



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS
FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

“Perfil toxicológico de un extracto acuoso de
Malvaviscus arboreus”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN MEDICINA MOLECULAR

Presenta
M.E.M.F. Alma Heidi Coss Mejia

DIRECTOR DE TESIS
Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

CODIRECTOR DE TESIS
Dr. Armando Herrera Arellano

Cuernavaca, Morelos a 28 de mayo del 2024

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORIAL

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez
Investigador Titular
Centro de Investigación Biomédica del Sur, IMSS

CODIRECTOR DE TESIS

Dr. Armando Herrera Arellano
Doctor en Ciencias Biológicas

ASESORES

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer
Investigador Titular (CIBIS-IMSS)

Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz
Investigadora Titular (CIBIS-IMSS)

Dra. Laura Ávila Jiménez
Coordinadora Auxiliar Médica de Investigación
Órgano de Operación Administrativa Desconcentrada Morelos, IMSS

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN

PRESIDENTE

Dr. Juan José Acevedo Fernández

SECRETARIA

Dra. Gabriela Castañeda Corral

1ER. VOCAL

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer

2DO. VOCAL

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

3ER. VOCAL

Dr. Armando Herrera Arellano

ÍNDICE	página
1. Resumen	1
2. Marco teórico	2
2.1 Medicina tradicional	2
2.2. La especie vegetal <i>Malvaviscus arboreus</i>	2
2.2.1. Clasificación taxonómica	3
2.3. Etnobotánica	3
2.4. Fitoquímica	4
2.5. Kaempferol	6
2.6. Toxicidad	7
2.7. Propiedad antioxidante y antiinflamatoria	7
2.8. Actividad antimicrobiana	8
2.9. Otros efectos biológicos	8
2.10. Toxicología	9
2.10.1. Toxicología aguda, subcrónica y crónica	10
2.11. Hepatotoxicidad	10
2.11.1. Pruebas de función hepática	11
2.12. Nefrotoxicidad	13
2.12.1. Evaluación de la función renal	13
2.12.1.1. Análisis de orina	13
2.12.1.2. Pruebas sanguíneas	13
2.13. Evaluación del efecto tóxico sobre el Sistema Nervioso	14
2.13.1. Prueba de Irwin	15
3. Planteamiento del problema	16
3.1. Justificación	16
3.2. Pregunta de investigación	16
4. Hipótesis	17
5. Objetivos	17
5.1. Objetivo general	17
5.2. Objetivos específicos	17

6. Material y métodos	18
6.1. Aprobación del protocolo, diseño y desarrollo de los tratamientos	18
6.2. Diseño y desarrollo de los tratamientos	18
6.3. Exposición subcrónica	20
6.4. Toxicidad en sistema nervioso central y periférico / Prueba de Irwin	21
6.5. Hepatotoxicidad y nefrotoxicidad	24
6.5.1 Técnica histológica	24
6.6. Descripción de variables	25
6.7. Análisis estadístico	29
6.8. Escritura de tesis y obtención de grado	29
6.9. Conflictos de interés	29
7. Aspectos éticos	30
8. Aspectos de bioseguridad	31
8.1. Evidencia documental	31
8.2. Transporte y embalaje de las muestras vegetales	31
8.3. Desecho de Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos y de Químicos Corrosivos, Reactivos, Tóxicos e Inflamables	31
9. Resultados	33
10. Discusión	49
11. Conclusiones	52
12. Referencias	53
13. Anexos	61

1. RESUMEN

Antecedentes: *Malvaviscus arboreus* es una especie empleada con efecto antimutágeno, antiinflamatorio y propiedades gastroprotectoras; útil en el manejo terapéutico de las úlceras gástricas y cáncer. Aún no existen datos sobre estudios toxicológicos aplicados a esta especie medicinal, por lo que se planteó la presente propuesta derivada sobre la seguridad de la ingesta de la planta y en particular sobre el consumo de un extracto acuoso de las partes aéreas, con la intención futura de llegar a un fitomedicamento para el tratamiento de úlceras gástricas, y su potencial antiinflamatorio para tratar diversas patologías.

Objetivo: Evaluar el perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*.

Material y métodos: Se preparó un extracto acuoso con las flores de *Malvaviscus arboreus*, obtenidas mediante su cultivo en el CIBIS-IMSS. En el estudio toxicológico subcrónico se utilizaron ratones hembra de la cepa Balb-c siguiendo guías de la OCDE (1000 mg/kg de peso corporal) durante un periodo de 28 días, evaluando semanalmente el peso y comportamiento utilizando los parámetros de la prueba de Irwin. El control negativo recibió la ingesta de agua potable vía oral durante el mismo periodo de tiempo. Al final se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar orina y cuantificar creatinina y proteínas; suero para la medición de transaminasas, creatinina y proteínas; así como curva de tolerancia a la glucosa previo al sacrificio. Los riñones e hígado se analizaron histológicamente utilizando la tinción de hematoxilina y eosina.

Resultados: La administración subcrónica del extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus* no presentó alteraciones en sistema nervioso central y periférico, tampoco en pruebas de función hepática (TGO/ $p=0.562$ y TGP/ $p=0.273$). Sin embargo, si se encontraron alteraciones anatomopatológicas hepáticas ($p=0.620$) y renales ($p=0.067$), así como alteraciones en las pruebas de funcionamiento renal (creatinina en suero/ $p=0.042$, proteínas en suero/ $p=0.010$ y TFG/ $p=0.383$). De manera destacada se observó un efecto antihiper glucémico ($p=0.011$).

Conclusiones: Se concluyó con el objetivo de este estudio al evaluar el efecto tóxico del extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*, encontrando alteraciones anatomopatológicas a nivel hepático (balonización, binucleación) y renal (congestión vascular) así como alteraciones funcionales en riñón.

Palabras clave: Toxicidad subcrónica, *Malvaviscus arboreus*, extracto herbario.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. Medicina tradicional

En México se combinan la medicina alopática y la herbolaria por encima de la división territorial, cultural y social; entre gente originaria y mestiza, urbana o rural, a tal punto que podemos decir que la medicina tradicional es de uso común. La Organización Mundial de la Salud (OMS) calcula que 80 por ciento de la población mundial depende, para la atención primaria de la salud, de las plantas medicinales.^{1,2}

La medicina tradicional abarca una amplia variedad de terapias y prácticas que varían entre países y entre regiones. En algunos países se denomina medicina “alternativa” o “complementaria”. La medicina tradicional se ha utilizado desde hace miles de años, y sus practicantes han contribuido enormemente a la salud humana, en particular como proveedores de atención primaria de salud al nivel de la comunidad. La medicina tradicional ha mantenido su popularidad en todo el mundo y a partir del decenio de 1990 se ha constatado un resurgimiento de su utilización en muchos países desarrollados y en desarrollo.³

La fitoterapia es el uso de las plantas medicinales, (enteras o sus partes, secas o frescas, solas o asociadas) para la prevención y/o tratamiento de problemas de salud.⁴

Las plantas pueden producir varios efectos medicinales en el organismo, son activas contra la inflamación mediante la modulación de genes, receptores y enzimas involucradas en la cascada inflamatoria. Se caracterizan porque contienen un gran número de moléculas, de las cuales, algunas producen actividades biológicas. En todas las sociedades del planeta, especialmente donde los medicamentos farmacéuticos son caros, las plantas y sus derivados se usan comúnmente para la atención primaria de los pacientes. Es importante remarcar que muchos de los medicamentos alopáticos de uso terapéutico actual, fueron desarrollados mediante su descubrimiento de origen natural y posteriores modificaciones químicas de las moléculas más activas. También pueden usarse en paralelo a medicamentos de síntesis, dependiendo de los sistemas médicos locales.^{2,5}

2.2. La especie vegetal *Malvaviscus arboreus*

Malvaviscus arboreus (conocida como falso hibisco, manzanita, farolito en México y en Cuba como pasiflora), es originaria de México, Centroamérica y otras zonas tropicales de América, se encuentra presente desde el nivel del mar hasta los 1865 metros, en clima cálido, semicálido y semitemplado, y crece asociado a la selva tropical subcaducifolia,

subperennifolia, perennifolia (Figura 1). Este arbusto leñoso que puede alcanzar 2 metros de altura presenta ramaje abundante y tallo delgado con hojas más anchas en la base, bordeadas de dientes suaves; sus flores rojas muestran estambres muy sobresalientes, los cuales sobrepasan la corola que no llega a abrirse permaneciendo estrechamente alrededor del pistilo. Florece bien tanto en condiciones de pleno sol como en completa sombra, y que una vez establecida su plantación tolera la sequía.⁶



Figura 1. *Malvaviscus arboreus*

2.2.1. Clasificación taxonómica

Dominio: *Eukaryota*

Reino: *Plantae*

División: *Magnoliophyta*

Clase: *Magnoliopsida (Dicotyledoneae)*

Orden: *Malvales*

Familia: *Malvaceae*

Género: *Malvaviscus*

Especie: *Malvaviscus arboreus*⁷

2.3. Etnobotánica

M. arboreus, es una especie empleada en la medicina tradicional mexicana para aliviar trastornos gastrointestinales como disentería, diarrea y dolor de estómago. El fruto es comestible y la infusión de las hojas se usa para lavar el pelo, y como tratamiento de la tosferina; su raíz se usa como antiséptico urinario, enfermedades del riñón y como diurético. También para problemas de amigdalitis, diarrea, dolor de estómago, úlceras orales, contra piquetes de chinche y para retención placentaria. La flor o tallo y hojas macerados se aplican

localmente contra el sarampión. En Cuba resulta significativo el uso popular de las flores de este arbusto decorativo como sedante.⁸

2.4. Fitoquímica

Se han descrito flavonoides, antocianinas, ácidos fenólicos, esteroides, cumarinas y los ácidos grasos como los componentes principales; así como la presencia de glucósidos, triterpenoides, esteroides, furanos y piranos. También se han identificado otros compuestos como lo son el ácido β -resorcílico (p-ácido hidroxisalicílico), ácido cafeico (1), ácido protocatecuico (2), ácido gálico (3), 4-hidroxi-ácido fenilacético (4), kaempferol 3-O- β -galactopiranosido también conocido como trifolina (5), y kaempferol 3-O- β -glucopiranosido o astragalina (6).⁹ (Figura 2)

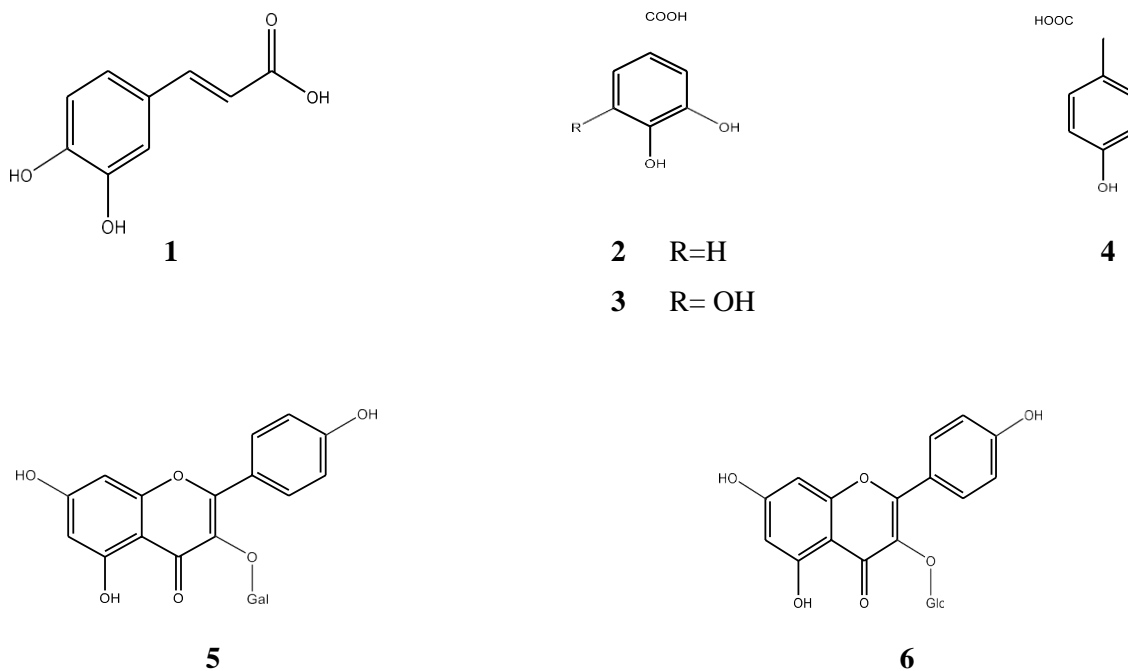
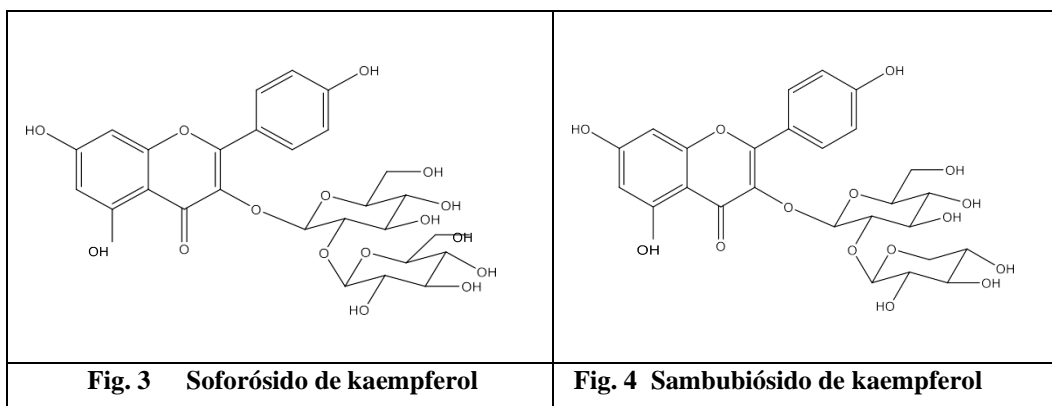


Figura 2. Compuestos presentes en *Malvaviscus arboreus* (ácido cafeico (1), ácido protocatecuico (2), ácido gálico (3), 4-hidroxi-ácido fenilacético (4), kaempferol 3-O- β -galactopiranosido también conocido como trifolina (5), y kaempferol 3-O- β -glucopiranosido o astragalina (6).

Las hojas y flores de *Malvaviscus arboreus* presentan los siguientes compuestos volátiles, con un evidente mayor aporte de compuestos oxigenados (89.54% en hojas y 89.35% en flores). Los éteres fenólicos (41.64%) y cetonas (21.57%) son los principales grupos químicos emitidos por las flores, las cetonas (27.40%) y los ácidos carboxílicos (18.16%) están presentes en las hojas; anetol (32.32%), metilisobutenil cetona (19.18%) y metilchavicol (9.32%) son los compuestos volátiles más abundantes de las flores, mientras que el ácido acético (18,16%) fue el principal componente desprendido por las hojas, seguido de la 2-ciclohexenona.(9.60%) y el anetol (7.39%). En las flores se ha identificado el flavonoide pelargonidín y en la raíz el esteroil beta-sitosterol, además de la presencia de taninos.^{10, 11}

Malvaviscus arboreus presenta diversos metabolitos de alto interés farmacológico, fundamentalmente alcaloides y flavonoides los cuales pueden ser los responsables de la acción que se le atribuye a la planta. Compuestos como el 2,3-dihidro-3,5- dihidroxi-6-metil-4H-pyran-4-ona y el DL-prolina-5-oxometil éster, funcionan como posibles agentes antimutágenos, antitumorales y anticancerígenos, haciendo de *Malvaviscus arboreus* una especie promisoro para la fabricación de nuevos medicamentos para tratar el cáncer, entre otras enfermedades.¹²

Un estudio realizado en el 2021 permitió demostrar que un extracto acuoso y su fracción orgánica (MaEA) de *M. arboreus* contiene flavonoides glicosilados como el soforósido de kaempferol y el sambubiósido de kaempferol (Figura 3 y 4); los cuales son responsables de sus propiedades gastroprotectoras. Estos resultados pueden ser utilizados en el futuro, para el desarrollo de un tratamiento estandarizado útil en el manejo terapéutico de las úlceras gástricas (Figuras 3 y 4).¹³



El kaempferol será utilizado como compuesto de referencia, esto porque se tiene caracterizado al kaempferol tanto química, farmacológica y toxicológicamente; pero no hay ningún estudio que nos hable de la toxicología de *Malvaviscus arboreus*. Creemos que la estandarización con base en kaempferol nos permitirá administrar una dosis estandarizada y uniforme bajo todo el esquema que persigue la determinación de la toxicología. El kaempferol es un precursor del sofrósido y el sambubiósido, dos compuestos estudiados en el Centro de Investigación Biomédica del Sur; por lo cual el conocimiento de las propiedades del kaempferol, nos puede ayudar a comprender los beneficios de *Malvaviscus arboreus*.

