



Revista MINERVA

Plataforma digital de la revista: <https://minerva.sic.ues.edu.sv>



Toxicidad sub crónica y actividad analgésica *in vivo* del extracto clorofórmico de las hojas de *Calea urticifolia* (Juanislama)

Sub-chronic toxicity and *in vivo* analgesic activity of the chlorophormal extract of *Calea urticifolia* (Juanislama) leaves

Silvia E. Martínez^{1,2}, Juan Pablo Sánchez-Pérez³, Yenny Montalbetti Moreno⁴, Gonzalo Toloza⁵, Noel Avalos¹, María L. Kennedy⁴, José G. Mejía-Valencia¹, Morena L. Martínez³, Marvin J. Núñez³, Miguel A. Moreno²

Correspondencia:
miguel.moreno@ues.edu.sv

Presentado: 3 de marzo de 2020
Aceptado: 25 de junio de 2020

- 1 Centro de Investigación y Desarrollo en Salud, Universidad de El Salvador.
- 2 Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemática, Universidad de El Salvador.
- 3 Laboratorio de Investigación en Productos Naturales, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador.
- 4 Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción, San Lorenzo, Paraguay.
- 5 Laboratorio de Química Clínica, Hospital Nacional Rosales, San Salvador, El Salvador.

RESUMEN

Introducción: La población utiliza la medicina a base de hierbas de forma indiscriminada basándose en la creencia de que las plantas medicinales carecen de efectos adversos. **Objetivo:** Determinar *in vivo* el efecto toxicológico y analgésico del extracto clorofórmico de las hojas de *Calea urticifolia*. **Metodología:** El estudio toxicológico fue realizado mediante la prueba de toxicidad subcrónica de 90 días, a dosis repetidas y continuas en ratones NIH. Se realizaron análisis de bioquímica sanguínea, hematología y el examen histopatológico de órganos. La actividad analgésica fue evaluada con el modelo *in vivo* de contorsiones abdominales. **Resultados:** La administración del extracto vegetal provocó la aparición de signos clínicos de toxicidad, alteraciones en los parámetros hematológicos y bioquímica sanguínea, además alteraciones histológicas en algunos de los órganos. La actividad analgésica a 100 mg/kg resultó comparable con el fármaco indometacina. **Conclusión:** Pese a la actividad analgésica demostrada, y de acuerdo a los efectos toxicológicos encontrados, no se recomienda el uso prolongado de las hojas de *Calea urticifolia*, para el tratamiento de enfermedades.

Palabras claves: *Calea urticifolia*, toxicidad subcrónica, analgesia.

ABSTRACT

Introduction: The population uses medicinal plants indiscriminately to treat diseases, with the believe that they are safe and lack adverse effects. **Objective:** To determine the *in vivo* toxicological and analgesic effect of the chloroform extract of *Calea urticifolia* leaves. **Methodology:** The toxicological study was performed using a 90-day sub-chronic toxicity test in NIH mice, at repeated and continuous doses. . Blood biochemistry, hematology and histopathological examination of organs were performed. The analgesic activity was evaluated *in vivo* using a model of abdominal contortions. **Results:** The administration of the plant extract caused the appearance of clinical signs of toxicity, alterations in hematic parameters and blood biochemistry, as well as histological alterations in some of organs. The analgesic activity at 100 mg/kg was similar to the Indomethacin drug. **Conclusion:** Despite the proven analgesic activity, according to the observed toxicological effects in this study, the prolonged use of *Calea urticifolia* leaves is not recommended for the treatment of diseases.

Keywords: *Calea urticifolia*, sub-chronic toxicity, analgesia.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años, la investigación y desarrollo de drogas de origen vegetal ha cobrado una especial importancia debido a la exhortación hecha por la Organización Mundial de la Salud, en el sentido de que cada país utilice todos sus recursos en pro de la atención primaria en salud. En países como El Salvador, que poseen una rica flora y valiosa tradición popular en la utilización de plantas medicinales, el uso de estas terapias sobrevive de una forma muy auténtica y por lo tanto asociada al empirismo en la mayoría de los casos; lo que sin lugar a dudas no deja de ser preocupante, en tanto que las especies vegetales pueden poseer sustancias tóxicas para el humano, recordemos que los metabolitos secundarios actúan como defensa química por el constante ataque en el entorno donde ellas subsisten.

