía con prueba de Tukey y Dunnett post hoc, p<0.05).

7.3.6 Análisis bioquímico

La Tabla 8, muestra la química sanguínea de los grupos experimentales en comparación al grupo control, no teniendo diferencias estadísticas significativas en estos parámetros a nivel experimental.

Tabla 8: Pruebas de análisis bioquímico de grupos experimentales respecto al control.

PARÁMETROS	GRUPO CONTROL (H₂O)	DOSIS (G1) (200 mg/kg)	DOSIS (G2) (2000 mg/kg)
Glucosa (mg/dL)	69.22±8.92 ^a	72.60±18.96 ^a	95.30±15.31 ^a
Urea (mg/dL)	44.08±8.20 ^a	42.51±4.46 ^a	36.51±3.77 ^a
Creatinina (mg/dL)	0.70±0.26 ^a	0.43±0.06 ^a	0.33±0.06 ^a
Bilirrubina total (mg/dL)	0.05±0.06 ^a	0.08±0.05 ^a	0.05±0.06 ^a
(TGO) (uL)	154.77±29.35 ^a	150.17±27.29 ^a	147.45±6.03 ^a
(TGP) (u/L)	28.98±3.95 ^a	23.95±2.41 ^a	25.70±2.82 ^a
Fosfatasa alcalina (u/L)	78.40±13.04 ^a	68.88±9.51 ^a	87.60±9.17 ^a

Los valores son expresados como media ± DE. *Diferente estadísticamente significativo comparado con el control. (ANOVA de una vía con prueba de Tukey y Dunnett post hoc, p<0.05).

8. DISCUSIÓN

Dentro de las especies de encino que presentan usos no maderables medicinales por la población mexicana se encuentra *Quercus crassifolia*. Nuestro equipo de investigación ha realizado investigaciones previas donde ha demostrado que la fracción acetato de etilo procedente del extracto acuoso de cortezas de *Quercus crassifolia* posee actividad antioxidante y antimicrobiana *in vitro* (8,44). Además, estudios *in vivo* realizados por vía oral en hámsteres dislipidémicos mostraron que este extracto tiende a disminuir el porcentaje de lípidos, colesterol y triglicéridos en el hígado de estos animales, además de incrementar la concentración HDL, pudiendo evitar la esteatosis hepática y aterosclerosis (44). Sin embargo, hallazgos toxicológicos muestran algunos datos preocupantes por vía oral en administración aguda ya que este extracto induce daño renal y encefálico a dosis entre 300 y 2000 mg/kg, mientras que la toxicidad renal persistió en administración repetida a partir de 33 mg/kg (9).

En este estudio, se explora una nueva aplicación de este extracto por vía tópica para el tratamiento de la psoriasis, una enfermedad inflamatoria crónica donde la IL-17 juega un papel crucial (48). Los resultados *in vitro* en queratinocitos HaCaT mostraron que efectivamente el extracto a todas las concentraciones probadas (25, 50 y 100 µg/mL) fue capaz de inhibir significativamente la producción de IL-8 comparativamente a los queratinocitos que solamente recibieron IL-17 y esta disminución fue mayor que la de los queratinocitos control, que no fueron estimulados con IL-17, a concentraciones de 25 y 50 µg/mL. La IL-8 es una quimiocina sobreexpresada en la piel y suero de los pacientes psoriásicos, cuyo nivel de expresión ha sido positivamente correlacionado con la severidad de la psoriasis (49). La IL-8 juega un papel crucial en el reclutamiento de neutrófilos en la epidermis psoriásica, en la formación de microabscesos de Munro y la proliferación de los queratinocitos (50). De hecho, esta quimiocina ha estado relacionada con el desarrollo de la psoriasis pustulosa palmoplantar, un subtipo de psoriasis refractaria a tratamientos que cursa con la aparición de lesiones pustulosas en las palmas de las manos y pies (51). Además, estudios bioinformáticos utilizando muestras de piel de 265 pacientes con