2.5. Kaempferol

Los flavonoides se encuentran en muchos alimentos vegetales y medicinas a base de hierbas y se consideran como el componente más activo, con actividad antiinflamatoria tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Kaempferol es un flavonoide natural presente en diferentes especies de plantas, descrito por sus propiedades antiinflamatorias. Su estructura de difenilpropano, es responsable de su propiedad hidrofóbica (Figura 5). El kaempferol se sintetiza a través de la condensación de 4-cumaroil-CoA con tres malonil-CoA bajo la acción catalítica de la chalcona sintasa que produce naringenina chalcona. A partir de esto, bajo los efectos catalíticos de la chalcona isomerasa; naringenina-chalcona se transforma en la flavonona llamada naringenina. En el siguiente paso, se agrega un grupo hidroxilo a la naringenina (en la posición C3) para producir dihidrokaempferol, bajo la actividad de la flavonona 3-dioxigenasa. En el paso final, el kaempferol se produce mediante la introducción de un doble enlace en la posición C2-C3 en el esqueleto del dihidrokaempferol por la actividad de flavonol sintasa. En las plantas, diferentes azúcares como la rutina, la ramnosa, la glucosa y la galactosa se unen al kaempferol para producir una forma glicosídica de kaempferol.¹⁴

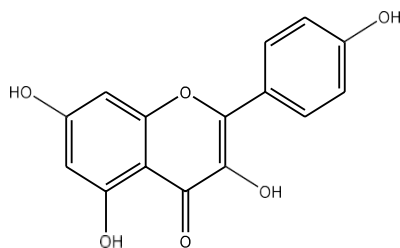


Figura 5. Kaempferol

2.6. Toxicidad

Se ha informado que el kaempferol posee efectos mutagénicos y genotóxicos; es bien sabido que los efectos genotóxicos del kaempferol se deben a su actividad prooxidante in vitro. Kaempferol reduce los radicales libres mediante la donación de hidrógeno y se transforma en un radical fenoxilo; el radical fenoxilo puede reaccionar con otros radicales libres para mostrar actividad antioxidante y se convierte en una forma estable y/o puede interactuar con el oxígeno para mostrar un efecto prooxidante y producir especies reactivas de oxígeno. Se ha informado que los kaempferoles causan algunos efectos adversos adicionales; como reducción de la biodisponibilidad del hierro y reducción de los niveles de ácido fólico en las células.¹²

2.7. Propiedad antioxidante y antiinflamatoria

Se ha prestado mucha atención a los flavonoides como nueva estrategia terapéutica debido a su efecto antiinflamatorio y antioxidante. Informes científicos han mostrado que el kaempferol tiene un papel beneficioso en diferentes enfermedades neurodegenerativas y en cáncer. Específicamente, los alimentos ricos en kaempferol se han relacionado con una disminución en el riesgo de desarrollar algunos tipos de cáncer como los de piel, hígado y colon. El efecto anticanceroso está mediado por diferentes modos de acción, que incluyen antiproliferación, inducción de apoptosis, detención del ciclo celular, generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y actividades antimetastasis / antiangiogénesis. Además, se ha descubierto que el kaempferol exhibe su actividad anticancerígena mediante la modulación de múltiples dianas moleculares, incluidas p53 y STAT3, mediante la activación de caspasas y mediante la generación de ROS. La combinación de kaempferol y fármacos quimioterapéuticos convencionales produce un mayor efecto terapéutico que estos últimos, además de reducir la toxicidad de estos últimos. Se ha informado que el consumo de kaempferol aumenta significativamente los efectos citotóxicos del cisplatino; por lo tanto, se puede concluir que parece, que aumenta la biodisponibilidad de diferentes medicamentos contra el cáncer.^{14, 15}

Además, también presenta propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, antitumorales, cardioprotectoras, neuroprotectoras y antidiabéticas. Estas acciones antiinflamatorias beneficiosas del kaempferol se deben a su potente efecto en la inhibición

de la función de las células inflamatorias, así como en la inhibición de la expresión de citocinas y quimiocinas proinflamatorias. El tratamiento con kaempferol atenúa el dolor neuropático diabético mediado por la reducción de los niveles de óxido nítrico, IL-1 y TNF-alfa, inducido por la inyección intraperitoneal de estreptozotocina en ratones suizos. También ha demostrado protección contra la pérdida ósea posmenopáusica en la línea celular de osteoblastos de la calota de ratón MC3T3-E1. La ingesta dietética de flavonoides, incluido el kaempferol, en un estudio realizado en adultos estadounidenses, ha revelado que existe una correlación inversa entre el nivel de consumo de flavonoides y el nivel de proteína C reactiva (PCR) en suero, lo que indica su papel en la reducción del riesgo de inflamación.¹⁶ Numerosos informes han demostrado que el kaempferol y los glicósidos del kaempferol tienen actividad antiinflamatoria no solo in vitro sino también in vivo, esta actividad puede estar mediada por varios mecanismos de acción, como la activación del factor nuclear kappa B (NF-B) el cual aumenta la expresión de citocinas, quimiocinas y enzimas proinflamatorias (TNF-, IL-1, IL-6, IL8, COX-2, iNOS); varios trabajos han demostrado que el kaempferol inhibe NF-B, TNF y la expresión de IL-1 e IL-8.¹⁵

2.8. Actividad antimicrobiana

Los glucósidos del kaempferol o las plantas que contienen kaempferol tienen actividades antibacterianas, antivirales, antifúngicas y antiprotozoarias. También pueden actuar de forma sinérgica con antibióticos (rifampicina, vancomicina, meticilina, eritromicina y clindamicina), contra bacterias resistentes a los antibióticos, lo que sugiere que el kaempferol podría utilizarse en combinación con estos fármacos en casos de resistencia. También se ha descrito como un agente antiprotozoario. y ha mostrado actividad contra *Leishmania* spp, *Entamoeba histolytica*, *E. Coli* y *Giardia lamblia*, las cuales son causantes de diarrea. Algunos estudios han encontrado que el kaempferol interfiere con las enzimas que son vitales para el crecimiento o la virulencia de ciertos hongos.^{17, 18}

2.9. Otros efectos biológicos

El consumo de alimentos que contienen kaempferol se asoció con una reducción de la mortalidad por enfermedad coronaria, con una menor incidencia de infarto de miocardio y menor incidencia de enfermedad cerebrovascular. También se ha demostrado que el

kaempferol inhibe la enzima convertidora de angiotensina induciendo efectos vasodilatadores y produce efectos antiplaquetarios y antitrombóticos, disminuir los niveles de triglicéridos, colesterol y/o reducir el peso corporal, así como también tener un efecto hipoglucemiante en ratas diabéticas. Kaempferol puede ejercer un efecto protector contra la pérdida ósea posmenopáusica, ya que promueve la mineralización de osteoblastos *in vitro* y la formación de hueso *in vivo*, debido a su actividad estrogénica. Algunos glucósidos del kaempferol y las plantas que contienen este flavonoide, pueden tener actividad neuroprotectora y desempeñar un papel protector en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson o enfermedad de Huntington; la reducción de la proteína beta amiloide, puede participar en el posible efecto protector del kaempferol contra la enfermedad de Alzheimer.¹⁷

2.10. Toxicología

La toxicología puede ser definida como la ciencia que se ocupa de los efectos adversos a la salud causados por agentes químicos, físicos o biológicos en los organismos vivientes. Los efectos adversos pueden variar desde muerte, cáncer, enfermedades y hasta daños sutiles en varios órganos o sistemas. Implica estudios *in vivo* para estudiar parámetros como dosis letal en la población de animales en condiciones experimentales de laboratorio y estudios *in vitro* en la cual se estudia los eventos y procesos clave de la molécula diana, respuestas celulares, hasta los efectos a la salud humana y el medio ambiente.¹⁹

Las evaluaciones toxicológicas tienen tres objetivos principales: determinación del espectro toxicológico en una amplia gama de dosis en animales de laboratorio; extrapolación de respuestas a otras especies, con especial énfasis en el potencial de efectos indeseables en humanos; y determinación de niveles seguros de exposición.²⁰

El objetivo de los estudios toxicológicos preclínicos es la caracterización del impacto fisiológico consecuente a su administración, para lo cual se requieren estudios en animales de laboratorio u otros modelos experimentales que demuestren la toxicidad o inocuidad del fármaco en estudio. La comprensión de las relaciones dosis-respuesta y la extrapolación de datos de animales de experimentación a humanos es fundamental para la evaluación de la seguridad de los medicamentos.²¹

2.10.1. Toxicología aguda, subcrónica y crónica

Las pruebas de toxicología aguda generalmente implican estudios de dosis única con un período de observación de 14 días, las pruebas subcrónicas son estudios de dosis múltiples que suelen durar de 2 semanas a 6 meses y la toxicología crónica implica estudios de dosis múltiples de ≥ 6 meses.²⁰

Los estudios toxicológicos resultan imprescindibles para demostrar la seguridad a corto, mediano y largo plazo del fitofármaco en investigación, a través de la evaluación de su potencial tóxico en modelos experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, demostrando que las dosis empleadas en un estudio son suficientemente altas en relación con la dosis que presenta actividad farmacológica, de manera que se garantice un adecuado margen de seguridad para el producto en estudio. Los estudios farmacológicos y toxicológicos se realizan con los metabolitos secundarios o el ingrediente farmacéutico activo presente en el fitomedicamento, lo que permite garantizar la trazabilidad en las evaluaciones preclínicas.²²

2.11. Hepatotoxicidad

El hígado es el órgano más voluminoso del cuerpo y representa el 2% del peso corporal total, es decir, alrededor de 1.5 kg para un adulto. La unidad funcional básica es el lobulillo hepático, una estructura cilíndrica de varios milímetros de longitud y de 0.8 a 2 mm de diámetro. El hígado humano contiene entre 50,000 y 100,000 lobulillos, es un gran depósito de células, con capacidad de reacción química, que realizan un metabolismo intenso. Estas células comparten sustratos y energía, procesan y sintetizan numerosas sustancias transportadas a otras regiones del organismo, y cumplen miles de funciones metabólicas diferentes.²³

Algunas de las funciones del hígado son:

- Metabolismo de nutrimentos y vitaminas: glucosa y otros glúcidos, aminoácidos, lípidos (ácidos grasos, colesterol, lipoproteínas), vitaminas liposolubles e hidrosolubles.
- Inactivación de varias sustancias: toxinas, esteroides, hormonas.
- Síntesis de proteínas plasmáticas: proteínas de fase aguda, albúmina, factores de coagulación, proteínas fijadoras de esteroides y de otras hormonas.
- Inmunidad: células de Kupffer.

El hígado desintoxica la sangre de sustancias que se originan en el intestino o en otras partes

del organismo, mediante reacciones bioquímicas mediadas en sus primeras etapas por el gran número de enzimas del citocromo P450 que se expresa en los hepatocitos, convirtiendo los xenobióticos y sustancias tóxicas en metabolitos inactivos menos lipófilos. Las reacciones de desintoxicación se dividen en fase I (oxidación, hidroxilación y otras reacciones mediadas por el citocromo P450) y de fase II (esterificación). Por último, los metabolitos son secretados hacia la bilis para eliminarse a través del tubo digestivo.²⁴

Sin embargo, la ingesta excesiva de estos productos químicos aún puede resultar en daño oxidativo a los órganos de los tejidos por la producción masiva de radicales libres, lo que conduce a un daño estructural y funcional de la membrana causando una toxicidad grave a los hepatocitos. El estrés oxidativo, ha sido considerado como un mecanismo patológico conjunto y contribuye al inicio y progresión de la lesión hepática.²⁵

La hepatotoxicidad es la lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos, así como la aparición de efectos deletéreos no intencionales que se producen con dosis farmacológicas con fines profilácticos y terapéuticos. El hígado es un órgano que se afecta en procesos inflamatorios como infecciones víricas, toxicidad por fármacos y sus metabolitos, enfermedades metabólicas, procesos autoinmunes y distintos defectos genéticos. El hígado al ser el principal órgano implicado en el metabolismo de nutrientes, fármacos y xenobióticos, lo hace particularmente susceptible a los fenómenos de toxicidad química.²⁶

La lesión hepática produce cambios patológicos como aumento del nivel de transaminasas, bilirrubinas totales, y generación de radicales libres, por lo que una mejor comprensión de los mecanismos primarios es imprescindible para el diseño de nuevos fármacos terapéuticos. Por lo cual, se desarrollan modelos animales para imitar las enfermedades hepáticas humanas; los cuales se han utilizado durante varias décadas para estudiar la patogenia de los trastornos hepáticos y las toxicidades relacionadas.²⁷

2.11.1. Pruebas de función hepática

Las pruebas de función hepática consisten en la medición en sangre de la concentración de bilirrubina y de la actividad de ciertas enzimas presentes en el hígado denominadas alanina aminotransferasa (ALT), aspartato aminotransferasa (AST), fosfatasa alcalina (FA) y gamma glutamil transferasa (GGT). La elevación de sus valores normales nos indica que existe una

lesión del hígado (aunque también pueden alterarse en procesos no hepáticos). La bilirrubina es un producto de degradación de los glóbulos rojos que el hígado se encarga de eliminar; su aumento en sangre traduce un exceso en su producción que sobrepasa la capacidad de eliminación del hígado, un fallo en los procesos hepáticos que conducen a su eliminación o una obstrucción de su flujo a través de la vía biliar hacia el intestino. Las transaminasas son enzimas cuya elevación en sangre indica destrucción de las células que las contienen, un aumento marcado de estas enzimas suele indicar una importante destrucción de células hepáticas. La ALT y la AST son los indicadores más utilizados para evaluar la necrosis hepática; la ALT es más específica que la AST, ya que esta no solo se encuentra en el hígado sino también en el músculo esquelético, cardíaco, riñón y eritrocitos.²⁸

La lesión hepática aguda suele mostrar grados variables de inflamación y necrosis de predominio centrolobulillar, colestasis hepática, canalículos biliares dilatados con trombos de bilis y lesiones granulomatosas. Las lesiones crónicas pueden ser inflamatorias y/o necróticas, colestásicas, esteatóticas, por fosfolipidosis, fibrosis hepática, cirrosis, lesiones vasculares, granulomatosas o neoplásicas.²⁹

Tabla 1. Tipos de lesión hepática dependiendo del tipo de célula afectada

TIPO DE CÉLULA AFECTADA	CUADRO CLÍNICO-PATOLÓGICO
Hepatocito	-Hepatitis aguda hepatocelular -Hepatitis colestásica/mixta aguda -Hepatitis granulomatosa -Hepatitis crónica -Esteatosis/esteatohepatitis -Adenoma/adenocarcinoma hepático
Colangiocito	-Colestasis aguda y crónica -Colangitis esclerosante
Célula endotelial	-Enfermedad veno oclusiva -Dilatación sinusoidal -Peliosis hepática -Síndrome Budd-Chiari
Células estrelladas	-Fibrosis perisinusoidal

2.12. Nefrotoxicidad

El aparato urinario está constituido por los dos riñones, dos uréteres, la vejiga y la uretra. Dentro de sus funciones, podemos encontrar que los riñones regulan el volumen y la composición de la sangre, ayudan a regular la presión sanguínea, sintetizan glucosa, liberan eritropoyetina, participan en la síntesis de la vitamina D, controlan la concentración de electrólitos (Na⁺, K⁺, HCO₃⁻ y otros iones) y el pH del plasma, y excretan desechos en la orina. Algunos de los desechos excretados son el producto de reacciones metabólicas en el organismo; otros residuos que se excretan con la orina son sustancias que no pertenecen a la dieta, como fármacos y toxinas ambientales.²⁷

2.12.1. Evaluación de la función renal

2.12.1.1. Análisis de orina

Comprende la evaluación tanto de la cantidad como de la calidad de la orina y de las concentraciones de productos de desecho de la sangre. Los solutos típicamente presentes en la orina son los electrolitos filtrados y secretados que no se reabsorben, la urea (degradación de proteínas), la creatinina (degradación de fosfocreatina en fibras musculares), ácido úrico (degradación de ácidos nucleicos), urobilinógeno (degradación de hemoglobina) y pequeñas cantidades de otras sustancias como ácidos grasos, pigmentos, enzimas y hormonas. Si una enfermedad, fármaco o toxina, altera el metabolismo corporal o la función renal, pueden aparecer vestigios de sustancias que normalmente no están presentes en la orina.^{27, 28}

2.12.1.2. Pruebas sanguíneas

Dos pruebas de detección en sangre pueden darnos información acerca de la función renal.

Nitrógeno Ureico Sanguíneo (BUN): Mide el nitrógeno sanguíneo que forma parte de la urea resultante del catabolismo y desaminación de los aminoácidos. Cuando la filtración glomerular disminuye mucho, el BUN aumenta notablemente.

Creatinina plasmática: Su excreción es muy cercana a la Tasa de Filtración Glomerular (TFG), una disminución anormal de la TFG determina que la concentración plasmática de creatinina aumente. En consecuencia, una simple medición de la concentración de creatinina en sangre puede indicar si la TFG es normal y suministra información acerca de la salud y función de los riñones.