Calea urticifolia es una especie vegetal de la flora salvadoreña utilizada en la medicina tradicional, a la que se asocian propiedades para el tratamiento del dolor, artritis, fiebre, cáncer, diabetes, y otros padecimientos (González, 2002). Diferentes autores han demostrado el efecto hipolipemiente, antiinflamatorio e hipoglucemiante por su actividad secretagoga de insulina en células β pancreática en ratas (Ortiz, 2011). *Calea urticifolia* debe sus

propiedades farmacológicas principalmente a la presencia de sesquiterpenlactonas (Nuñez *et al.*, 2017), sustancias que, además, han sido consideradas como las responsables de efectos tóxicos (Robles *et al* 1995; Alastair *et al.*, 1994), aunque también se ha reportado un flavonoide (Chaurasiya *et al* 2016) y más recientemente tres bisabolenos (Gogineni *et al* 2019). Nos encontramos entonces, con el hecho que *C. urticifolia*, es una especie químicamente dotada de compuestos que si bien, han sido ampliamente reportados por su actividad biológica en el tratamiento de múltiples trastornos, también han sido reportados como responsables químicos de efectos toxicológicos. En ese sentido, *Calea urticifolia*, especie perteneciente a la Familia Asteraceae, es un fuerte candidato a la evaluación farmacológica y toxicológica debido al uso folklórico que le confiere la población salvadoreña. En este sentido, el presente trabajo de investigación tuvo como objetivo, evaluar las características tóxicas y la actividad analgésica del extracto clorofórmico de *C. urticifolia*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las hojas de *Calea urticifolia* (Mill.) DC.

(Asteraceae) fueron colectadas en el Campus de la Universidad de El Salvador, San Salvador, El Salvador (latitud: 13°43'5.69"N, longitud: 89°12'2.34"W, elevación: 600 m), en julio de 2017 y fueron identificadas por Jenny Elizabeth Menjívar Cruz, curadora del Herbario del Museo de Historia Natural de El Salvador (J. Menjívar & M. Núñez 3220). Las hojas fueron secadas a 40 °C por 56 horas en estufa de aire circulante, Thermo Scientific, posteriormente fueron molidas en molino de cuchillas Thomas Scientific M4.

Preparación del extracto clorofórmico

Las hojas secas y molidas de *C. urticifolia* fueron extraídas con cloroformo (100.0 g, 2 x 1L), en un baño ultrasonido VWR (Modelo 97043-988) a temperatura ambiente (25°C) durante 90 minutos. El extracto fluido resultante fue concentrado utilizando un rotaevaporador (KNF RC-600) a 40 °C, luego fue transferido a un desecador con gel de sílice hasta obtener el extracto seco (6.79 g).

Animales de experimentación

Para la prueba de toxicidad, se utilizaron 30 ratones (15 por sexo) albinos suizos, con peso corporal entre 20 - 25g, de aproximadamente 5 semanas de edad, todos procedentes del Laboratorio de Experimentación Animal del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, donde se mantuvieron a una temperatura y humedad relativa controlada de 22±2 °C y entre 50-60 % respectivamente, con ciclo de luz - oscuridad de 12/12 horas, permaneciendo 5 animales por jaula, y marcados con ácido pírico para su identificación individual. Se verificó el estado de salud de todos los animales mediante un examen clínico antes de cada ensayo. La alimentación consistió en una dieta estándar a base de concentrado peletizado

para ratones y agua a voluntad.

Consideraciones éticas de las pruebas *in vivo*

Los estudios de toxicidad y actividad analgésica se realizaron conforme a lo establecido en las guías del Canadian Council on Animal Care para el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC, 1993). La toxicidad se realizó según lo establecido en el procedimiento normalizado de trabajo (PROC-NT005) del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) de la Universidad de El Salvador, basado en las guías 408 y 420 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD 1998; 2001) sobre la toxicidad oral de 90 días y el ajuste de dosis respectivamente.

El manejo de los animales se realizó por procedimientos estandarizados y la regla básica que se siguió fue el sacrificio por dislocación cervical de todo animal tratado. Para los ensayos se utilizó el número mínimo necesario, y el menor tiempo de duración de la observación requerida para obtener datos consistentes. Cada animal fue empleado una vez.