psoriasis han considerado a la IL-8 como un biomarcador potencial para el diagnóstico de esta enfermedad dada su importancia en la proliferación, migración y resistencia a la apoptosis de los linfocitos T (52). La reducción en los niveles de ARNm de IL-8 en biopsias de piel ha sido correlacionada con el éxito ante tratamientos como el secukinumab (un inhibidor de IL-17) (53), mientras que el éxito terapéutico frente al apremilast se ha correlacionado con la disminución de los niveles circulantes de esta quimiocina (54). En consecuencia, podríamos asumir que el extracto de *Quercus crassifolia* aquí probado, dada su acción antiinflamatoria anti-IL17 *in vitro* y su efecto marcado en la producción de IL-8 podría ser considerado como un potencial candidato terapéutico para la psoriasis.

La psoriasis es una enfermedad que suele limitar la vida de los pacientes durante toda su vida, por lo que la toxicidad de los candidatos terapéuticos potenciales debe ser rigurosamente evaluada (32) ya que es una de las causas principales relacionadas con el abandono a los tratamientos (55). Dado que los resultados previamente obtenidos por nuestro equipo de investigación desalientan el uso de la vía oral, se decidió realizar un estudio toxicológico agudo por vía dérmica con este extracto.

Por esta vía de administración, el extracto no impactó significativamente ni en la evolución del peso corporal, el consumo de alimentos, peso relativo de los órganos ni en los parámetros hematológicos y bioquímicos. Comparativamente a estas dosis administradas por vía oral se aprecia algunas diferencias, ya que a 2000 mg/kg por vía oral se constató un incremento en la concentración de hemoglobina corpuscular media, así como una disminución significativa en la amplitud de distribución de los glóbulos rojos vs. el control. Además, por vía oral se registró una disminución de la concentración de creatinina y fosfatasa alcalina a 2000 mg/kg vs. el control, parámetros que no fueron afectados por vía tópica (44).

Aunque por vía dérmica, no se presentó daño encefálico, a diferencia de lo reportado por vía oral, debe señalarse que el daño renal persistió por esta vía de administración. Por vía oral el daño renal se caracterizó por el engrosamiento de las membranas basales glomerulares, así como el incremento del espacio de Bowman (44), mientras que por vía dérmica se apreció hiperplasia glomerular, desprendimiento

de la cápsula de Bowman y atrofia glomerular. En contraste, por la vía tópica el extracto indujo daño cutáneo dosis-dependiente caracterizado por la presencia de queratinocitos necróticos, pérdida de la diferenciación celular, así como, disminución en número y tamaño de las células y edema a nivel dérmico característicos de inflamación aguda.

De los resultados obtenidos podría inferirse que el daño cutáneo inducido por el extracto promovió la pérdida de la estructura de barrera de la piel, permitiendo que las moléculas contenidas en el extracto de *Q. crassifolia* alcanzaran los capilares y se distribuyeran en el organismo, impactando negativamente a nivel renal. Investigaciones previas han demostrado que este extracto es rico en compuestos fenólicos (12.94 % de las moléculas identificadas por GC-MS) (44). Se ha demostrado que estos compuestos fenólicos pueden a nivel renal formar conjugados polifenol-glutación que poseen propiedades electrofílicas y redox que dañan la arquitectura renal. De hecho, las células con altas concentraciones de glutamil-transpetidasa, tales como las células tubulares del riñón, poseen la capacidad de almacenar estos conjugados, los que dadas sus propiedades electrofílicas dañan a estos tejidos, sobre todo cuando los polifenoles se encuentran en concentraciones elevadas (56).

Aunque la naturaleza precisa de los compuestos responsables del daño renal y cutáneo debe determinarse se conoce que el género *Quercus* es rico en galatos (57,58), particularmente en ácido gálico y elágico. Estos compuestos han sido estudiados en términos toxicológicos demostrando que pueden inducir daño renal dosis-dependiente, fundamentalmente el ácido elágico (59). Lo anterior nos pudiera sugerir que estas moléculas podrían probablemente mediar este efecto toxicológico en *Q. crassifolia*, aunque su contribución en el fitocomplejo característico de esta planta debe aún elucidarse.