Aclaramiento plasmático renal: Nos indica la efectividad con que los riñones depuran una sustancia del plasma sanguíneo. La depuración plasmática renal es el volumen de plasma del cual se elimina por completo una sustancia en un minuto por excreción en la orina.^{30, 31}

Dado que existe una correlación directa entre el tiempo de detección de la insuficiencia renal y la mortalidad, la comprensión temprana de las características de los fármacos que pueden causarla, y la intervención oportuna pueden reducir la morbilidad y la mortalidad. De acuerdo con el curso de la enfermedad y los indicadores anteriores, la nefrotoxicidad se divide en dos categorías, toxicidad crónica y aguda.^{32, 33}

En el estudio histológico podemos observar las siguientes alteraciones glomerulares, tubulares e intersticiales: congestión glomerular, dilatación de la cápsula de Bowman, inflamación glomerular, túbulos renales aumentados, cariorrexis, cariólisis, infiltración de células inflamatorias, congestión, necrosis, degeneración hidrópica, dilatación y congestión de vasos sanguíneos, gotas y precipitaciones hialina, edema intersticial y fibrosis.³⁴

2.13. Evaluación del efecto tóxico sobre el Sistema Nervioso

El sistema nervioso se divide en sistema nervioso central (SNC), el cual incluye al encéfalo y la médula espinal, y el sistema nervioso periférico (SNP), que comprende los pares craneales que surgen desde el encéfalo y los nervios espinales que surgen a partir de la médula espinal. Las neuronas son las subunidades estructurales y funcionales básicas del sistema nervioso; están especializadas para responder a estímulos físicos y químicos, conducir impulsos electroquímicos, y liberar reguladores químicos. Por medio de estas actividades, las neuronas permiten la percepción de estímulos sensoriales, el aprendizaje, la memoria, y el control de músculos y glándulas.³¹

La neurotoxicidad es un término que hace referencia a aquellas alteraciones funcionales, estructurales y bioquímicas producidas en el sistema nervioso y que conllevan a la manifestación de diferentes clases de efectos adversos como consecuencia de una exposición a un producto químico. Un efecto adverso implica un cambio que produce una desregulación o alteración del sistema nervioso. La naturaleza de dicho cambio puede ser neuroquímica, morfológica, o relacionada con la conducta y puede manifestarse transitoria o permanentemente.³⁵

Las manifestaciones neurológicas pueden variar desde irritabilidad y agitación hasta

depresión del SNC; que varía de letargia a coma, convulsiones, movimientos anormales y síntomas focales, siendo frecuente la depresión respiratoria en las intoxicaciones graves.³⁶

El efecto adverso producido por un neurotóxico depende de numerosos factores (propiedades fisicoquímicas del agente químico, la dosis y vía de exposición), así como de otros parámetros como la edad, sexo, estado de salud general, factores dietéticos o sensibilidad. Las exposiciones a sustancias neurotóxicas pueden producir tres tipos de alteraciones principales:

- a. Alteraciones sensoriales en cualquiera de los cinco sentidos.
- b. Alteraciones motoras.
- c. Alteraciones en la capacidad de aprendizaje, retención de memoria, cambios emocionales.³⁵

2.13.1. Prueba de Irwin

La prueba de Irwin se utiliza para evaluar los efectos de un fármaco o una nueva molécula sobre el comportamiento y la función fisiológica, desde la primera dosis que tiene efectos observables hasta dosis que inducen una clara toxicidad del comportamiento o incluso la muerte. Esta prueba también proporciona una estimación inicial de la duración de la acción del fármaco en los diferentes puntos finales.³⁷

La observación contiene los siguientes tipos de elementos: mortalidad, sedación, excitación, estereotipias, agresividad, cola de Straub, convulsiones, temblor, exoftalmos, salivación, lagrimeo, piloerección, defecación, miedo, reactividad al tacto, tono muscular, pérdida del reflejo de enderezamiento, sueño, incoordinación motora, catalepsia, tracción, reflejo corneal, analgesia, respiración, marcha, diámetro pupilar y temperatura rectal. Cada síntoma se evalúa observando el comportamiento espontáneo del animal o sometiendo al animal a manipulaciones estandarizadas como suspensión en una barra horizontal (tracción), posición anormal impuesta (catalepsia), presión bilateral en los flancos (tono muscular) o pellizcos en la cola (analgesia). Utilizando la prueba de Irwin, el farmacólogo conductual puede obtener una idea rápida de la toxicidad del compuesto, sus principales efectos conductuales, su duración y, lo que es más importante, una estimación del rango de dosis que se investigará en pruebas posteriores.³⁸

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Malvaviscus arboreus es una especie empleada en la medicina tradicional mexicana, la cual presenta efecto antimutágeno, antiinflamatorio y propiedades gastroprotectoras, por lo cual es útil en el manejo terapéutico de las úlceras gástricas, así como un papel beneficioso en diferentes enfermedades neurodegenerativas y en cáncer. Sin embargo, para continuar con el estudio sistemático de esta especie vegetal, será necesario llevar a cabo un diseño con un componente toxicológico, para lograr en un futuro, el desarrollo tecnológico de un fitomedicamento. Dicha evaluación toxicológica deberá considerar efectos sistémicos, en lo referente a la administración y manejo del fármaco; y efectos particulares en lo referente a órganos y sistemas; por lo cual proponemos los abordajes donde se consideran la neurotoxicidad, genotoxicidad, así como la toxicidad hepática y renal ya que son las principales vías de eliminación de las sustancias. Actualmente la existencia de plantas con potencial terapéutico constituye una alternativa para el tratamiento de diversas patologías, por lo cual es de suma importancia el llevar a cabo estudios preclínicos y así detectar sus posibles efectos; debido a que existe escasa información sobre la toxicología de *Malvaviscus arboreus* en la bibliografía.

3.1. Justificación

Las plantas medicinales y aromáticas juegan un papel importante en el cuidado de la salud de las personas en el mundo, resultando la fitoterapia ser más útil que la medicina moderna para el tratamiento de ciertas enfermedades crónicas y con menos efectos secundarios.

Los antecedentes acumulados de los efectos biológicos de la planta comestible *Malvaviscus arboreus*, son importantes para la salud humana y llevan a plantear una propuesta de análisis toxicológico.

Aún no existen datos sobre estudios toxicológicos aplicados a *Malvaviscus arboreus*, por lo que existe el interés de plantear la presente propuesta con la intención futura de llegar a un fitomedicamento con utilidad clínica y poder utilizar su potencial antiinflamatorio para el tratamiento de diversas patologías.

3.2. Pregunta de investigación

¿Cuál es el perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*?

4. HIPÓTESIS

El extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus* a una dosis de 1000 mg/kg de peso corporal no inducirá toxicidad ni alteraciones a nivel tisular en hígado y riñones, bajo un esquema de administración subcrónica (vía oral) en ratones.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Evaluar el efecto tóxico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*.

5.2. Objetivos específicos

1. Evaluar la toxicidad renal de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*.
2. Evaluar la toxicidad hepática de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*.
3. Evaluar la toxicidad en sistema nervioso central de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Aprobación del protocolo, diseño y desarrollo de los tratamientos

El protocolo fue sometido a consideración en el Comité Local de Investigación en Salud del IMSS, recibiendo el número de Registro R-2022-1701-006.

6.2. Diseño y desarrollo de los tratamientos

Material vegetal:

El material vegetal fue obtenido mediante el cultivo de la planta en las instalaciones del CIBIS, en Xochitepec, Morelos. Identificado por el M. en C. Gabriel Flores Franco, curador del herbario HUMO de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), con número de registro 34413.

Material biológico:

Se utilizaron ratones hembra (BALB/c) con un peso promedio de 22 gramos, mantenidos en el bioterio del CIBIS bajo condiciones estándar de iluminación con 12 horas de luz/oscuridad y acceso libre al consumo de agua y alimento, a una temperatura de 24 grados centígrados.

Obtención del extracto:

Solo se utilizaron las flores, las cuales fueron secadas a temperatura de 40 °C en una estufa provista de un sistema de recirculación de aire y trituradas manualmente hasta obtener un tamaño de partícula de 4-6 mm. Posteriormente, se realizó la maceración del material vegetal en agua a temperatura de 80 grados centígrados. El extracto acuoso se filtró y concentró mediante un proceso de destilación a presión reducida usando un rota- evaporador (LABOROTA 4000) hasta obtener un extracto semisólido con una concentración de 1000 mg/ml del extracto. Para determinar el rendimiento, el extracto se aforó a 500 mL y se prepararon 5 viales de 14 mL a los que se les adicionó un volumen de 500 µL del extracto para un posterior proceso de evaporación en una parrilla de calentamiento. Cuando el extracto quedó completamente seco, se volvió a pesar cada uno de los recipientes obteniendo así la cantidad de extracto que había en 500 µL y por un proceso aritmético se obtuvo la cantidad total de extracto obtenido.

Estandarización del extracto:

Para determinar la concentración de los flavonoides glicosilados mayoritarios, se utilizó el método de cromatografía de líquidos de alta resolución previamente descrito por el grupo de

investigación (Campos-Vidal 2021). Se utilizó sistema cromatográfico de HPLC equipado con un módulo de separación Alliance 2995 y un detector de arreglo de Photodiodos 2996 de la marca Waters. Las muestras fueron diluídas a una concentración de 2 mg/mL fueron inyectadas en un volumen de 10 uL en una columna de fase reversa (Supelcosy LCF, tamaño de partícula de 5 micras) de 25 cm de largo y 4 mm de diámetro. El sistema de elusión corresponde a un gradiente de ácido trifluoroacético al 0.5 como disolvente A y acetonitrilo como disolvente B. Los cambios de concentración de cada disolvente fueron: 0-1 min 0% de B; 2-3 min 5% de B; 4-20 min 30% de B; 21-23 min 50% de B; 24-25 min 80% de B; 26-27 min 100% de B con un retorno al 0% de B en los minutos 28-30. Durante los 30 minutos del tiempo total del análisis, se utilizó un flujo de 0.9 mL/min. Finalmente, para la identificación de los flavonoides, se analizó el cromatograma de cada muestra a una longitud de onda de 350 nm.

6.3. Exposición subcrónica

Se llevó a cabo con 2 grupos, cada uno compuesto por 10 ratones hembra BALB/c. El grupo 1 (grupo de agua) fue expuesto a la ingesta diaria de agua purificada mediante uso de una cánula esofágica de acero inoxidable para su administración oral, en el mismo volumen y horario que el resto de los animales durante un periodo de 28 días. El grupo 2 fue expuesto a la dosis de 1000 mg/kg/día del extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*, diariamente mediante uso de cánula esofágica de acero inoxidable durante un periodo de 28 días (Tabla 2).

Tabla 2. Grupos experimentales de toxicidad subcrónica

GRUPO 1	GRUPO 2
Agua purificada (28 días)	Extracto acuoso MaAq 1000 mg/kg (28 días)

El día 1 y 21 del estudio se realizó la medición de glucosa en ayuno de 8 horas, con un glucómetro marca Accu-chek, mediante toma de muestra por punción de la cauda. El último día del estudio (día 28) se colocaron los animales en jaulas metabólicas por un periodo de 24 horas para la obtención de orina y así poder realizar el análisis de proteínas y creatinina en

orina; periodo durante el cual permanecieron en un periodo de ayuno de 8 horas (con acceso libre al agua) previo al sacrificio. El último día se realizó la prueba de tolerancia la glucosa (75 gramos de azúcar + 280 ml de agua potable), administrando la solución azucarada de acuerdo con el peso de cada animal (dosis única) y tomando muestra de glucosa mediante corte en la cauda usando tiras reactivas al minuto 0, 30, 60, 90 y 120; posteriormente se realizó el cálculo del Área Bajo la Curva (AUC) para el reporte estadístico.

Bajo anestesia profunda inducida con 50 mg/Kg de pentobarbital sódico (ANESTESAL de PFIZER), se tomó una muestra sanguínea del seno venoso orbital a 6 de los ratones de cada grupo; recuperando el suero para valorar los parámetros de AST, ALT, creatinina y proteínas; además se pesaron y congelaron los órganos para examinarlos posteriormente. Los otros 4 animales restantes de cada uno de los grupos fueron sometidos a perfusión (previa anestesia profunda inducida con 50 mg/Kg de pentobarbital sódico) con formaldehído al 5% extrayendo posteriormente los órganos (hígado y riñones) de cada uno de los animales, los cuales se colocaron en formaldehído al 10% para su posterior análisis histológico.

6.4. Evaluación de la toxicidad en sistema nervioso central y periférico/Prueba de Irwin

Se evaluó a través de la observación de parámetros conductuales incluidos en la prueba de neurotoxicidad de Irwin, diariamente a los 10 minutos, 30 minutos, 1 hora, 2 horas y 4 horas posteriores a la administración del agua purificada (grupo 1) y del extracto (grupo 2) durante el primer día de administración y posteriormente cada 24 horas (previo y posterior a la administración vía oral) durante los 28 días de duración del estudio (Tabla 3).

Los parámetros evaluados fueron los siguientes:

a) Estado de alerta

-Pasividad: Mostrar inacción de movimientos.

-Estereotipia: Repetición de movimientos a consecuencia de la sustancia administrada.

b) Irritabilidad

-Grooming: Limpiarse continuamente la cabeza y cara con las patas delanteras. Característica exacerbada en un estado de ansiedad.

-Acicalamiento: Conducta de limpieza exacerbada y repetitiva. Puede ocasionar lesiones en la piel, dermatitis o alopecia.

-Hiperactividad: Estado continuo de movimientos y traslado total.

-Agresión: Comportamiento de evitación al contacto y agresión.

c) Excitación del SNC

-Tremor, espasmos y convulsiones: Descargas y desbalance de neurotransmisores; actividad eléctrica anormal en un área del cerebro, desde leve a muy alta.

d) Incoordinación motriz

-Reflejo de enderezamiento e incapacidad de caminar: Capacidad de corregir la orientación del cuerpo cuando se saca de su posición vertical normal. Funcionalidad del sistema vestibular, que detecta si el cuerpo está erguido y hace que la cabeza vuelva a su posición mientras el resto del cuerpo lo sigue.

e) Tono muscular

-Actividad prensil: Reflejo para asirse con el tren posterior.

-Tono muscular de tren trasero: Su disminución indica sedación del SNC.

f) Reacciones autonómicas

-Salivación, apertura palpebral, exoftalmia, piloerección, urinación, aumento de frecuencia respiratoria, cambio de color de piel: Reflejo que se desarrolla en el sistema nervioso vegetativo, signos físicos debidos a respuestas viscerales y endocrinas. Posible acción sobre SNA, por estimulación simpática (receptores α -adrenérgicos) o parasimpática (receptores muscarínicos).

g) Misceláneo

-Defecación: Acto de expulsión de elementos que durante el proceso de digestión no han sido absorbidas por algún tramo del aparato digestivo.

Tabla 3. Evaluación de la toxicidad en sistema nervioso central y periférico/Prueba de Irwin

RATÓN	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Peso semanal										
Pasividad										
Estereotipia										
<i>Grooming</i>										
Acicalamiento										
Vocalización										
Hiperactividad										
Agresión										
Tremor										
Espasmos										
Convulsiones										
Reflejo de enderezamiento										
Incapacidad de caminar.										
Actividad prensil										
Tono muscular de tren trasero										
Salivación, Apertura palpebral, exoftalmia, piloerección, urinación, aumento de tasa respiratoria, cambio de color de piel										
Defecación										

Anotaciones de los resultados:

- 0=Ausencia
- 1= Leve
- 2= Moderado
- 3= Severo

6.5. Evaluación de la hepatotoxicidad y nefrotoxicidad

Una vez extraídos los órganos, se calculó el porcentaje correspondiente del peso total. Se cuantificaron en suero las transaminasas (ALT, AST) para valorar la función hepática, creatinina y proteínas para valorar la función renal, utilizando una técnica colorimétrica de Bradford y el cálculo de la depuración de creatinina en orina.

6.5.1. Técnica histológica

Los órganos se fijaron en una solución de formaldehído 10% en PBS, y se deshidrataron en etanol (Tabla 4). Se procedió al aclaramiento del tejido por inmersión en dimetilbenceno (xilol), el cual permite una adecuada penetración de la parafina. Los tejidos se impregnaron con 2 baños sucesivos de parafina líquida (60 minutos cada uno), la cual funciona como medio de inclusión y permite realizar cortes finos en el tejido preparado, para colocarlos en casetes para inclusión (Simport). Las preparaciones se dejaron secar a temperatura ambiente y se procedió a cortarlos (5 μ de grosor) con un micrótomo Kedee (KD2258). Los cortes se colocaron en un baño de flotación (39°C) con agua, se montaron en portaobjetos, y se secaron a 50°C (30 min), para su posterior tinción con Hematoxilina-Eosina para su análisis al microscopio óptico.

Tabla 4. Soluciones para la deshidratación y aclaramiento de los tejidos

NÚMERO DE FRASCO	REACTIVO	TIEMPO (MIN)
1	Agua destilada	30
2	Etanol 70%	30
3	Etanol 80%	30
4	Etanol 90%	30
5	Etanol 100%	60
6	Alcohol isobutílico	60
7	Etanol -Xilol 50-50%	60
8	Xilol 100%	60
9	Xilol 100%	60

6.6. Descripción de variables

VARIABLES INDEPENDIENTES O DE INTERVENCIÓN						
TRATAMIENTO EXPERIMENTAL		Extracto de la especie <i>Malvaviscus arboreus</i> estandarizado en sambubiósido y sofrorósido de kaempferol				
Dosis		1000 mg/kg/día por vía oral y administrado por un periodo de 28 días				
Tipo de variable		Cualitativa nominal				
Escala de medición		0=ausente y 1=presente				
TRATAMIENTO CONTROL		Agua purificada envasada de marca comercial				
Dosis		1000 mg/kg/día por vía oral y administrado por un periodo de 28 días				
Tipo de variable		Cualitativa nominal				
Escala de medición		0=ausente y 1=presente				
VARIABLES DEPENDIENTES O DE DESENLACE						
PRUEBA DE IRWIN						
VARIABLE		DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	MODO DE OBTENCIÓN
ESTADO DE ALERTA	Pasividad	Característica etológica con base en el movimiento común del roedor	Mostrar inacción de movimientos	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Estereotipia	Comportamiento repetitivo, invariable y sin un propósito o función apreciables	Repetición de una misma secuencia de movimientos a consecuencia de la sustancia administrada	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Grooming	Característica exacerbada en un estado de ansiedad	Limpiarse continuamente la cabeza y cara con las patas delanteras	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Acicalamiento	Conducta de limpieza exacerbada y repetitiva	Puede ocasionar lesiones en la piel, dermatitis o alopecia			

IRRITABILIDAD	Vocalización	Sonidos audibles, intensos y frecuentes	Sonoridad vocal no acorde con un animal adulto, no relacionadas con la integración entre pares	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Hiperactividad	Aumento de movilidad exploratoria	Estado continuo de movimientos y traslado total	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Agresión	Aumento del estado ofensivo	Comportamiento de evitación al contacto y agresión interespecífica	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3

EXCITACIÓN DEL SNC	Tremor	Descargas y desbalance de neurotransmisores. Actividad eléctrica anormal en un área del cerebro	Alteración eléctrica repentina y no controlada en el cerebro, desde leve a muy alta	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Espasmos					
	Convulsiones					
INCOORDINACIÓN MOTRIZ	Reflejo de enderezamiento	Capacidad de corregir la orientación del cuerpo cuando se saca de su posición vertical normal	Funcionalidad del sistema vestibular, que detecta si el cuerpo está erguido y hace que la cabeza vuelva a su posición mientras el resto del cuerpo lo sigue	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Incapacidad de caminar					
TONO MUSCULAR	Actividad prensil	Reflejo para asirse con el tren posterior	Capacidad de los roedores a permanecer asidos a pesar de movimientos sorpresivos	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
	Tono muscular del tren trasero	Signo de integridad del SNC	Su disminución indica sedación del SNC	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3

REACCIONES AUTONÓMICAS	Salivación, apertura palpebral, exoftalmia, piloerección, urinación, aumento de tasa respiratoria, cambio de color de piel	Reflejo que se desarrolla en el sistema nervioso vegetativo	Signos físicos debidos a respuestas viscerales y endócrinas	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3
MISCELÁNEO	Defecación	Acto de expulsión de elementos que durante el proceso de digestión no han sido absorbidas por algún tramo del aparato digestivo	Cantidad de bolas fecales totales que el animal deja al finalizar la prueba	Cualitativa ordinal	0=Ausente 1=Leve 2=Moderada 3=Severa	Anexo 3