Estudio de toxicidad de 90 días

Administración de sustancias

La vía de administración de las sustancias (agua destilada y el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* a dosis de 300 mg/kg) fue por vía intragástrica, a un volumen de 1 mL por cada 100 g de peso corporal, diariamente durante los 90 días del estudio.

Observaciones clínicas, exámenes hematológicos y de bioquímica sanguínea

La observación de los ratones se realizó después de la administración diaria de las sustancias, con especial énfasis los primeros 30 minutos. Se registraron los siguientes parámetros: modificaciones de pelo, piel, ojos y mucosas, frecuencia respiratoria y actividad somatomotriz. Al finalizar los 90 días de administración, se tomaron muestras de sangre de los animales para realizar los análisis de bioquímica sanguínea y exámenes hematológicos, a excepción de los animales del grupo centinela, de quienes se realizaron las tomas correspondientes 14 días después. Se determinaron, bilirrubina, glucosa, nitrógeno ureico, creatinina, colesterol, triglicéridos, transaminasa glutámico oxalacética (TGO), transaminasa glutámico pirúvica (TGP), glóbulos rojos, plaquetas y glóbulos blancos. Todas estas determinaciones se realizaron en el Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Rosales con el equipo Beckman Coulter AU480.

Evaluación macroscópica y exámenes histopatológicos de órganos

Una vez colectadas las muestras sanguíneas para los exámenes hematológicos y de bioquímica sanguínea se procedió al sacrificio de los animales por dislocación cervical y se les extrajeron los órganos: hígado, corazón, pulmón, bazo, riñones, estómago e intestinos para ser examinados macroscópicamente y luego se fijaron en solución de formol al 10%. El grupo centinela permaneció 14 días (posteriores al período de administración) sin tratamiento alguno, luego se procedió de igual manera que los grupos anteriores, esto para determinar si existe reversibilidad de los efectos tóxicos. Los órganos evaluados y preservados en formalina al 10%, fueron procesados por medio de la

técnica histológica para bloques parafinados, cortadas a 5 μ m con un micrótopo marca Microm HM310 y después coloreadas con hematoxilina-eosina, para su posterior lectura.

Actividad analgésica

Prueba de ácido acético

Se emplearon ratones albinos suizos machos con pesos entre 20 - 30 g, provenientes del Bioterio del Departamento de Farmacología de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Asunción (Paraguay), criados y mantenidos en ambiente climatizado. La noche anterior a los experimentos, se les retiraron los alimentos (excepto el agua) para realizar las pruebas en ayunas. Los animales fueron divididos en 6 grupos de 8 ratones. 60 minutos previo a la inducción de dolor (ácido acético, 0.1 mL, vía intraperitoneal, 1%), los animales fueron tratados por vía oral como: blanco, vehículo (EtOH:H₂O:1:9, 0.1 mL/10 g); Indometacina (10 mg/kg); 1, 10 y 100 mg/kg del extracto clorofórmico de *C. urticifolia*, respectivamente.

Después de cinco minutos de la administración de ácido acético (0.1 mL, ip, 1%) se contó el número de contorsiones abdominales que presentaron todos los animales de los diferentes grupos durante 30 min (Koster *et al.*, 1959).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron estadísticamente evaluados con el software SPSS versión 21 para la toxicidad, y con GraphPad Prisma 7.0 para la prueba de analgesia. Se utilizó el contraste de Shapiro y Wilks para la prueba de normalidad. En el estudio de toxicidad, los resultados de aumento porcentual peso corporal y peso de órganos se sometieron a un análisis de comparación de medias para muestras independientes. Los resultados de la evaluación

de la actividad analgésica se analizaron estadísticamente mediante un análisis de varianza (ANOVA) de una vía; seguido de un test de Dunnet. Se consideró significativa la diferencia entre los grupos tratados y el grupo control (agua destilada) cuando el valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio de toxicidad de 90 días

Observaciones clínicas y peso corporal

Las observaciones clínicas diarias a los grupos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* mostraron alteraciones en algunos de los parámetros evaluados, como deshidratación, piloerección, vasoconstricción periférica, disminución de la temperatura corporal (al tacto), aceleración respiratoria, encorvamiento de la espalda, disminución de la actividad motora y alteraciones en la respuesta a estímulos externos; observaciones que indican un deterioro de la condición de salud de los animales y deben ser considerados como signos de toxicidad.