Otros estudios, realizados por vía oral han también demostrado que el riñón parece ser un órgano diana de toxicidad para extractos de encino, tal es el caso de *Q. robur* y *Quercus pyrenaica* (60,61). Desafortunadamente no fue posible encontrar en la literatura ningún estudio referente a la toxicidad por vía dérmica de extractos de especies pertenecientes al género *Quercus*, por lo que los resultados derivados de

este trabajo abren las puertas para determinar con mayor precisión los mecanismos de toxicidad involucrados por esta vía de administración a nivel cutáneo.

9. CONCLUSIONES

El extracto purificado de *Quercus crassifolia* presenta un potencial antiinflamatorio anti-IL17 en células cutáneas que sugiere que podría ser un candidato terapéutico interesante para el tratamiento de la psoriasis por vía dérmica. Sin embargo, su toxicidad intrínseca cutánea y renal por esta vía de administración no permiten hasta el momento recomendar su empleo por esta vía de administración. Estudios futuros utilizando dosis más pequeñas, en administración repetida permitirán conocer si la vía dérmica podría ser adecuada para el uso de este producto natural en la psoriasis.

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Esquivel García R, Estévez Delgado G, Rodríguez Orozco AR, Ochoa Zarzosa A, García Pérez ME. La psoriasis: de la investigación básica y clínica al desarrollo de nuevos tratamientos. Pubmed [Internet]. el 27 de septiembre de 2017; Disponible en: <https://www.gacetamedicademexico.com/files/p4324ax174-gaceta-4-2018--p-502-508.pdf>
2. AbuHilal M, Walsh S, Shear N. The Role of IL-17 in the Pathogenesis of Psoriasis and Update on IL-17 Inhibitors for the Treatment of Plaque Psoriasis. *J Cutan Med Surg.* el 1 de noviembre de 2016;20(6):509–16.
3. Callis Duffin K, Yeung H, Takeshita J, Krueger G g., Robertson A d., Troxel A b., et al. Patient satisfaction with treatments for moderate-to-severe plaque psoriasis in clinical practice. *Br J Dermatol.* el 1 de marzo de 2014;170(3):672–80.
4. Díaz-Murillo, V, Valentin-Escalera, J, Bartolomé-Camacho C, García-Pérez ME. Natural health products for psoriasis management. En: Lambert W, editor. *Psoriasis: epidemiology, diagnosis and management strategies.* New York: Nova Biomedical; 2016. p. 87–144. (Dermatology, laboratory and clinical research; vol. 1).
5. Cervantes-Durán C, Velázquez-Hernández ME, Valentín-Escalera J, Bartolomé-Camacho M carmen, Rodríguez-Orozco AR, García-Pérez ME. Small molecules under development for psoriasis: on the road to the individualized therapies. *Arch Dermatol Res.* el 14 de marzo de 2020;312(9):611–27.
6. Manual de la biodiversidad de encinos michoacanos. Instituto Nacional de Ecología; 149 p.
7. Luna-José A de L, Montalvo-Espinosa L, Rendón-Aguilar B. Los usos no leñosos de los encinos en México. *Bot Sci.* el 15 de junio de 2003;(72):107–17.
8. Valencia-Avilés E, García-Pérez M, Garnica-Romo MaG, Figueroa-Cárdenas J de D, Meléndez-Herrera E, Salgado-Garciglia R, et al. Antioxidant Properties of Polyphenolic Extracts from *Quercus Laurina*, *Quercus Crassifolia*, and *Quercus Scytophylla* Bark. *MDPI.* 2018;7(7):11.
9. Valencia-Avilés E, Martínez-Flores H, García-Pérez M, Meléndez-Herrera 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.* julio de 2019;84(7):1692–702.
10. Valencia Avilés E. Efecto de la adición de aceite vegetal y nanocápsulas de un extracto polifenólico de corteza de *Quercus crassifolia* a un yogurt medidos

en hámsteres dislipidémicos [Internet] [Ph. D Thesis]. [Michoacán, México]: Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; 2019 [citado el 21 de julio de 2021]. Disponible en: http://bibliotecavirtual.dgb.umich.mx:8083/xmlui/handle/DGB_UMICH/3713