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	MODO DE OBTENCIÓN
PESO	Masa de un individuo, considerando se encuentre bajo el influjo de la gravedad terrestre	Valor en gramos tomado diariamente mediante báscula digital con sensibilidad en centésimas de gramo	Cuantitativa continua	gramos	Báscula digital
PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA	Método de laboratorio para verificar la forma en que el cuerpo moviliza el azúcar de la sangre a los tejidos como a los músculos y a la grasa.	Corte en la cauda para obtener una gota de sangre y analizar en glucómetro al minuto 0, 30, 60, 90 y 120.	Cuantitativa continua	mg/dl	Glucómetro
AST	Enzima aminotransferasa que se encuentra en varios tejidos del organismo de los mamíferos, especialmente en el corazón, el hígado y el tejido muscular	Análisis bioquímico del suero obtenido mediante punción del seno venoso orbitario	Cuantitativa continua	UI/l	Reactivo

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICIÓN	MODO DE OBTENCIÓN
ALT	Enzima que pertenece al grupo de las aminotransferasas, que se encuentra principalmente en las células del hígado	Análisis bioquímico del suero obtenido mediante punción del seno venoso orbitario	Cuantitativa continua	UI/l	Reactivo
CREATININA	Molécula orgánica que es filtrada por los riñones y desechada a través de la orina, generada por el metabolismo de los músculos	Análisis bioquímico del suero obtenido mediante punción del seno venoso orbitario	Cuantitativa continua	mg/dl	Reactivo
PROTEÍNAS	Molécula compuesta de aminoácidos que el cuerpo necesita para funcionar de forma adecuada	Análisis bioquímico del suero obtenido mediante punción del seno venoso orbitario y de la orina recolectada por 24 horas	Cuantitativa continua	mg/dl	Reactivo
HEPATOTOXICIDAD	Lesión o daño hepático causado por la exposición a un medicamento u otros agentes, con daño funcional o anatómico	Alteraciones visibles en microscopía óptica	Cualitativa nominal	1= no 2= si	Histología
NEFROTOXICIDAD	Lesión o daño renal causado por la exposición a un medicamento u otros agentes, con daño funcional o anatómico	Alteraciones visibles mediante microscopía óptica	Cualitativa nominal	1= no 2= si	Histología

6.7. Análisis estadístico

Estadística descriptiva: Las variables cualitativas se reportaron con frecuencias y porcentajes; las variables cuantitativas con medidas de tendencia central y dispersión. Para la estadística comparativa de variables cuantitativas se empleó la prueba de t de Student y para variables cualitativas la prueba exacta de Fisher.

Valores de $p \leq 0.05$ se emplearon para rechazar hipótesis de nulidad o no diferencias.

6.8. Escritura de tesis y obtención de grado

Posterior al análisis estadístico de los datos, se procedió a la escritura de la tesis, según el formato de la Facultad de Medicina de la UAEM y de acuerdo con los criterios para la elaboración del protocolo de investigación que establece el Instituto Mexicano del Seguro Social.

6.9. Conflictos de interés

No existen conflictos de interés.

7. ASPECTOS ÉTICOS

En el proyecto se siguieron las recomendaciones del MANUAL DE PROCEDIMIENTOS RECOMENDABLES PARA INVESTIGACIÓN CON ANIMALES y se apegó a las normas de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. La manipulación de los animales de laboratorio se realizó en apego a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, sobre técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio. Según esta norma, el sacrificio de los animales debe hacerse con procedimientos que “induzcan de manera humanitaria la muerte de los animales (eutanasia) empleados en la investigación científica, con el propósito de eliminar o disminuir al mínimo el dolor y el estrés previo y durante el procedimiento”.^{39, 40}

Por lo que, en este trabajo una vez que los animales han sido sujetos de estudio, se sacrificaron con sobredosis de pentobarbital sódico. Se seleccionó dicha técnica debido a que los barbitúricos en general son aceptados por la NOM-062-ZOO-1999 para la eutanasia, “ya que inducen inconsciencia con solo el dolor mínimo ocasionado por la introducción de la aguja; y la vía intraperitoneal también es permitida como sustitución de la endovenosa”.

El CIBIS cuenta con las instalaciones de laboratorios en estado adecuado de operación, con las condiciones de luz-oscuridad, temperatura, mesas de trabajo y equipo necesario para llevar a cabo los diseños experimentales propuestos.

Los investigadores y los estudiantes que trabajen en el proyecto conocen el manejo de animales y solventes que se usarán durante la realización de esta propuesta de investigación, Todas las condiciones de seguridad se mantuvieron a lo largo del desarrollo de este trabajo.

8. ASPECTOS DE BIOSEGURIDAD

El estudio se llevó a cabo de acuerdo con la normatividad institucional sobre bioseguridad.

8.1. Evidencia documental

Existe evidencia documental auditable en el sitio donde se desarrolla el protocolo acerca de:

- Los permisos y/o licencias oficiales que se requieren para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- Las instalaciones de los laboratorios involucrados se encuentran en estado satisfactorio de operación y son adecuadas para llevar a cabo el trabajo propuesto.
- El equipo utilizado se encuentra en estado satisfactorio de operación.
- Existen dispositivos personales de protección que se encuentran en estado satisfactorio de operación.
- Los involucrados en el protocolo, incluyendo a los estudiantes que participan en el mismo, han recibido la capacitación necesaria para trabajar con el material señalado anteriormente.
- Se mantuvieron las condiciones adecuadas de las instalaciones, equipo y personal durante el desarrollo del protocolo.

8.2. Transporte y embalaje de las muestras de vegetales

El transporte de las muestras vegetales y animales se llevó a cabo en embalajes individuales que evitaron su derrame o descomposición y que estuvieron etiquetados con el tipo de muestra que contienen y su clave de identificación, además de un recipiente externo que permitió su transporte sin riesgo de derrames.

En el caso de las muestras vegetales, todas se transportaron en estado seco (sin solventes).

Las plantas frescas se transportaron en bolsas de plástico durante periodos cortos de tiempo.

Las plantas secas se transportaron en bolsas de papel.

Los extractos, fracciones y compuestos se transportaron en frascos de vidrio sellados.

8.3. Desecho de Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos y de Químicos Corrosivos, Reactivos, Tóxicos e Inflamables

La investigadora responsable del proyecto manifiesta que se cumplieron:

- a) El Reglamento de la Ley General de Salud en materia de Investigación en Salud, especialmente sus artículos 78 y 83.

- b) El Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud.
- c) El Manual de Procedimientos para el Manejo y Control de Residuos Biológico Infecciosos y Tóxico peligrosos en Unidades Médicas del IMSS.
- d) La norma NOM-087-ECOL- SSA1-2002 y NOM-052-SEMARNAT-2005 que establece las características, el proceso de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos biológico-infecciosos.
- e) La Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio.
- f) Asimismo, el estudio se apegó al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de control sanitario de la Disposición de Órganos, Tejidos y Cadáveres de Seres Humanos Capítulo I al XI y transitorio.
- g) Para el desecho de sustancias y residuos peligrosos el CIBIS, a través del Departamento de Servicios Generales Delegacional, cuenta con un contrato anual con la empresa Medam Transportes S.A de C.V., la cual se encarga periódicamente del retiro, transporte, disposición e inactivación.

9. RESULTADOS

El rendimiento del extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus* (MaAq), se calculó de la siguiente forma:

$$\frac{\text{Gramos de extracto}}{\text{Gramos de planta seca}} \times 100$$

De un total de 62 gramos de planta seca, se obtuvo un total de 18.25 gramos de extracto lo que representa un rendimiento del 29.66 %

La estandarización del extracto se llevó a cabo en relación con los flavonoides más abundantes en la planta de *Malvaviscus arboreus*: soforósido de kaempferol y sambubiósido de kaempferol¹³ (Figura 6).

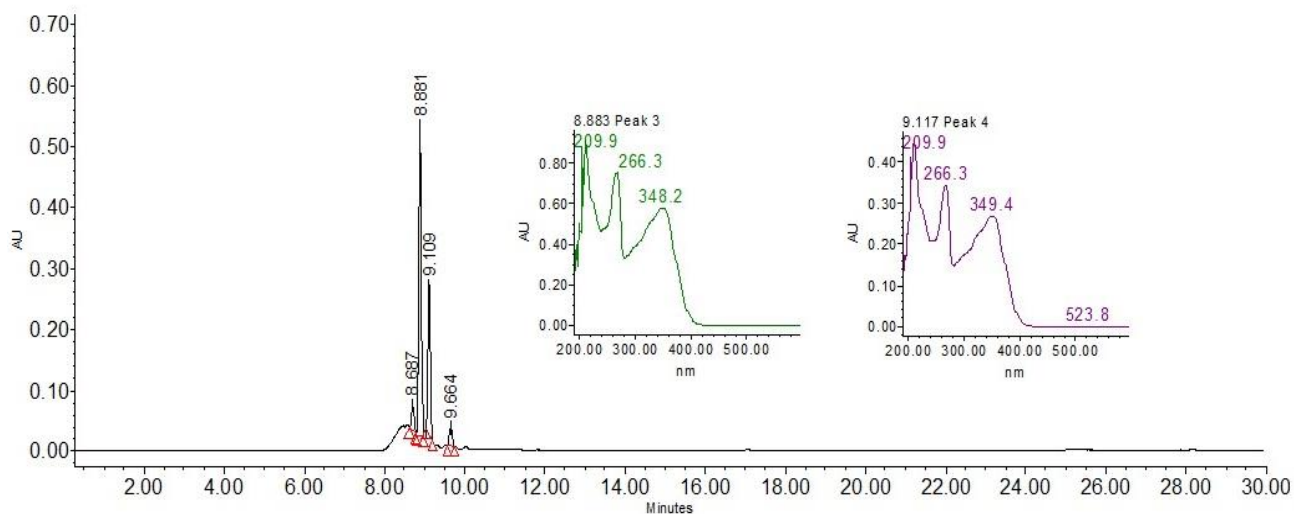


Figura 6. Cromatograma de la cuantificación de los glicósidos de kaempferol del extracto de *Malvaviscus arboreus*. Eje de las X corresponde al tiempo, el eje de las Y corresponde a la absorbancia. * Soforósido de kaempferol y * Sambubiósido de kaempferol.

Tomando en cuenta la curva de calibración del glucósido de quercetina (Figura 6a), se generó la ecuación de cuantificación de la concentración de las muestras del extracto.

$$Y = 16866x + 19586 \quad \text{Por lo tanto: } Y - 19586 = 16866x$$

Por lo tanto $X = (Y - 19586) / 16866 = 72.2 \mu\text{g}$ de sambubiósido de kaempferol /ml de extracto (Tabla 5).

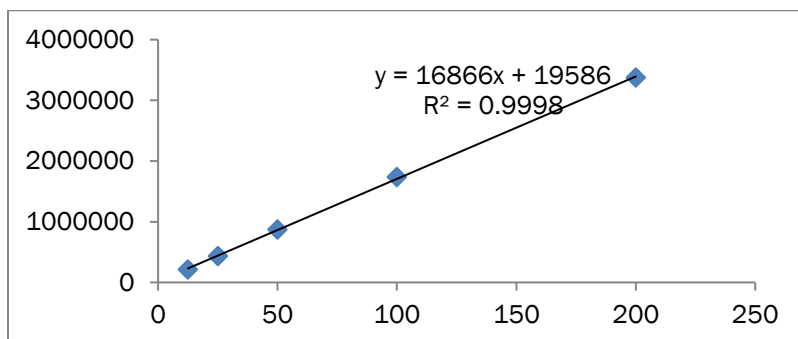


Figura 6a. Curva de calibración glucósido de Quercetina. Eje de las X corresponde a la concentración, el eje de las Y corresponde al Área Bajo la Curva (AUC).

Tomando en cuenta la curva de calibración de rutina (Figura 6b), se generó la ecuación de cuantificación de la concentración de las muestras del extracto.

$$Y = 9713.9x - 10459 \quad \text{Por lo tanto: } Y + 10459 = 9713.9x$$

Por lo tanto $x = (Y + 10459) / 9713.9 = 230 \mu\text{g}$ de soforósido de kaempferol /ml de extracto (Tabla 5).

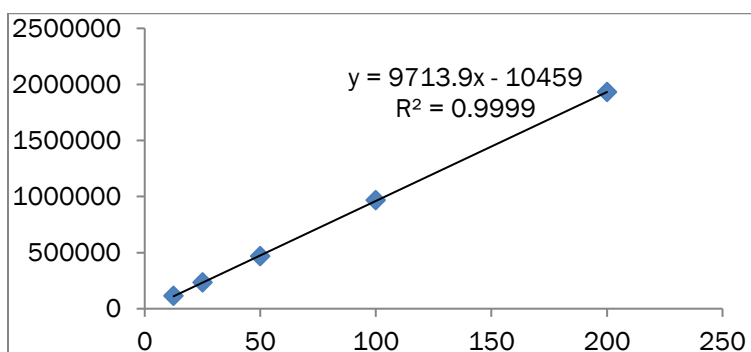


Figura 6b. Curva de calibración Rutina. Eje de las X corresponde a la concentración, el eje de las Y corresponde al Área Bajo la Curva (AUC).

Tabla 5. Concentración de sambubiósido y soforósido de kaempferol en el extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*.

MaAq	AUC 1	AUC 2	AUC 3	AUC PROMEDIO	CONCENTRACIÓN $\mu\text{g/ml}$
Sambubiósido de kaempferol	1225828	1217346	1270145	1237773	72.2
Soforósido de kaempferol	2248453	2166939	2258036	2224476	230

A partir del extracto, se preparó la concentración de 1000 mg/ml; se toma una alícuota de acuerdo con el peso de cada uno de los animales de experimentación para la dosis diaria, la cual se administró durante 28 días (Grupo control=Grupo Agua; Grupo experimental= Grupo MaAq) durante el periodo comprendido del 24 de enero al 20 de febrero del 2023.

Efecto de MaAq en la prueba de Irwin para neurotoxicidad

La observación de los animales se llevó a cabo durante el periodo comprendido del 24 de enero al 20 de febrero.

Previo a la primera administración de ambos grupos, se valoraron los diferentes parámetros de la prueba de Irwin.

Posteriormente se valoraron los distintos parámetros tras la administración de los tratamientos cada 24 horas, periodo durante el cual no se evidenciaron conductas que pudieran denotar algún daño.

En la Tabla 6, se muestran los resultados obtenidos y se observa que la administración diaria de 1000 mg/kg del extracto de *Malvaviscus arboreus*, no produjo síntomas ni cambio en el comportamiento de los animales en comparación con el grupo control.

Tabla 6. Efecto de MaAq en la prueba de Irwin para neurotoxicidad de los tratamientos administrados.
Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=10

TIEMPO	SEMANA 1		SEMANA 2		SEMANA 3		SEMANA 4	
	1	2	1	2	1	2	1	2
Contorsiones abdominales	0	0	0	0	0	0	0	0
Pilo erección	0	0	0	0	0	0	0	0
Ptoxis palpebral	0	0	0	0	0	0	0	0
Disminución motora	0	0	0	0	0	0	0	0
Amontonamientos	0	0	0	0	0	0	0	0
Pérdida de tono muscular	0	0	0	0	0	0	0	0
Tremores	0	0	0	0	0	0	0	0
Parálisis miembros posteriores	0	0	0	0	0	0	0	0
Sialorrea	0	0	0	0	0	0	0	0
Convulsión	0	0	0	0	0	0	0	0
Muerte	0	0	0	0	0	0	0	0
Constipación	0	0	0	0	0	0	0	0
Tratamiento: 1= Grupo agua; 2= Grupo MaAq 0=Ausente; 1=Leve; 2=Moderado; 3=Severo								

Efecto de MaAq sobre el peso de los órganos

El día del sacrificio, a los animales que no fueron sometidos a la prueba de perfusión se les extrajeron los órganos para pesarlos en fresco y calcular el porcentaje de peso relativo al peso total del animal. Macroscópicamente se observó que en el grupo al que se administró MaAq los órganos tenían una coloración rojiza oscura, al igual que en la orina (Imagen 1).