Las alteraciones clínicas descritas anteriormente, pueden ser explicadas por la presencia de sesquiterpenlactonas en la sustancia de estudio (Nuñez *et al.*, 2017), sustancias que han sido reportadas como responsables de efectos tóxicos neurológicos y en músculo cardíaco (Alastair *et al.*, 1994; Robles *et al.*, 1995). Además, sesquiterpenlactonas aisladas de especies que forman parte de la Familia Asteraceae, presentaron efectos inhibitorios en la contractilidad del músculo liso intestinal en conejillos de indias (Amorin, 2013), efecto que además podría explicar el nulo aumento normal y la caída del peso corporal en los grupos hembras tratadas con el extracto de *C. urticifolia* (Tabla 1), debido a

una inhibición de la absorción de nutrientes a través de este tejido. Por otro lado, ésta pérdida de peso corporal, podría estar relacionada con una disminución en la ingesta de alimento y que a su vez concuerda con la disminución estadísticamente significativa en el peso del estómago de las hembras tratadas con el extracto (Tabla 4). Así mismo el encorvamiento de espalda observado en animales de ambos sexos tratados con el extracto, debe ser considerado como indicador de dolor abdominal que puede estar relacionado con la naturaleza irritante de las sesquiterpenlactonas sobre la mucosa intestinal (Hoffmann, 2003).

Por su parte, el manual del Consejo Canadiense para Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CCAC, 1998) describe que a medida que la condición del animal empeora éste llega a ser silencioso y deja de reaccionar a estímulos. También describe la hipotermia como signo del deterioro de la condición de salud. Coincidentemente, la disminución de la actividad motora, la poca reacción a estímulos y la disminución en la temperatura corporal (al tacto), fueron condiciones observadas en los grupos de animales tratados con la sustancia de estudio.

Bioquímica sanguínea y hematología sanguínea

Por otro lado, las alteraciones bioquímicas del organismo son resultado de la exposición a un compuesto químico que también modifica la composición celular sanguínea (Mancebo *et al.*, 2002). En cuanto a la bioquímica sanguínea reportada en esta investigación (Tabla 2), resulta importante mencionar la elevación de los valores de TGP observado únicamente en el grupo de hembras tratadas con la sustancia en estudio, que presume según Wasan *et al.*, (2001); Crook (2006) y González *et al.*, (2006), que sea consecuencia de un daño hepático; aunque de carácter leve en tanto

Tabla 1. Peso corporal en gramos.

Sexo	Hembras				Machos				
	Grupo	Inicio	Final	Aumento (%)	P valor	Inicio	Final	Aumento (%)	P valor
Control		22.08 ± 0.62	24.92 ± 0.53	12.86		26.57 ± 0.72	29.76 ± 0.97	12.03	
Tratamiento		22.23 ± 0.56	22.24 ± 1.17	0.05	0.001*	24.48 ± 1.96	26.76 ± 1.98	9.63	0.603
Centinela		22.02 ± 0.69	21.40 ± 1.01	-2.77	0.000**	24.74 ± 1.82	26.50 ± 1.90	7.23	0.160

* Valor de p < 0.05; ** Valor de p < 0.001; DE: Desviación Estándar.

Tabla 2. Comparativa de los valores promedio de bioquímica sanguínea.