11. OECD. Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method [Internet]. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development; 2002 [citado el 15 de mayo de 2016]. Disponible en: <http://www.oecd-ilibrary.org/content/book/9789264071001-en>

12. Martínez C, Domínguez J. Endocrinología de la piel. 2018. el 15 de junio de 2018;16(3):149–66.

13. Arenas R. Dermatología Atlas, diagnóstico y tratamiento. Séptima edición. Ciudad de México: McGRAW-HILL INTERAMERICANA; 2019. 1113 p.

14. Zeas D IM, Ordoñez V MS. Dermatología Básica [Internet]. Cuenca; 2016. (743001). Disponible en: <https://dspace.ucuenca.edu.ec/bitstream/123456789/26151/3/DERMATOLOGIA%20BASICA.pdf>

15. Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ. Dermatología en Medicina General. Séptima. Vol. Tomo 1. España: Panamericana; 2009. 677 p.

16. Cordero AlejandroA. Biología de la Piel. 1a ed. Buenos Aires: Panamericana; 1997.

17. Oesch F, Fabian E, Guth K, Landsiedel R. Xenobiotic-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. Arch Toxicol. diciembre de 2014;88(12):2135–90.

18. Batista Romagosa M, Pérez Bruzón M. Elementos más Importantes en la Patogenia de la Psoriasis. Medisan. 2009;13(3).

19. Eva Maria Fagundo Becerra, Reina Lora V. Psoriasis en gotas. clínica de medicina de familia. febrero de 2007; Vol. 1(6):295–6.

20. Méndez Tovar LJ, Arévalo López A, Domínguez Aguilar S, Manzano Gayosso P, Hernández Hernández F, López Martínez R, et al. Frecuencia de Onicomiosis en Pacientes con Psoriasis en un Hospital de Especialidades. IMSS. junio de 2015;53(3):374–9.

21. Reolid Martínez RE, Azaña Defez JM, Flores Copete M. Psoriasis Folicular, esa gran desconocida. clínica de medicina de familia. 2016;9(3):246–9.