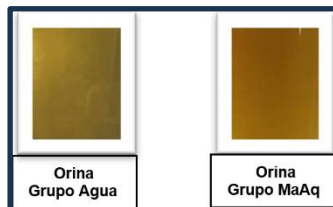
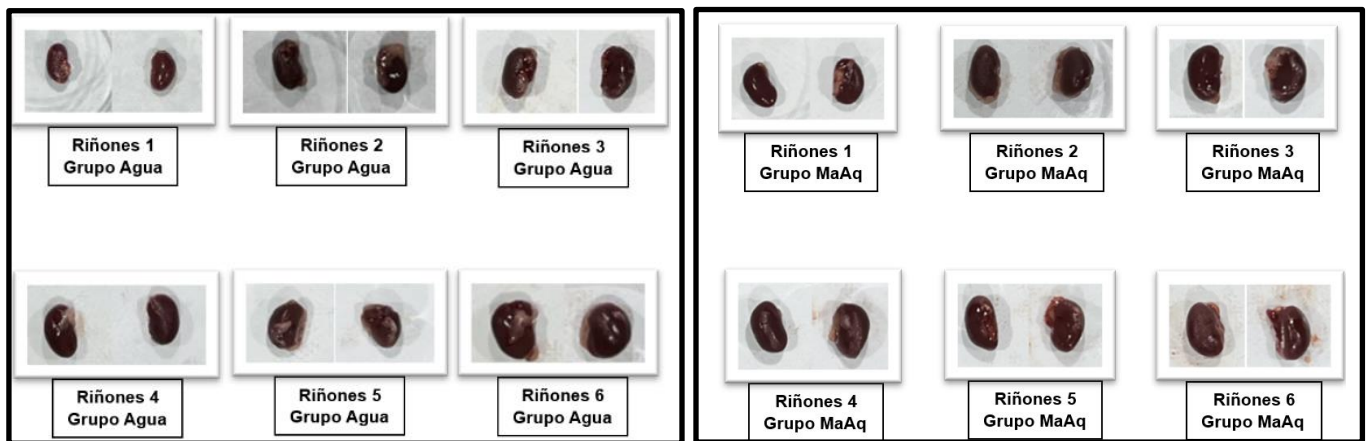
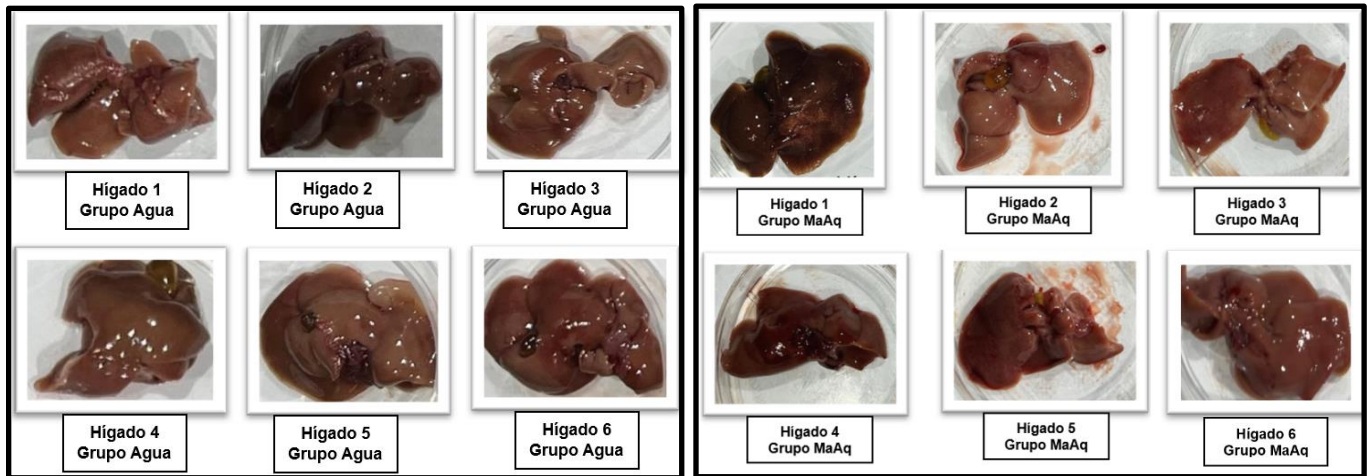


Imagen 1. Características macroscópicas de los órganos de los tratamientos administrados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. (N=6). Imagen tomada con cámara Nikon en caja oscura. (Ángulo superior izquierdo: hígados grupo agua, ángulo superior derecho: hígados grupo MaAq, ángulo inferior izquierdo: riñones grupo de agua, ángulo inferior derecho: riñones grupo MaAq).

Sin embargo, a pesar de los cambios observados macroscópicamente, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de peso relativo en cuanto al peso total de los órganos entre ambos grupos (Figura 7 y tabla 7).

Hígado ($p=0.370$)

Riñón izquierdo ($p=0.453$)

Riñón derecho ($p=0.953$)

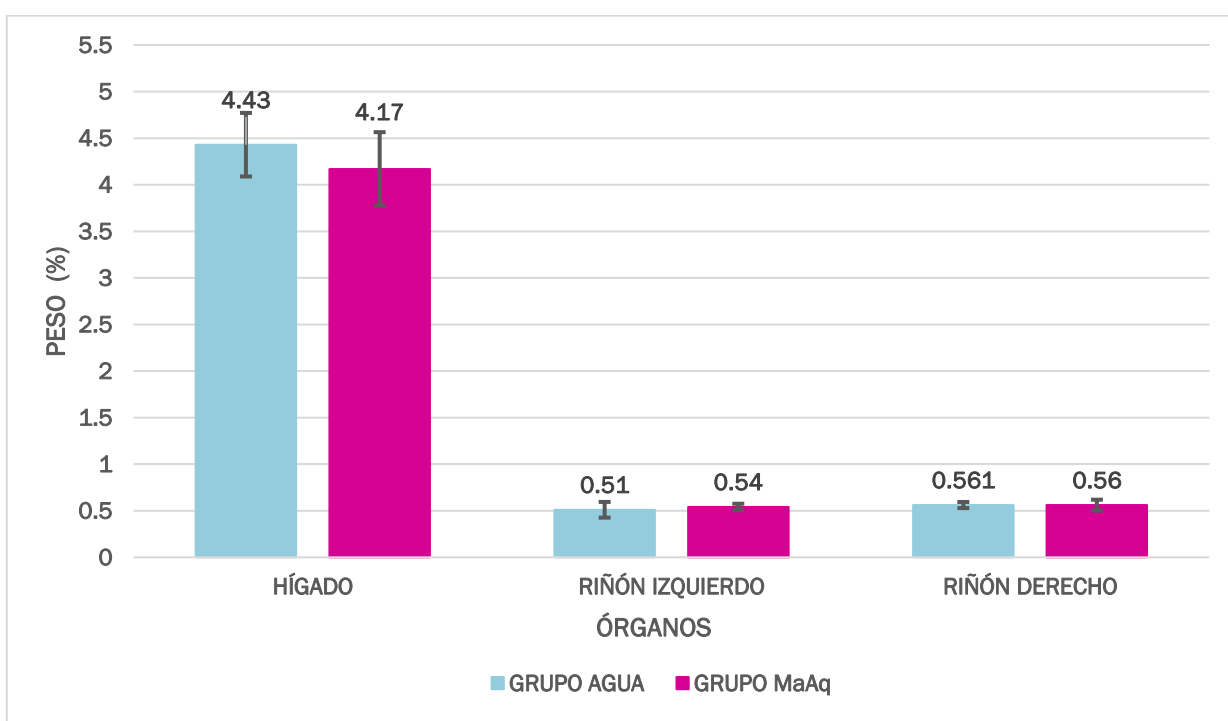


Figura 7. Porcentaje del peso relativo al peso total del ratón de los tratamientos administrados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=6, prueba t de Student (* $p < 0.05$).

Tabla 7. Tabla de media, intervalo de confianza y valor *p* del tratamiento con extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=10, prueba t de Student (* *p* < 0.05).

PESO TOTAL INICIAL DE AMBOS GRUPOS			
GRUPO	MEDIA (g)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	22.92	2.20	0.125
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	21.07		
PESO TOTAL FINAL DE AMBOS GRUPOS			
GRUPO	MEDIA (g)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	23.76	1.90	* 0.020
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	22.06		
PESO GRUPO AGUA			
GRUPO	MEDIA (g)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Peso inicial	22.92	0.643	* 0.003
Peso final	23.76		
PESO GRUPO MALVAVISCUS ARBOREUS			
GRUPO	MEDIA (g)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Peso inicial	21.07	0.528	0.088
Peso final	22.06		
GLUCOSA INICIAL AMBOS GRUPOS			
GRUPO	MEDIA (mg/dl)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	87.60	10.66	0.754
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	89.20		
GLUCOSA FINAL (DÍA 21) AMBOS GRUPOS			
GRUPO	MEDIA (mg/dl)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	91.60	9.61	1.0
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	91.60		
AUC PRUEBA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA			
GRUPO	MEDIA (mg/dl)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	14775	1594.97	* 0.011
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	12210		
TGO (AST)			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	36.74	16.89	0.562
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	41.02		
TGP (ALT)			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	36.17	52.40	0.273
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	9.81		

CREATININA EN ORINA			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	4.65	6.284	0.956
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	5.96		
CREATININA EN SUERO			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	0.34	0.225	* 0.042
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	0.59		
PROTEÍNAS EN ORINA			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	0.697	0.084	* 0.003
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	0.828		
PROTEÍNAS EN SUERO			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	1.468	0.097	* 0.010
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	1.554		
ORINA RECOLECTADA EN 24 HORAS			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	735	7.07	* 0.006
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	400		
DEPURACIÓN DE CREATININA EN ORINA DE 24 HORAS			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	0.176	0.137	0.383
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	0.123		
PESO HÍGADO (%)			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	4.430	0.646	0.370
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	4.170		
PESO RIÑÓN IZQUIERDO (%)			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	0.510	0.090	0.453
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	0.540		
PESO RIÑÓN DERECHO (%)			
GRUPO	MEDIA	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	VALOR P
Agua	0.561	0.066	0.953
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	0.560		

Tabla 7a. Tabla de frecuencias, porcentajes y valor *p* de alteraciones histológicas entre grupos del tratamiento con extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus* vs grupo control (agua). Dosis del extracto 1000 mg/kg/día v.o., por 28 días de tratamiento. N=10, prueba t de Student (* *p* < 0.05).

ALTERACIONES HISTOLÓGICAS EN HÍGADO (grupo MaAq vs grupo control)				
GRUPO	TOTAL	FRECUENCIA	PORCENTAJE	VALOR P
Agua	9	5	55.5%	0.167
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	9	7	77.7%	
ALTERACIONES HISTOLÓGICAS EN RIÑONES (grupo MaAq vs grupo control)				
GRUPO	TOTAL	FRECUENCIA	PORCENTAJE	VALOR P
Agua	7	3	42.8%	0.429
<i>Malvaviscus arboreus</i> (1000 mg/kg)	7	1	14.28%	

Efecto de MaAq sobre las variables bioquímicas

Se llevó a cabo toma de sangre de la cauda mediante tira reactiva (One touch) previo a la administración del extracto, obteniendo parámetros de glucosa el día 1 y 21 del experimento (Figura 8). Sin encontrar diferencias significativas tanto en la glucosa inicial como glucosa final de ambos grupos ($p=0.754$ y $p=1$) (Tabla 7 y figura 8).

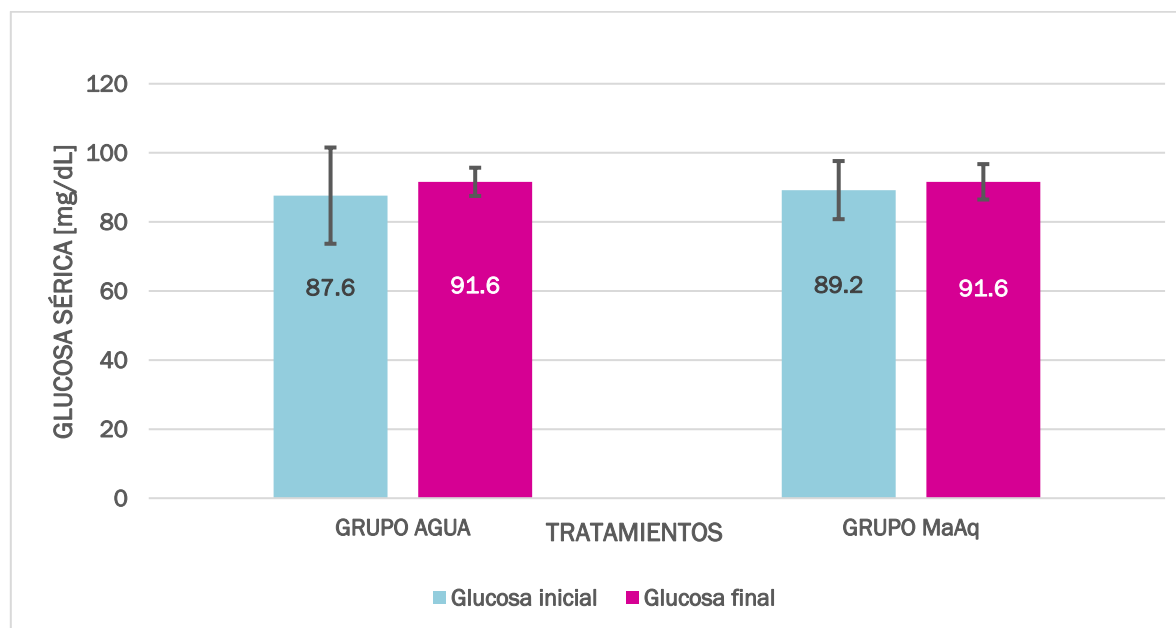


Figura 8. Glicemia por tira reactiva el día 1 y 21 de los tratamientos administrados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=6, prueba t de Student (* *p* < 0.05).

El día previo al sacrificio se mantuvo en ayuno a los animales de experimentación por un periodo de 8 horas dentro de las cajas metabólicas con libre acceso a la ingesta de agua.

Previo al sacrificio, se realizó prueba de tolerancia a la glucosa por lo cual se administró solución glucosada (75 gramos) para iniciar la prueba con toma de muestras de sangre de la cauda al minuto 0, 30, 60, 90 y 120.

Posteriormente se calculó el Área Bajo la Curva (AUC) obteniendo diferencias significativas entre los dos grupos ($p=0.011$) (Tabla 7 y figuras 9, 10 y 11), en la cual se presentó disminución del AUC a favor del grupo experimental.

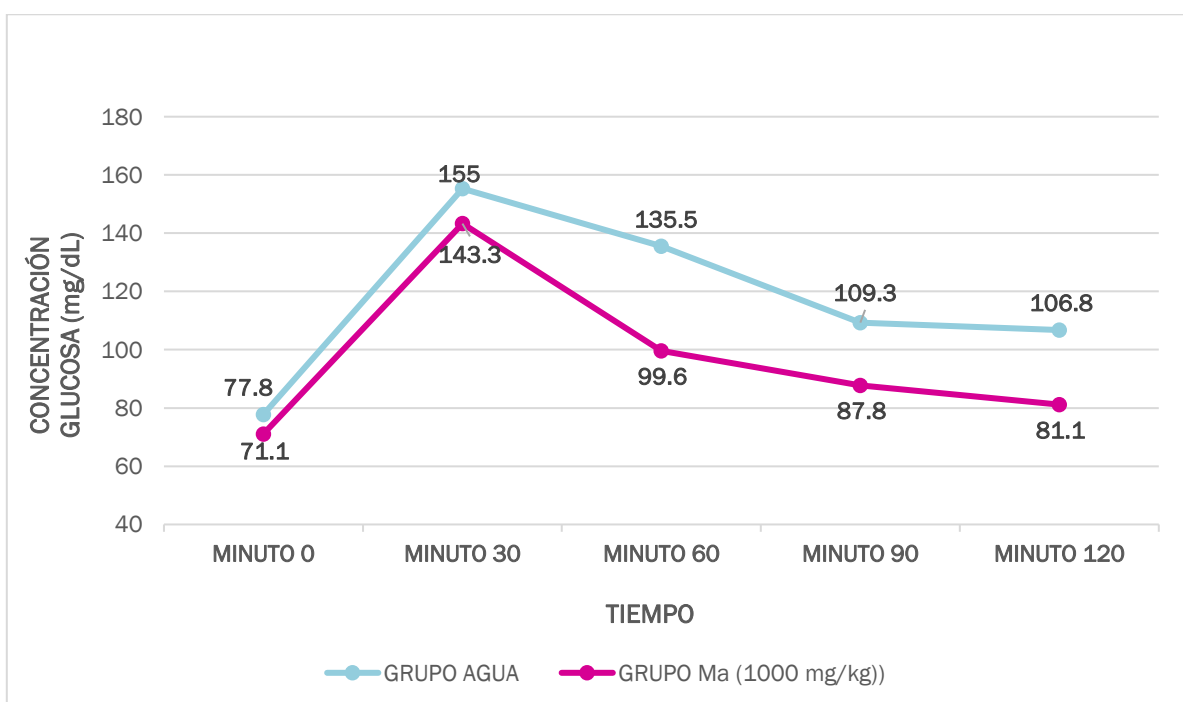


Figura 9. Curva de tolerancia a la glucosa al minuto 0, minuto 30, minuto 60 y minuto 120 el día 28 de los tratamientos administrados previo al sacrificio. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=6, prueba t de Student.

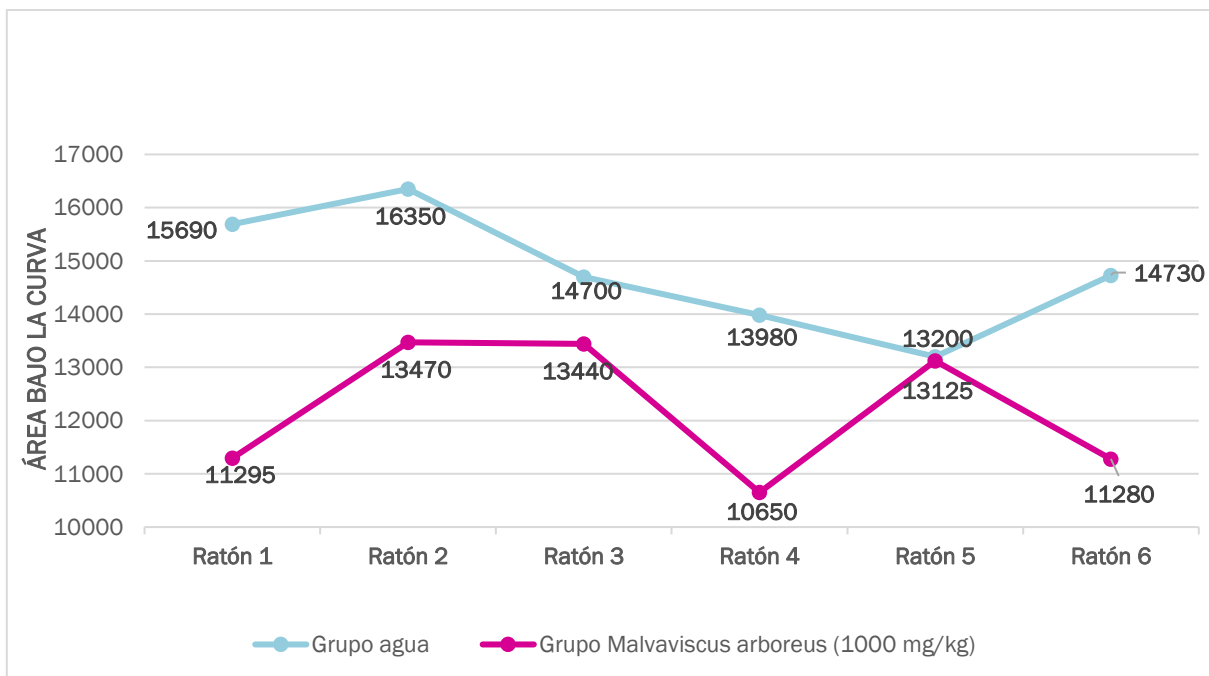


Figura 10. AUC de la prueba de tolerancia a la glucosa al minuto 0, minuto 30, minuto 60 y minuto 120 el día 28 de los tratamientos administrados previo al sacrificio. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=6, prueba t de Student.

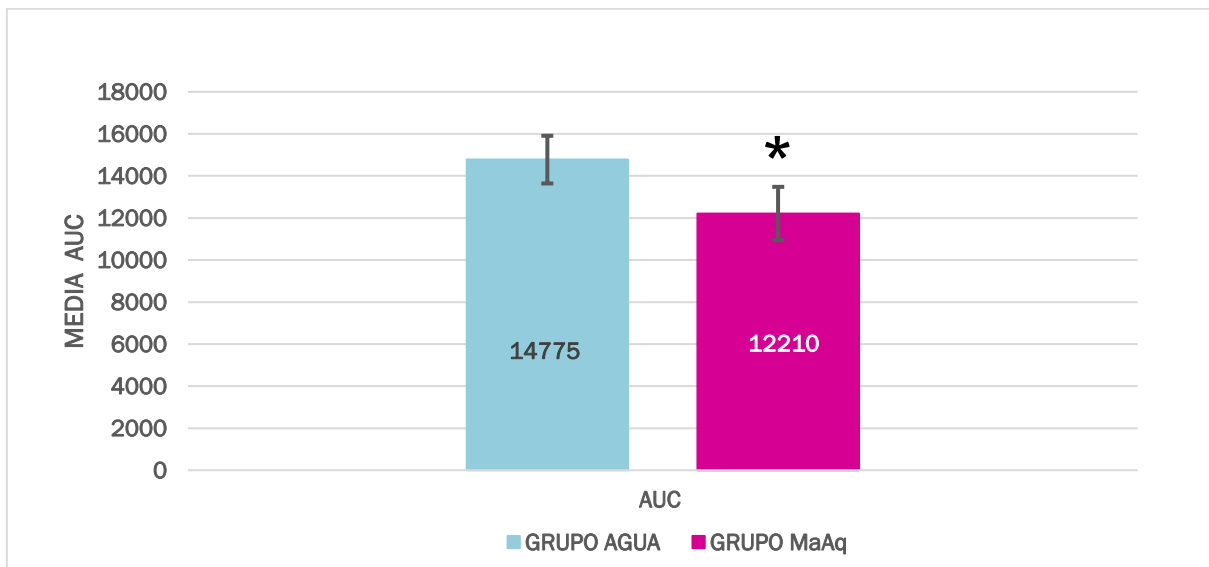


Figura 11. AUC de la prueba de tolerancia a la glucosa el día 28 de los tratamientos administrados previo al sacrificio. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=6, prueba t de Student (* $p < 0.05$).

Tras sedación con pentobarbital (previo al sacrificio), se tomó una muestra sanguínea del seno retro orbital, la cual fue centrifugada para obtener el suero y se realizó la prueba de Bradford para cuantificación de creatinina y proteínas en suero (Tabla 7 y figura 12). Encontrando un incremento significativo de la creatinina y las proteínas séricas a favor del grupo experimental, obteniendo una p de 0.042 y 0.010 respectivamente.

También se cuantificaron los parámetros de transaminasas TGO y TGP en suero, sin encontrarse diferencias significativas entre ambos grupos ($p=0.562$ y $p=0.273$) (Tabla 7 y figura 13).

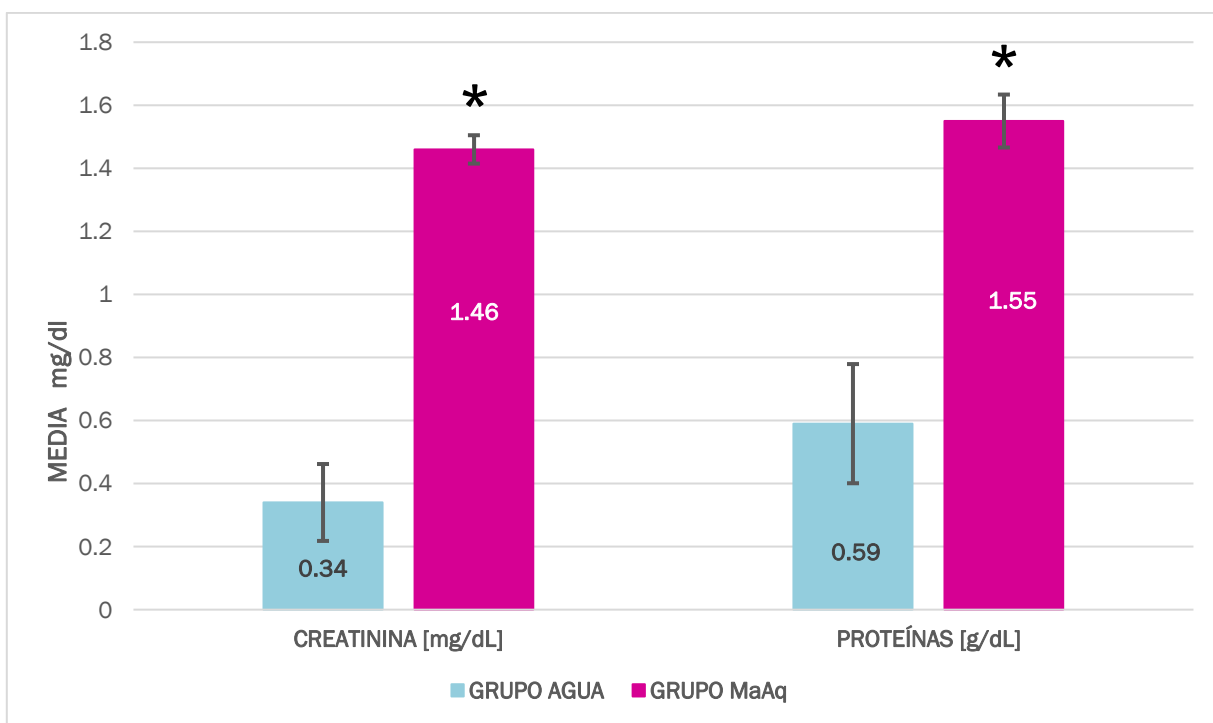


Figura 12. Creatinina y proteínas en suero de los tratamientos administrados previo al sacrificio. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=6 prueba t de Student (* $p < 0.05$).

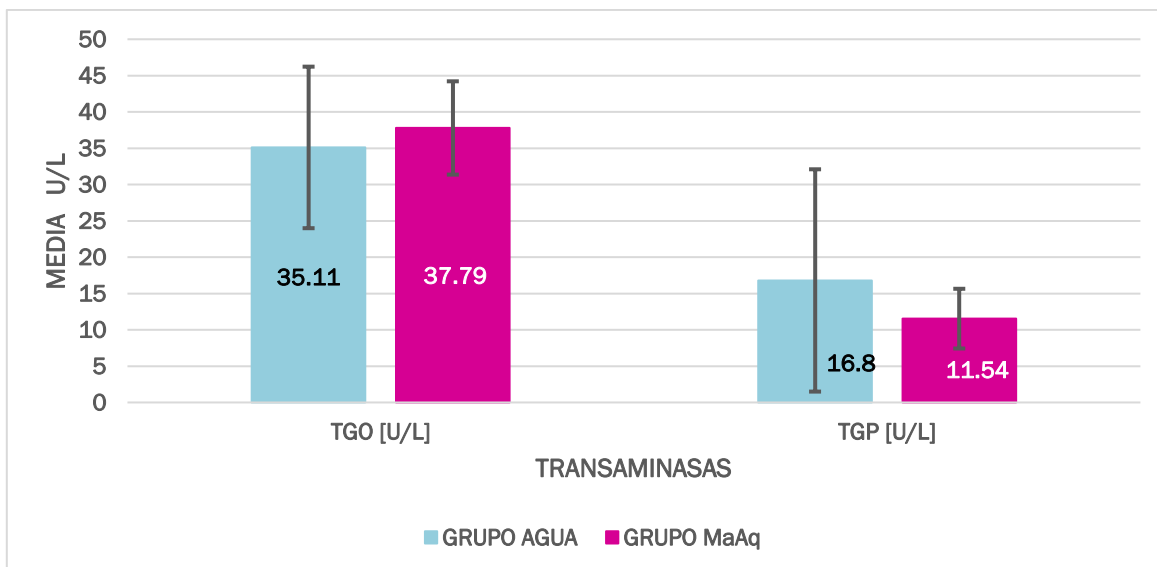


Figura 13. Transaminasas en suero el día 28 de los tratamientos administrados previo al sacrificio. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=6, prueba t de Student (* $p < 0.05$).

La orina de ambos grupos se recolectó en cajas metabólicas durante un periodo de 24 horas para su posterior análisis de creatinina, proteínas y depuración de creatinina en orina. Se obtuvieron diferencias significativas en la que el grupo experimental presentó una menor excreción de orina ($p=0.006$) (Tabla 7 y figura 14).

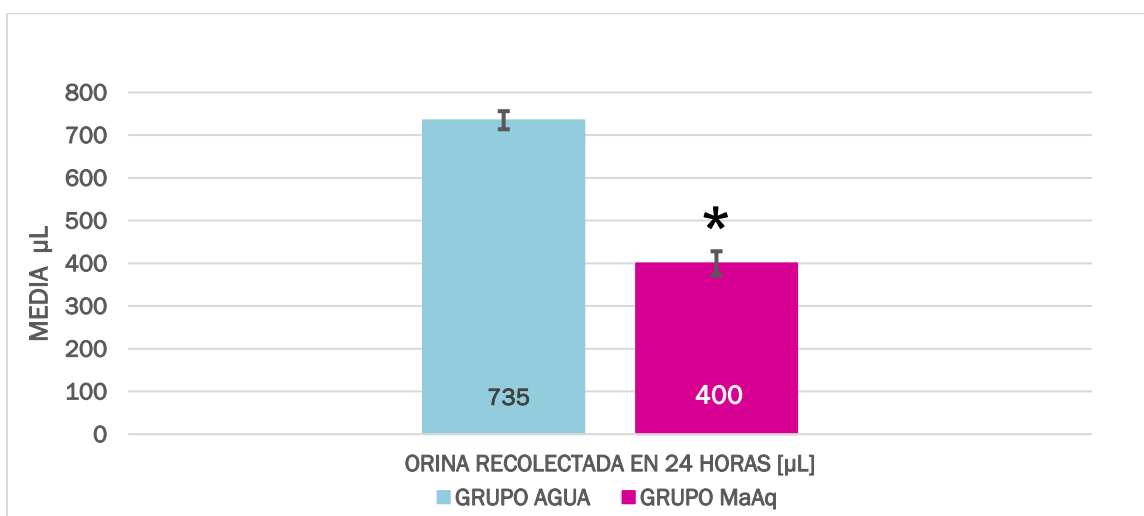


Figura 14. Orina recolectada en 24 horas de los tratamientos administrados previo al sacrificio. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=10, prueba t de Student (* $p < 0.05$).

Respecto a la cuantificación de creatinina en orina, no se observaron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 15).

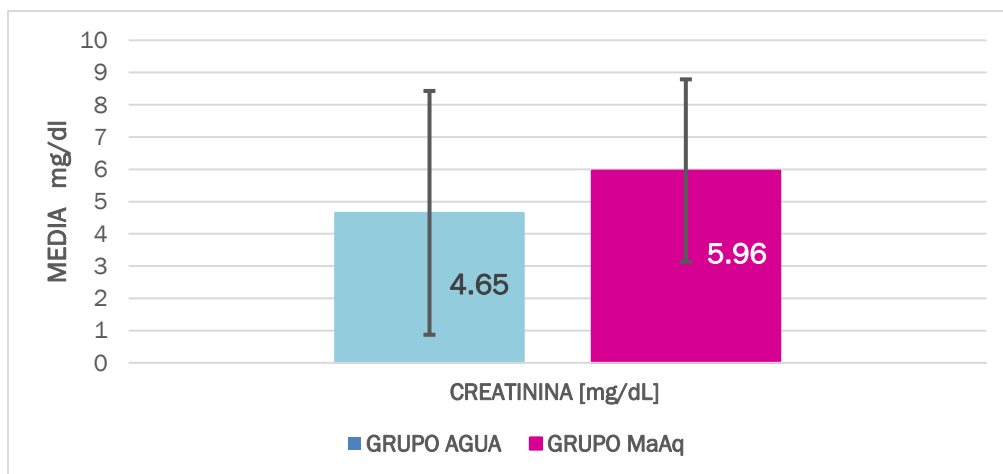


Figura 15. Creatinina en orina de los tratamientos administrados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=10, prueba t de Student (* $p < 0.05$)

Así mismo, en la cuantificación de proteínas en orina se cuantificó una mayor excreción de proteínas en el grupo experimental ($p=0.003$) (Tabla 7 y figura 16).

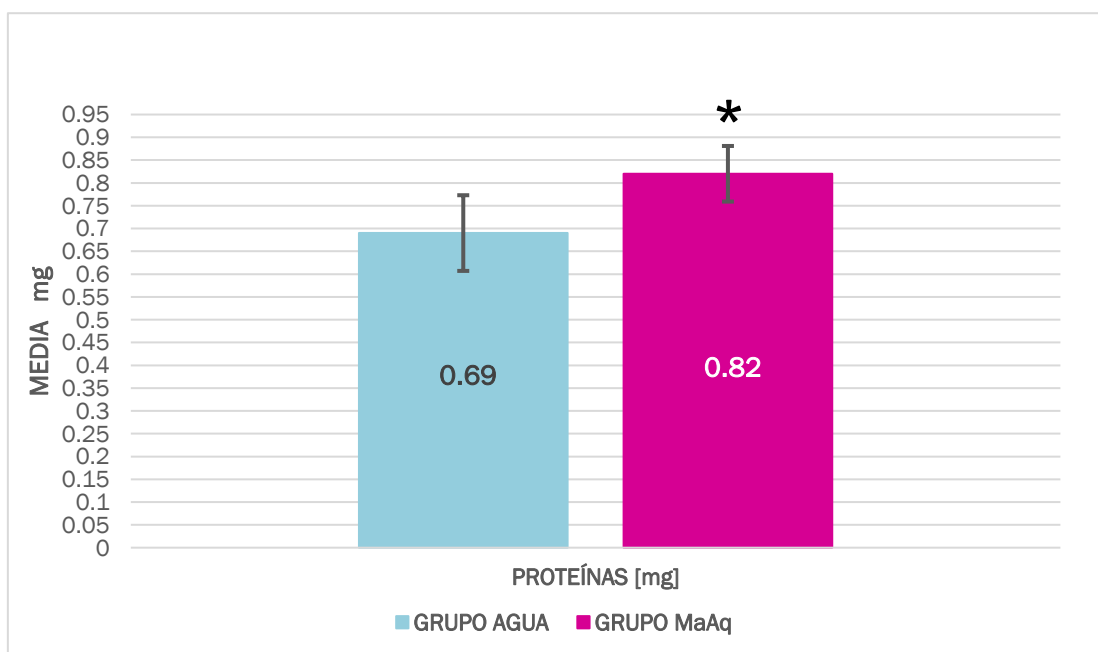


Figura 16. Proteínas en orina de los tratamientos administrados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=10, prueba t de Student (* $p < 0.05$).

Se realizó el cálculo de la depuración de creatinina en orina, utilizando la creatinina en orina y el peso de los animales. Sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos obteniendo una p de 0.383 (Tabla 7 y figura 17).

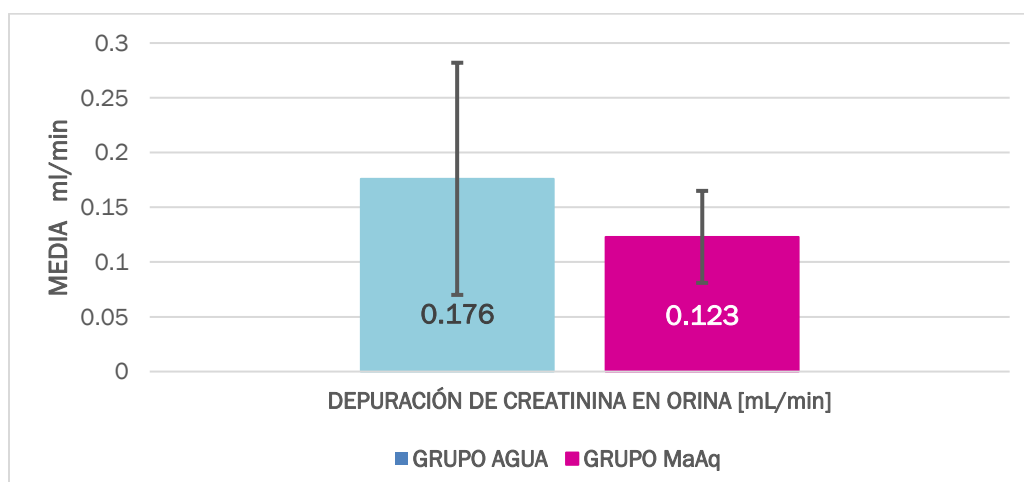


Figura 17. Depuración de creatinina en orina de 24 horas de los tratamientos administrados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. N=10, prueba t de Student (* $p < 0.05$).

Efecto de MaAq a nivel histológico

En los hígados el 33.3% se encontraron sin alteraciones y el 66.7% presentó alteraciones; encontrando binucleación en el 49.9% del total de las muestras y balonización en el 16.6% ($p=0.620$). En los riñones el 82.6% se encontraron sin alteraciones y el 17.3% de los órganos presentaron anomalías, siendo congestión vascular la alteración encontrada ($p=0.067$). (Tabla 7, tabla 8, figura 18a y b, e imágenes 2, 3 y 4).

Tabla 8. Resultados del estudio histológico de los tratamientos administrados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento. (hígado N=9 y riñón N=7).