22. López Valcárcel M, Faura Berruga C. Psoriasis anular. abril de 2014;7(1):52–5.

23. Espinoza Hernández CJ, Lacy Niebla RM, Soto López ME, Kresch Tronik NS, Vega Memije ME. Prevalencia del Síndrome metabólico (SM) en Pacientes con Psoriasis. *Dialnet*. 2014;311–6.
24. Ramírez LC, Velásquez MM. Aspectos de la IL-17 en la inmunopatogenesis de la Psoriasis: un nuevo blanco terapéutico. enero de 2015; Disponible en: https://revistasocolderma.org/sites/default/files/aspectos_de_la_il-17_en_la_inmunopatogenesis_de_la_psoriasis_un_nuevo_blanco_terapeutico.pdf
25. Jin W, Dong C. IL-17 cytokines in immunity and inflammation. *Pubmed [Internet]*. 2013;2(9). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3820987/pdf/emi201358a.pdf>
26. Rodrigues Diez RR, Tejera Muñoz A, Orejudo M, Marquez Exposito L, Santos L, Rayego Mateos S, et al. Interleuquina-17A: Posible Mediador y Diana Terapéutica en la Hipertensión. noviembre de 2020; Disponible en: <https://www.revistanefrologia.com/es-pdf-S0211699521000229>
27. Queiro Silva R. Rol de la interleucina-17 en otras enfermedades y comorbilidades. 2018;14(1):28–34.
28. Giraldo Sierra C, Velásquez Lopera MM. Psoriasis: Revisión del tema con énfasis en la inmunopatogénesis. *Redalyc*. septiembre de 2009;22(3):272–83.
29. Tomás Velázquez A, Quan López PL, Calvo Imirizaldu M, España Alonso A. De un anti-IL-17 a otro: dar una segunda oportunidad o cambiar de Diana. *Elsevier [Internet]*. 2020; Disponible en: <https://www.actasdermo.org/es-pdf-S0001731020305287>
30. García Carvajal ZY, Espinosa-Andrews H. Estudios preclínicos en investigación, desarrollo e innovación biotecnológica. *Mundo Nano Rev Interdiscip En Nanociencia Nanotecnología*. el 3 de enero de 2017;9(17):117.
31. Gámez R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. 2007;38(3).
32. Garcia-Perez ME, Jean J, Pouliot R. Antipsoriatic Drug Development: Challenges and New Emerging Therapies. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*. el 1 de enero de 2012;6(1):3–21.
33. Harvey AL, Edrada-Ebel R, Quinn RJ. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat Rev Drug Discov*. febrero de 2015;14(2):111–29.
34. Hert J, Irwin JJ, Laggner C, Keiser MJ, Shoichet BK. Quantifying biogenic bias in screening libraries. *Nat Chem Biol*. julio de 2009;5(7):479–83.

35. Repetto Kuhn GR, Repetto Jiménez M. Toxicidad Fundamental. 2009;
36. Hernández RIM. Métodos Alternativos en Toxicología. 2014;45(1). Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/1812/181230079003.pdf>
37. Toledo DB. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo (Evaluation of acute toxicity of extracts of medicinal plants by an alternative testing). 2007; VIII (3):1–7.
38. De Paz N, Ezpeleta O, López de Cerain A. Aplicación de la estrategia secuencial de la OCDE para evaluar la irritación y corrosión por un producto fitosanitario. 2005;22(1):30–6.
39. OCDE GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS DRAFT REVISED GUIDELINE 404. 2014; Disponible en: <https://www.oecd.org/env/ehs/testing/Draft%20Revised%20Test%20Guideline%20404%20Acute%20Dermal%20Irritation%20and%20Corrosion.pdf>
40. Uribe-Salas D, España-Boquera ML, Torres-Miranda A, Uribe-Salas D, España-Boquera ML, Torres-Miranda A. Aspectos biogeográficos y ecológicos del género *Quercus* (Fagaceae) en Michoacán, México. Acta Botánica Mex [Internet]. 2019 [citado el 2 de febrero de 2023];(126). Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0187-71512019000100101&lng=es&nrm=iso&tIng=es
41. Martínez-Calderón VM, Siqueiros-Delgado ME, Martínez-Ramírez J. Especies del género *Quercus* (Fagaceae) presentes en el área natural protegida de Sierra Fría, Aguascalientes, México. Investig Cienc. 2017;25(71):12–8.
42. Valencia-A. S. Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. Bot Sci. el 15 de diciembre de 2004;(75):33–53.
43. Rangel SR, Carlos E, Zenteno R, de Lourdes M, Enriquez A. El Genero *Quercus* (Fagaceae) en el Estado de México. Ann Mo Bot Gard. 2002;89(4):551.
44. Valencia-A. E. “Efecto de la adición de aceite vegetal y nanocápsulas de un extracto polifenólico de corteza de *Quercus crassifolia* a un yogurt medidas en hámsteres dislipidémicos”. [Michoacán, México]: Universidad Michoacana De San Nicolás De Hidalgo; 2019.
45. OECD 423. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS. 2001;14.
46. Guidance Document on the Recognition, Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for Experimental Animals Used in Safety Evaluation | READ online [Internet]. [oecd-ilibrary.org](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on-). [citado el 20 de febrero de 2023]. Disponible en: <https://read.oecd-ilibrary.org/environment/guidance-document-on->

the-recognition-assessment-and-use-of-clinical-signs-as-human-endpoints-for-experimental-animals-used-in-safety-evaluation_9789264078376-en