ÓRGANO	GRUPO	HALLAZGO		
Hígado	Agua	SA:44.4%	Bal:0%	Bin:55.6%
Hígado	MaAq	SA:22.2%	Bal:33.3%	Bin:44.4%
Riñones	Agua	SA:57.1%	CV:42.9%	
Riñones	MaAq	SA:85.7%	CV:14.3%	
SA: Sin Alteraciones Bal: Balonización Bin: Binucleación CV: Congestión Vascular				

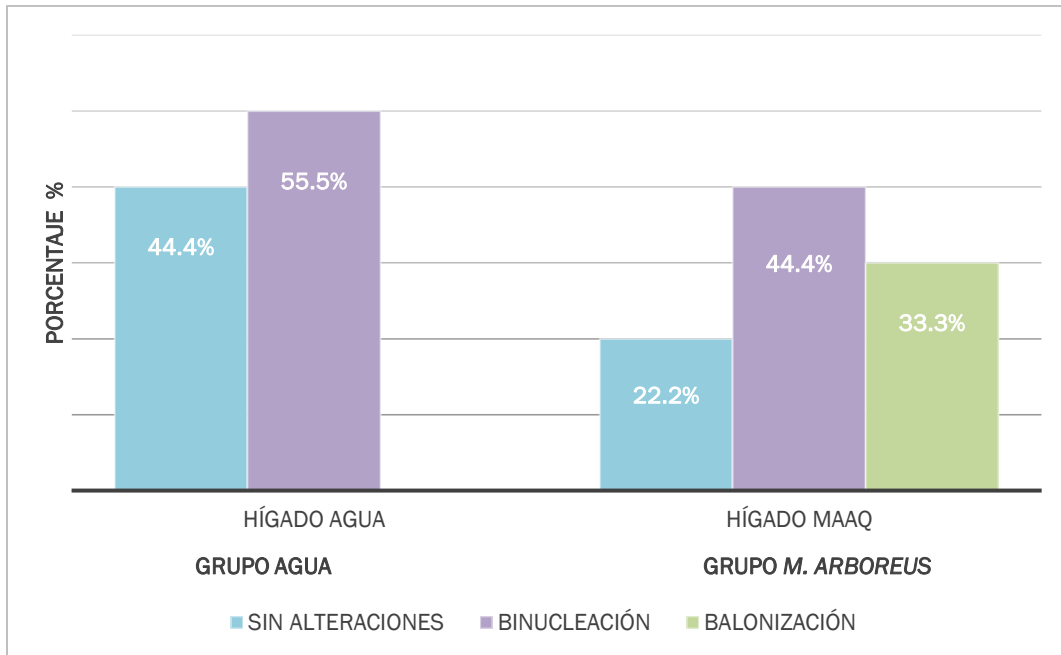


Figura 18a. Alteraciones histológicas encontradas en los hígados. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento (hígado N=9 y riñón N=7), prueba exacta de Fisher (* $p < 0.05$).

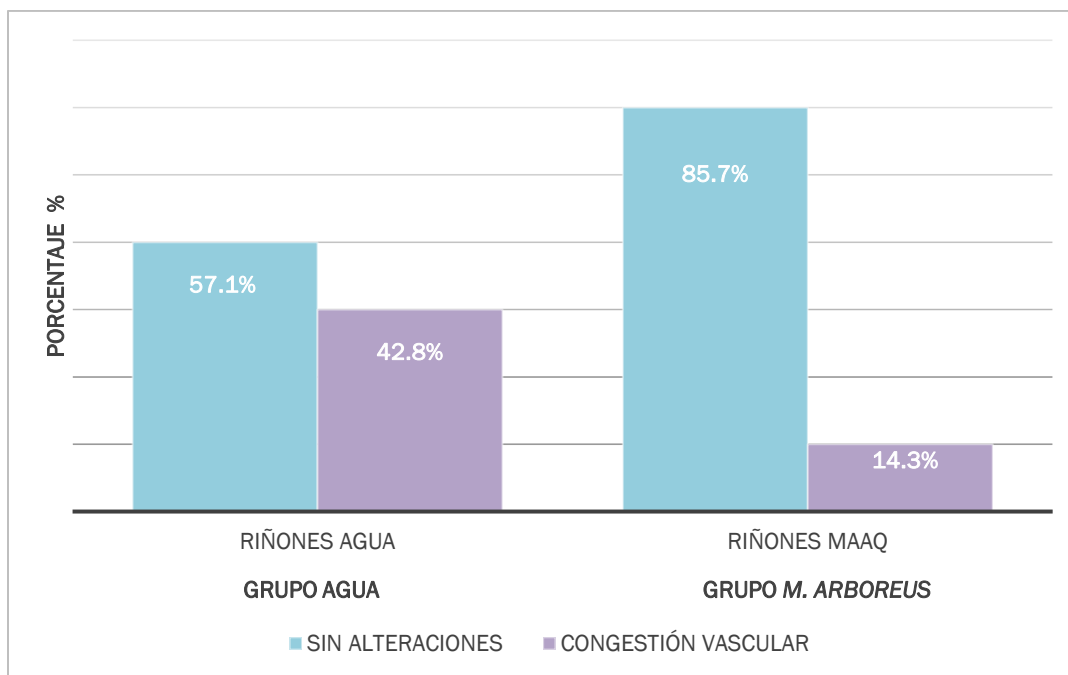


Figura 18b. Alteraciones histológicas encontradas en los riñones. Dosis del extracto 1000 mg/kg v.o., diario por 28 días de tratamiento (hígado N=9 y riñón N=7), prueba exacta de Fisher (* $p < 0.05$).

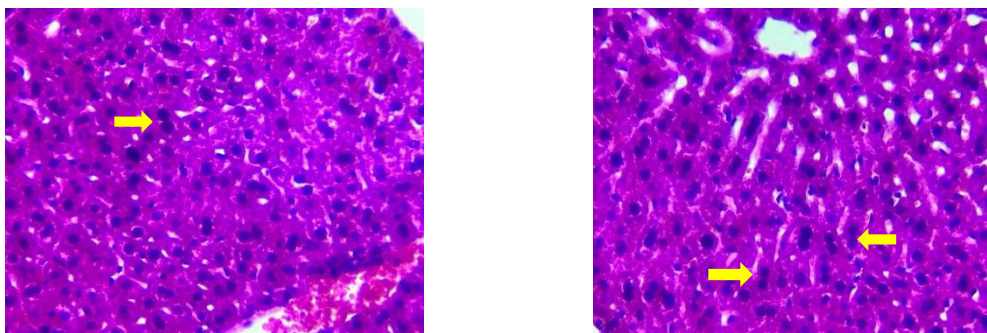


Imagen 2. Corte histológico de hígado (tinción HE) con tratamiento de MaAq visto en microscopia óptica, en el cual se visualiza binucleación de los hepatocitos (flechas amarillas).

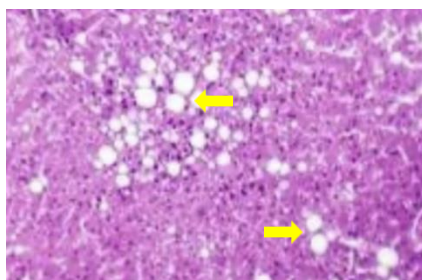


Imagen 3. Corte histológico de hígado (tinción HE) con tratamiento de MaAq visto en microscopia óptica, en el cual se visualiza balonización de los hepatocitos (flecha amarilla).

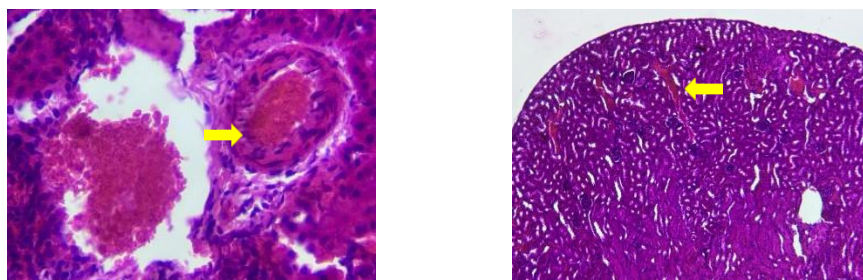


Imagen 4. Corte histológico de riñón (tinción HE) con tratamiento de MaAq visto en microscopia óptica, en el cual se visualiza congestión vascular (flechas amarillas).

10. DISCUSIÓN

En los resultados encontrados en cuanto a la toxicidad evaluada por la prueba de Irwin, el extracto de *Malvaviscus arboreus* no mostró toxicidad a nivel de SNC, ya que la prueba no mostró alteraciones en ninguno de los parámetros estudiados durante las 4 semanas del estudio en ninguno de los dos grupos.

Respecto al peso de órganos se puede suponer que el proceso asociado a un efecto tóxico podría establecer algún tipo de edema, sin embargo, al comparar los órganos de ambos grupos, no encontramos diferencia estadísticamente significativa; teniendo un segundo parámetro que nos muestra la ausencia de efectos tóxicos.

En lo referente a los efectos de la administración subcrónica del extracto en el metabolismo de la glucosa, no se encontraron diferencias significativas en los parámetros al inicio del tratamiento y en el día 21; ya que al estar utilizando un compuesto rico en glucósidos de kaempferol, podríamos pensar que se pudieran alterar los niveles de glicemia, sin embargo, no fue así. En el manejo de la glucosa a lo largo del tiempo, pudimos observar que el extracto disminuyó el Área Bajo la Curva respecto al tratamiento control (agua); lo cual significa que la administración del extracto de *Malvaviscus arboreus*, además de no alterar la glucosa en ayuno, si modifica el proceso del manejo en los niveles de glucosa; suponiendo que tiene un efecto antihiper glucémico al encontrar diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos, a favor del grupo al cual se le administró MaAq; tal vez debido a la presencia de flavonoides que actuaron como antiinflamatorios además del efecto hipoglucemiante ya reportado en la bibliografía.

A nivel hepático, no se encontraron alteraciones en la concentración de transaminasas, pero a nivel histológico hubo presencia de balonización y binucleación lo cual se traduce en probable esteatosis hepática.

En cuanto a los marcadores de actividad renal, a pesar de no observar diferencias significativas en los valores de la creatinina en orina en ambos grupos; si se encontró un incremento significativo en los valores de creatinina en suero y proteínas en orina en los ratones tratados con el extracto de MaAq; lo cual pudiera hablarnos de un efecto renotóxico; al igual que la elevación de proteínas en suero, lo cual pudiera estar relacionado con los valores obtenidos en la recolección de orina de 24 horas, en donde hubo una disminución importante de la excreción de orina en el grupo de *M. arboreus* (casi de un 50%), lo cual nos

indica que probablemente el volumen vascular también ha sido afectado; lo cual puede tener impacto en los valores de las proteínas en suero, proteínas en orina y creatinina en orina.

A pesar de estos cambios observados, no se encontraron diferencias significativas en la depuración de creatinina en orina lo cual nos indica que el efecto de la administración subcrónica no está alterando como tal a la función renal, sin embargo, se encontraron alteraciones histológicas en el 17.3% de los riñones (congestión vascular) y el 82.6% se encontraban sin alteraciones.

Debido al alto porcentaje de compuestos glicosilados que contiene el extracto, así como a la dosis de administración tan elevada; es probable que se iniciara con cambios a nivel hepático, compatibles con esteatohepatitis no alcohólica (EHNA), esto de acuerdo con lo encontrado a nivel macroscópico, en la que se aprecian cambios en los hígados de los ratones y a nivel histológico con la observación de balonización (16.6%) de los hepatocitos; uno de los elementos morfológicos más característicos de daño parenquimatoso en EHNA y de mayor valor diagnóstico/pronóstico, como lo descrito por Murzi-Pulgar et al en el 2017, donde se menciona la relación estrecha de la EHNA con la insulinoresistencia y que es clave en el desarrollo de la esteatosis hepática, además de que en algunos pacientes la esteatosis hepática se asocia con un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias por los hepatocitos y por las células no parenquimatosas.⁴¹

La presencia de esteatosis y balonización hepatocelular, así como la movilización de células de Kupffer en el hígado de las ratas, sugiere un hígado graso no alcohólico. La Asociación Americana para el Estudio de las Enfermedades del Hígado definió como criterios para el diagnóstico de la EHNA en humanos la presencia de esteatosis en combinación con hepatocitos balonizados, así como de infiltrado inflamatorio mixto acompañado, en ocasiones de fibrosis, lo cual fue reportado en un estudio realizado en el 2007 por Daniele et al., en Argentina.⁴²

La balonización de los hepatocitos es el rasgo más característico de la esteatohepatitis y típicamente se asocia con la formación de cuerpos de Mallory.⁴³

Dentro de los hallazgos histológicos, también se observó binucleación (49.9%) en los hepatocitos, como lo encontrado en un estudio realizado por Kosif et al., en el 2010 donde se observaron cambios degenerativos como agrandamiento nuclear en los hepatocitos, binucleación y ligero aumento de la cromatina en el hígado, como respuesta a la degeneración

que puede ocurrir dependiendo de una dosis alta (1000mg/kg),⁴⁴ al compararse con la dosis utilizada en un estudio realizado en el año 2020 por Campos et al., en el cual la dosis terapéutica de *Malvaviscus arboreus* para obtener un efecto antiulceroso fue de 180 mg/kg.¹³ De acuerdo con esta información se podría decir que, si se utilizara una dosis terapéutica de *Malvaviscus arboreus*, no deberían presentarse efectos tóxicos a nivel renal y/o hepático.

Limitaciones

El no haber llevado a cabo la evaluación genotóxica y de la función cardiaca, así como no cuantificar interleucinas.

Fortalezas

En este estudio se contó con la elaboración de un extracto estandarizado en soforósido y sambubiósido de kaempferol, así como las instalaciones para realizar en un futuro, estudios más amplios de tipo toxicológico.

Nuevas líneas de investigación

El presente estudio nos sirvió para dar paso a nuevos protocolos en los cuales se estudien diferentes dosis del extracto, así como la realización de estudios de toxicidad crónica. Es necesario evaluar si los efectos renotóxicos y hepatotóxicos son permanentes o transitorios; y estudiar si pueden desaparecer al suspender el extracto.

11. CONCLUSIONES

De los resultados del efecto de la administración subcrónica del extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*, se pudo identificar que no existió un incremento de los niveles de glucosa posterior a la administración del tratamiento; suponiendo que pudo afectarse debido a la presencia de principios activos glicosilados, los cuales pudieron tener un efecto alterando los niveles de glicemia.

Sin embargo, a nivel hepático y renal si se observaron cambios tanto en los parámetros bioquímicos, fisiológicos e histológicos, lo cual nos reflejó un efecto tóxico a nivel renal y hepático.

Recordemos que la dosis terapéutica de *Malvaviscus arboreus* es de 180 mg/kg y en nuestro estudio se utilizó una dosis alta de 1000 mg/kg; por lo cual en un futuro se pueden utilizar dosis terapéuticas para nuevos estudios de tipo toxicológico.

12. REFERENCIAS

1. Méndez- Hernández A., Hernández-Hernández A., López-Santiago M. C., et al. Herbolaria oaxaqueña para la salud. [Internet]. México, D.F: Instituto Nacional de las Mujeres; 2009 [Consultado 25 may 2021]; Disponible en: http://cedoc.inmujeres.gob.mx/documentos_download/101102.pdf
2. Medeiros-Venâncio A., Casimiro-Onofre A., Figueiredo-Lira A., et al. Chemical Composition, Acute Toxicity, and Antinociceptive Activity of the Essential Oil of a Plant Breeding Cultivar of Basil (*Ocimum basilicum L.*) *Planta Med* [Internet]. 2011 [Consultado 25 may 2021]; 77:825–829. Disponible en: DOI: [10.1055/s-0030-1250607](https://doi.org/10.1055/s-0030-1250607)
3. Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional. [Internet]. 2020 [Consultado 25 may 2021]; Disponible en: https://www.who.int/topics/traditional_medicine/es/
4. Organización Panamericana de la Salud. Medicina Natural y tradicional: Fitoterapia. La Habana, Cuba. [Internet]. s/f [Consultado 25 may 2021]. Disponible en: https://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=mnt&alias=915-fitoterapia&Itemid=226
5. Moore N., Hamza N., Berke B., et al. News from Tartary: An ethnopharmacological approach to drug and therapeutic discovery. *Br J Clin Pharmacol* [Internet]. 2017 [Consultado 25 may 2021]; 83:33–37 <https://doi.org/10.1111/bcp.13042>
6. Acosta-de la Luz L. L., Hechevarría-Sosa I., Rodríguez-Ferradá C., et al. Explotación de *Malvaviscus arboreus Cav.* con fines medicinales. [Internet]. 2013 [Consultado 25 ago 2021]; 18:(3). Disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/72>
7. Lista de especies de las Galápagos. Charles Darwin Foundation [Internet]. 2020 [Consultado 25 ago 2021]; Disponible en:

<https://www.darwinfoundation.org/en/datazone/checklist?species=586>

8. Espinosa-Moreno J, Centurión-Hidalgo D, Mayo-Mosqueda A., et al. Plantas aromáticas y medicinales tropicales con potencial actividad antimicrobiana.[Internet]. México: Universidad Juárez Autónoma de Tabasco; 2017 [Consultado 26 ago 2021]. Disponible en:

https://archivos.ujat.mx/2017/div_daca/publicaciones/PLANTAS-AROMATICAS-Y-MEDICINALES-TROPICALES.pdf

9. Abdelhafez O. H, Fawzy M. A, Fahim J., et al. Hepatoprotective potential of *Malvaviscus arboreus* against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. PLoSOne. [Internet]. 2018 [Consultado 27 ago 2021]; 13:(8). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30138328/> <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202362>

10. Hesham-Abdelhafez O, Refaat-Fahim J, Ramadan-Abdelmohsen U, et al. Headspace volatiles of the leaves and flowers of *Malvaviscus arboreus* Cav. (*Malvaceae*). *J. Mex. Chem. Soc* [Internet]. 2021 [Consultado 27 ago 2021]; 65:(1).Disponible en:

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1870-249X2021000100141&script=sci_arttext
DOI: <https://doi.org/10.29356/jmcs.v65i1.1431>