47. Zhang Y, Zhu K, Cui H, Liu Y, Lu YF, Pan HW, et al. Toxicological evaluation of *Oviductus ranae*: Acute, sub-acute and genotoxicity studies in mice and rats. *J Ethnopharmacol.* mayo de 2017; 203:101–9.
48. Chiricozzi A. Pathogenic role of IL-17 in psoriasis and psoriatic arthritis. *Actas Dermo-Sifiliográficas.* el 1 de octubre de 2014; 105:9–20.
49. Arican O, Aral M, Sasmaz S, Ciragil P. Serum levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm.* el 24 de octubre de 2005;2005(5):273–9.
50. Duan H, Koga T, Kohda F, Hara H, Urabe K, Furue M. Interleukin-8-positive neutrophils in psoriasis. *J Dermatol Sci.* junio de 2001;26(2):119–24.
51. Xiaoling Y, Chao W, Wenming W, Feng L, Hongzhong J. Interleukin (IL)-8 and IL-36 γ but not IL-36Ra are related to acrosyngia in pustule formation associated with palmoplantar pustulosis. *Clin Exp Dermatol.* enero de 2019;44(1):52–7.
52. Yang Y, Xie S, Jiang W, Tang S, Shi Y. Discovering Novel Biomarkers Associated with the Pathogenesis of Psoriasis: Evidence from Bioinformatic Analysis. *Int J Gen Med.* 2022; 15:2817–33.
53. Reich K, Papp KA, Matheson RT, Tu JH, Bissonnette R, Bourcier M, et al. Evidence that a neutrophil-keratinocyte crosstalk is an early target of IL-17A inhibition in psoriasis. *Exp Dermatol.* julio de 2015;24(7):529–35.
54. Schafer PH, Chen P, Fang L, Wang A, Chopra R. The pharmacodynamic impact of apremilast, an oral phosphodiesterase 4 inhibitor, on circulating levels of inflammatory biomarkers in patients with psoriatic arthritis: substudy results from a phase III, randomized, placebo-controlled trial (PALACE 1). *J Immunol Res.* 2015; 2015:906349.
55. Piragine E, Petri D, Martelli A, Janowska A, Dini V, Romanelli M, et al. Adherence and Persistence to Biological Drugs for Psoriasis: Systematic Review with Meta-Analysis. *J Clin Med.* el 9 de marzo de 2022;11(6):1506.
56. Monks TJ, Lau SS. The pharmacology and toxicology of polyphenolic-glutathione conjugates. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998; 38:229–55.
57. Ishimaru K, Nonaka GI, Nishioka I. Phenolic glucoside gallates from *quercus mongolica* and *q. acutissima*. *Phytochemistry.* enero de 1987;26(4):1147–52.

58. Shiow-Yunn S, Feng-Lin H, Yu-Chan L. Two gallates from *Quercus glauca*. *Phytochemistry*. 1992;31(7):2465–8.
59. Hurtado-Nuñez GE, Cortés-Rojo C, Sánchez-Ceja SG, Martínez-Flores HE, Salgado-Garciglia R, Bartolomé-Camacho MC, et al. Gallic, ellagic acids and their oral combined administration induce kidney, lung, and heart injury after acute exposure in Wistar rats. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc*. diciembre de 2022; 170:113492.
60. Dutra F, Romero A, Trelles P, Arruti F, Ferres J, Quinteros C. Intoxicación espontánea y experimental por *Quercus robur* (roble inglés) en bovinos en Uruguay. *Vet Montev*. el 1 de junio de 2014;50(194):34–48.
61. Pérez V, Doce RR, García-Pariente C, Hervás G, Carmen Ferreras M, Mantecón AR, et al. Oak leaf (*Quercus pyrenaica*) poisoning in cattle. *Res Vet Sci*. octubre de 2011;91(2):269–77.