11. Manzanita. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana (UNAM). [Internet]. 2009 [Consultado 27 ago 2021]; Disponible en:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/apmtm/termino.php?l=3&t=malvaviscus-arboreus>

12. Arroyave-Murillo L. M, Gómez-Barrera M, Hurtado-Tobón L. H. Determinación de la actividad antioxidante de *Malvaviscus arboreus* Cav. *Rev plantas medicinales*. [Internet]. 2018 [Consultado 27 ago 2021]; 23(2). Disponible en:

<http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/588/312>

13. Campos-Vidal Y, Herrera-Ruiz M, Trejo-Tapia G., et al. Gastroprotective activity of

kaempferol glycosides from *Malvaviscus arboreus* Cav. J Ethnopharmacol. [Internet]. 2021 [Consultado 30 ago 2021]; 268:113633. Disponible en:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33253829/> DOI: [10.1016/j.jep.2020.113633](https://doi.org/10.1016/j.jep.2020.113633)

14. Devi K. P, Malar D. S, Nabavi S. F, et al. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. Pharmacol Res. [Internet]. 2015 [Consultado 30 ago 2021]; 99:1-10. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25982933/> DOI: [10.1016/j.phrs.2015.05.002](https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.05.002)

15. Rajendran P, Rengarajan T, Nandakumar N, et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. Eur J Med Chem. [Internet]. 2014 [Consultado 30 ago 2021]; 6:103-12. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25147152/> DOI: [10.1016/j.ejmech.2014.08.011](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.011)

16. Muhammad Imran, Bahare Salehi, Javad Sharifi-Rad., et al. Kaempferol: A Key emphasis to its anticancer potential. Molecules. [Internet]. 2019 [Consultado 30 ago 2021]; 19(12):2277. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6631472/pdf/molecules-24-02277.pdf> DOI: [10.3390/molecules24122277](https://doi.org/10.3390/molecules24122277)

17. Calderón-Montaña J. M, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C., et al. A Review on the dietary flavonoid kaempferol. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry. [Internet]. 2011 [Consultado 30 ago 2021]; 11:298-344. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21428901/> DOI: [10.2174/138955711795305335](https://doi.org/10.2174/138955711795305335)

18. Rodríguez-García C. M, Ruiz-Ruiz J. C, Peraza-Echeverría L., et al. Antioxidant, antihypertensive, anti-hyperglycemic, and antimicrobial activity of aqueous extracts from twelve native plants of the Yucatan coast. PLoS ONE. [Internet]. 2019 [Consultado 30 ago 2021]; 14(3):e0213493. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30917135/> <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213493>

19. Sobre toxicología. [Internet]. Washington, D.C: OPS/OMS; 2021 [Consultado 30 ago

2021]. Disponible en:

https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=13056:sobre-toxicologia&Itemid=42283&lang=es

20. Dorato M. A, Buckley L. A. Toxicology in the drug discovery and development process. Current Protocols in Pharmacology [Internet]. 2006 [Consultado 30 ago2021];32:31-5.

Disponible en: <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1003s32>

<https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/0471141755.ph1003s32>

21. Chamorro-Cevallos G. A. Estudios de toxicología preclínica para nuevos fármacos. Arch Neurocién Mex [Internet]. 1996 [Consultado 30 ago 2021]; 1(2):118-121. Disponible en:

<https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=24146>

22. Hernández-Rodríguez A. I. Guía metodológica para la investigación del desarrollo de un fitomedicamento [Internet]. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2017 1996 [Consultado 1 sep 2021]. Disponible en:

https://docs.bvsalud.org/biblioref/2020/02/1050975/guia-metodologica-de-investigacion-para-el-desarrollo-de-un-fi_bkoyAgO.pdf

23. Hall J. E, Guyton A. C. Tratado de Fisiología Médica [Internet]. Jackson, Mississippi: Elsevier; 2016. 2017 [Consultado 1 sep 2021]. Disponible en:

<http://www.untumbes.edu.pe/bmedicina/libros/Libros10/libro125.pdf>

24. Barrett K. E, Barman S. M, Boitano S., et al. Ganong Fisiología médica [Internet]. México, D. F: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S.A. de C.V; [2010 Consultado 5 sep 2021]. Disponible en:

<http://www.untumbes.edu.pe/vcs/biblioteca/document/varioslibros/0440.%20Ganong.%20Fisiolog%C3%ADa%20m%C3%A9dica.pdf>

25. Touiss I, Ouahhoud S, Harnafi M., et al. Toxicological evaluation and hepatoprotective

efficacy of Rosmarinic acid-rich extract from *Ocimum basilicum* L. Evid Based Complement Alternat Med [Internet]. 2021 [Consultado 5 sep 2021]; Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33603821/> DOI: [10.1155/2021/6676998](https://doi.org/10.1155/2021/6676998)

26. Tejada-Cifuentes F. Hepatotoxicidad por fármacos. Rev Clin Med Fam [Internet]. 2010 [Consultado 05 sep 2021]; 3(3):177-191. Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2010000300006&lng=es.

27. Bhakuni G. S, Bedi O, Bariwal J., et al. Animal models of hepatotoxicity. Inflamm Res. [Internet]. 2016 [Consultado 05 sep 2021]; 65(1):13-24. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26427493/> DOI: 10.1007/s00011-015-0883-0.

28. Fernández-Daza E, Fernández-Juan E, Moreno-Mejía I., et al. Aproximación al diagnóstico de enfermedades hepáticas por el laboratorio clínico. Medicina & Laboratorio [Internet]. 2008. [Consultado 05 sep 2021]; 14(11-12). Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/medlab/myl-2008/myl0811-12c.pdf>

29. Tejada Cifuentes F. Hepatotoxicidad por fármacos. Rev Clín Med Fam [Internet]. 2010. [Consultado 05 sep 2021]; 3 (3): 177-191. Disponible en: https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1699-695X2010000300006

30. Tortora G, Derrickson B. Principios de anatomía y fisiología [Internet]. México, D. F: Editorial Médica Panamericana; 2016. [Consultado 7 sep 2021]. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2163>

31. IraFox. Fisiología humana [Internet]. México, D. F: McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S. A. de C. V; 2016. [Consultado 7 sep 2021]; 10:13614. Disponible en: <https://accessmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookID=2163>

32. Yuan-Yow C, Si-Tse J, Yu-Sian D., et al. Kidney-based in vivo model for drug induced

nephrotoxicity testing Scientific Reports [Internet]. 2020 [Consultado 7 sep 2021]. Disponible en: <https://www.nature.com/articles/s41598-020-70502-3>

33. Xiaofen Xu, Ruyi Zhu, Jialiang Ying. Nephrotoxicity of Herbal Medicine and its Prevention. Front Pharmacol [Internet]. 2020 [Consultado 7 sep 2021]; Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7593559/>
<https://doi.org/10.3389/fphar.2020.569551>

34. Al Doaiss AA., Ali D., ALI, BA., Jarrar B. MRenal Histological Alterations Induced by Acute Exposure of Titanium Dioxide Nanoparticles. Int. J. Morphol. [Internet]. 2019 [Consultado 1 oct 2023]; 37(3):1049-1057. Disponible en: https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022019000301049&script=sci_abstract

35. Regidor-Braojos L, Solans-Lampurlanés X. Neurotoxicidad: agentes neurotóxicos. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales de España [Internet]. 1998 [Consultado 5 oct 2023]. Disponible en: https://www.insst.es/documents/94886/326853/ntp_487.pdf/29ee25da-9b1b-43c7-be49-0b0a176ef4b5?version=1.0&t=1614698355743

36. Martín-del Pozo M, Salmerón-Béliz O. Intoxicaciones del sistema nervioso central [Internet]. 2003 [Consultado 10 Oct 2023]; 8(102): 5497-5505. Disponible en: <https://www.medicineonline.es/es-pdf-S0304541203710178>
DOI: 10.1016/S0304- 5412(03)71017-8

37. Hernier A. M, Froger-Colléaux C, Castagné V. CNS safety pharmacology: A focus on cognitive functions [Internet]. 2006 [Consultado 10 oct 2023]; 81:286-94. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27071953/>
DOI: 10.1016/j.vascn.2016.04.002

38. Van Haaren F. Methods in Behavioral Pharmacology [Internet]. Elsevier Science; 1993 [Consultado 11 oct 2023]; Disponible en: <https://www.elsevier.com/books/methods-in->

[behavioral-pharmacology/vanhaaren/978-0-444-81444-9](https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/profesionalesSalud/investigacionSalud/cbis/manualprocedimientosanimales.pdf)

39. Navarro Hernández JC., Ramírez Ojeda RA., Villagrán Vélez C. Manual de procedimientos recomendables para investigación con animales. [Internet]. México: Samsara Editorial; 2012 [Consultado 12 dic 2023]. Disponible en:

<https://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/profesionalesSalud/investigacionSalud/cbis/manualprocedimientosanimales.pdf>

40. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. [Internet]. 2001 [Consultado 12 dic 2023]. Disponible en:

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf

41. Murzi-Pulgar M., Cuyás-Espí B., Soriano-Pastor G. Definición e importancia de la enfermedad por hígado graso no alcohólico. [Internet]. Endocrinol Diabetes Nutr Supl. 2017;1(2):2-5. [Consultado 11 oct 2023]; Disponible en:

<https://www.elsevier.es/index.php?p=revista&pRevista=pdf-simple&pii=X2530016417615173&r=13>

42. Daniele SM., Picena JC., Montenegro SM., Tarrés MC., Martínez SM. Hígado Graso no alcohólico en ratas macho de una línea con diabetes genética. [Internet]. Electron J Biomed. 2007; 3:29-39. [Consultado 20 oct 2023]; Disponible en:

<https://biomed.uninet.edu/2007/n3/daniele.html>

43. Singer C., Stancu P., Cosoveanu S., Botu A. Non alcoholic Fatty Liver Disease in Children. [Internet]. Curr Health Sci J. 2014; 40 (3): 170-176. [Consultado 27 oct 2023]; Disponible en:

<https://www.medra.org/servlet/view?lang=en&doi=10.12865/CHSJ.40.03.03>

44. Kosif R., Yılmaz F., Evrendilek, G. A., Dıramalı M. Histopathological effects of Aloe

barbadensis and soybean oil on rat liver. [Internet]. Int. J. Morphol., 28(4):1101-1106, 2010.
[Consultado 2 nov 2023]; Disponible en:

https://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-95022010000400019&script=sci_abstract

ANEXOS

Evaluación de la toxicidad en sistema nervioso central y periférico/Prueba de Irwin

RATÓN	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
Peso										
Pasividad										
Estereotipia										
<i>Grooming</i>										
Acicalamiento										
Vocalización										
Hiperactividad										
Agresión										
Tremor										
Espasmos										
Convulsiones										
Reflejo de enderezamiento										
Incapacidad de caminar.										
Actividad prensil										
Tono muscular de tren trasero										
Salivación, Apertura palpebral, exoftalmia, piloerección, urinación, aumento de tasa respiratoria, cambio de color de piel										
Defecación										

Anotaciones de los resultados

0=Ausente

1=Leve

2= Moderado

3=Severo

Instrumento de recolección de datos

Perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS (control agua)

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
AST						
ALT						
Proteínas en suero						
Creatinina en suero						
Proteínas en orina						
Creatinina en orina						
Glucosa día 1						
Glucosa día 21						

PARÁMETROS BIOQUÍMICOS (dosis 1000 mg/kg)

	R1	R4	R5	R7	R8	R10
AST						
ALT						
Proteínas en suero						
Creatinina en suero						
Proteínas en orina						
Creatinina en orina						
Glucosa día 1						
Glucosa día 21						

**CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA
GRUPO CONTROL AGUA**

	0'	30'	60'	90'	120'
R1					
R2					
R3					
R4					
R5					
R6					

**CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA
GRUPO *Malvaviscus arboreus***

	0'	30'	60'	90'	120'
R1					
R2					
R3					
R4					
R5					
R6					

Anexo 5

Instrumento de recolección de datos (histología)
Perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus*

HISTOLOGÍA RIÑONES		
GLOMERULONEFRITIS	NO	SI
AMILOIDOSIS	NO	SI
NECROSIS	NO	SI
CONGESTIÓN VASCULAR	NO	SI

HISTOLOGÍA HÍGADO		
CÉLULAS DE KUPFFER	NO	SI
DEGENERACIÓN HIDRÓPICA	NO	SI
NECROSIS	NO	SI
BINUCLEACIÓN	NO	SI
BALONIZACIÓN	NO	SI



Cuernavaca, Morelos, 11 de abril de 2024.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: “**Perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus***”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alma Heidi Coss Mejía. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

- I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Juan José Acevedo Fernández





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2024-04-22 17:17:44 | FIRMANTE

p0UKQK7yTu71B60X5ltbj8C37ACj5r20Tkir7kedjNyR4sqr226Bvx03WE3sQ2oW4p7TBk1691g2gXUummJylx/jqloQnn5NLpLJ3kfseDDy3gl+A/UHG3LX/X8OeVltrOQ0LXlhOlqq6/Ss2Fp/T4AN6UlrQZauJBvtD0dgFMHTxYZtU/aVUHaiPa0A2GxK29x726aSpAue66cYuozeWebi0R9UeVnKg3XBMMZgXdWf4baN+ulEBLzmYp3F7r/DN+9uwQDt5ByoFrU6jgau3ItT/cUQXY5oT3lpu9S+rRO7dGPlzR48sVsTmc/uD3oyRF4SYGp0EKvLV42TA0AnQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QwcJn95sK](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Q6WBmIDHCmUb6R17wH7Fef8QCvagQg0Z>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de abril de 2024.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: “**Perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus***”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alma Heidi Coss Mejía. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

- I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dra. Gabriela Castañeda Corral





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2024-05-16 17:07:21 | FIRMANTE

I2bA2xH8ZStkDji2znb0GtXeCUXZQsMYcS5g008TcG23ZpEjcTBVak9cqD98XNixVNBjDp/dss98EUFvwmkgsChn4e2MVx18ZEZYeCmZ+SUC1CWQCa7r3hH+vPxVVqRa1+I
Fk4+IWeT5PgDupgHLVOSFpzlZPuthvQAn45m7bEzYkcJjWx/mtsHNJxv+HduerGj+ngZE4wN5m90WBN4x2784EFMNOgBnLJEDYAdsPcTrZMBh0ERgqNV00PtleGJOtChvGr/M
nCyPFAn/DKytKSiYzLqwWsOJerKEy3gFp857F0iqcBqnyoPfGy0C9C7Mc3+pno53qvfSmilWOz1g==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[SLb9hcWiQ](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zHqeE09Ndbth7CnuDhLOeHYxzfrqR9u>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de abril de 2024.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: “**Perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus***”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alma Heidi Coss Mejía. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

- I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Jesús Enrique Jiménez Ferrer





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER | Fecha:2024-04-30 09:17:48 | FIRMANTE

oACXI5ESs/mRsqNxPT9UYWnpo4DtmUL0+dw6TTALq8DnP+lpDeTegatuF/8v/CkEnT5+czruXkfhJ1aLT7enInZIHzuP6Lf/v/8MwILazCv3q7VoLqPwS8gRtzkACcBoqgWdf2owuMkpembXldUyWS3G6BvejBkYETqa8OQmPvHUP9NXPObcXPEyeWQ8d6aG3mG7L8qGqUQ1zu6KFRhL+IsCW3EweDjnJoiq3tTeXGwrblfivo2WKvN0E3F1URfRapHpdIGKPI20Ub086HBe/e0klgv6+3zD3UYTCDMfYSikwbLAfMmiOpa+rOltGFfe137BP/Bq27SyJf6whJTmUxw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[4HUYoKsza](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RCrdcUcvUuU97wCXrRkGyomlQNIhHuX>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de abril de 2024.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: “**Perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus***”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alma Heidi Coss Mejía. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

- I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ALEJANDRO ZAMILPA ÁLVAREZ | Fecha:2024-04-21 20:27:43 | FIRMANTE

kax5uqn/AeJ8Kg3riZT0wk6qCuJuDsBqLy3EjnQCo2d5onq+Ts1cKFghTiFUx9Fwy99d/s+2pazPJ9Zk/8XZUEQXD0x6dQJwDwyASi7+haKEm18xzx7VKVBv+Tq3ZSVXltozeK3XaC1r/Gad5XUTxuEVx46Bbmyme8Ge/ppMWewtVWGjmOG+HWO59v7exV6LiWeqDbAfdffw86+xVccJovMN92iW2WxaBbVknQw/s+Ns0WjeP1hFPttcXfT5jp7aRtwKC8mxKQfNvAsq68l6Cy8rYHUSwzxAobrGbNs+KVPWHM7HCVg6rlskrEU2/Gzqw1/jp99Lb8B5SHbJiT1Z+w==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[Bbz8QZjc2](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/9rbU50YmkjsCMmUdkCPh3UGOwPh6OknN>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



Cuernavaca, Morelos, 11 de abril de 2024.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Facultad de Medicina

P r e s e n t e

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis: “**Perfil toxicológico de un extracto acuoso de *Malvaviscus arboreus***”, que para obtener el grado de Maestría en Medicina Molecular me proporcionó la alumna Alma Heidi Coss Mejía. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 74 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

- I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.**

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Dr. Armando Herrera Arellano





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ARMANDO HERRERA ARELLANO | Fecha:2024-04-12 01:52:41 | Firmante

qfGQotXOoSQf0t8ESysH2gPHQRVCgmpYr5Wy4fN9jyx9wunSdgEYxw5IFvghjkVB7v9Zv9gvOsaoDhMPI6RFs37r2jPOhfwCwmducNzmZ59raLVWhPYL5DdXusP99UqB9+Df8hTDP+MQILZKW8m0kg2bpsC7RxxP5tQv4BFHS9KJdKPFX5MIW09fn6CSNsWSJA3k6uz99TmTKKw9Ogw26wVICm36nGI1RdobV14Fb4RM/xdi2fHbp87RFIEAag+57xikdXJgLOFoVAvdhJyK7582XQhA3aoTaYOGCFJ9pH/VhW+X9paypU3M7r5YFmgY3QJh+mcV1aYhSYjBLYHZCA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[MadzlxYv9](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/8VoszU6xaPaArwflEdwRceAioM2SIP9l>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029