Parámetro	Grupo	Hembras				Machos			
		Media	±	D.E.	P valor	Media	±	D.E.	P valor
Bilirrubina	Control	0.306	±	0.199		0.292	±	0.134	
	Tratamiento	0.260	±	0.163	0.701	0.364	±	0.195	0.556
	Centinela	0.138	±	0.082	0.120	0.120	±	0.000	0.083
Glucosa (mg/dl)	Control	171.000	±	24.062		197.33	±	13.203	
	Tratamiento	192.333	±	3.055	0.202	178.00	±	5.291	0.078
	Centinela	150.000	±	27.404	0.375	171.80	±	15.073	0.052
Nitrógeno ureico	Control	19.250	±	1.258		24.333	±	2.516	
	Tratamiento	22.000	±	6.245	0.527	32.600	±	5.683	0.059
	Centinela	21.000	±	3.559	0.390	29.200	±	3.563	0.086
Creatinina	Control	0.385	±	0.190		0.317	±	0.120	
	Tratamiento	0.217	±	0.197	0.268	0.125	±	0.057	0.028*
	Centinela	0.080	±	0.016	0.019*	0.122	±	0.032	0.010*
Colesterol (mg/dl)	Control	84.000	±	14.422		82.333	±	11.150	
	Tratamiento	107.333	±	39.310	0.389	132.400	±	12.259	0.001*
	Centinela	-	±	-	-	-	±	-	-
Triglicéridos	Control	135.000	±	22.605		193.666	±	57.709	
	Tratamiento	161.333	±	47.056	0.432	205.500	±	11.818	0.758
	Centinela	-	±	-	-	-	±	-	-
TGO (Transaminasa Oxalacética)	Control	85.333	±	13.012		124.666	±	7.571	
	Tratamiento	109.000	±	21.377	0.177	86.800	±	7.429	0.000**
	Centinela	77.250	±	8.732	0.366	75.500	±	4.041	0.000**
TGP (Transaminasa Pirúvica)	Control	54.500	±	2.886		72.500	±	5.066	
	Tratamiento	63.000	±	1.732	0.007*	74.750	±	9.945	0.701
	Centinela	56.000	±	2.943	0.494	63.200	±	9.338	0.119

* Valor de p < 0.05; ** Valor de p < 0.001; DE: Desviación Estándar.

que, según Tejada (2010), un aumento leve de transaminasas acompañado de niveles normales de bilirrubina indica la presencia de una alteración de carácter leve a nivel hepático; combinación de resultados que concuerdan con lo observado en el grupo de hembras expuestas a la sustancia en estudio.

En cuanto a la disminución de los valores de creatinina en los grupos tratados con la sustancia de ensayo, para el caso de las hembras, podría estar relacionada con el nulo aumento y pérdida de peso corporal. Según (Silva et al, 2012) los niveles de creatinina tienen una relación lineal con el peso corporal de los

animales, en tanto que este último guarda relación con la masa muscular, y por lo tanto una disminución en el peso corporal se verá reflejada en la reducción de los niveles de creatinina. Para el caso del grupo machos, la disminución de los niveles de creatinina no está clara.

Para el caso del hígado, Ríos (1998) describe que en la respuesta tóxica manifestada en

inflamación (coincidente con el aumento de peso de este órgano al menos en hembras tratadas con *C. urticifolia*) se produce una migración de linfocitos al espacio porta, alrededor de los hepatocitos necróticos, neutrófilos y otras células inflamatorias, lo que concuerda con el aumento de los monocitos observados en los grupos centinelas de ambos sexos (Tabla 3), y las observaciones histológicas en este órgano (Figura 1).

Tabla 3. Comparativa de los valores promedio de hematología.

Parametro	Grupo	Hembras			Machos		
		Media ± DE	P valor		Media ± DE	P valor	
Glóbulos rojos	Glóbulos rojos (10e6/ μ L)	Control	10.310 ± 0.241		10.678 ± 0.678		
		Tratamiento	10.235 ± 0.201	0.634	10.580 ± 0.287	0.774	
		Centinela	10.465 ± 0.246	0.374	10.394 ± 0.276	0.411	
	Hemoglobina (mg/dl)	Control	15.620 ± 0.349		15.560 ± 0.403		
		Tratamiento	15.500 ± 0.244	0.581	15.960 ± 0.378	0.145	
		Centinela	15.800 ± 0.469	0.529	15.400 ± 0.387	0.540	
	Hematocrito	Control	48.360 ± 0.920		48.300 ± 1.392		
		Tratamiento	47.240 ± 2.227	0.329	50.140 ± 1.438	0.074	
		Centinela	51.625 ± 1.279	0.003*	51.780 ± 0.920	0.002*	
Plaquetas (10e3/ μ L)	Control	1540.5 ± 86.681		1612.8 ± 89.604			
	Tratamiento	1515.3 ± 64.685	0.657	1414.0 ± 47.972	0.008*		
	Centinela	1529.0 ± 189.285	0.917	1493.0 ± 104.718	0.133		
Glóbulos blancos	Glóbulos blancos (10e3/ μ L)	Control	10.280 ± 3.133		11.560 ± 3.110		
		Tratamiento	6.425 ± 1.175	0.054	6.800 ± 0.673	0.021*	
		Centinela	6.625 ± 1.081	0.063	12.240 ± 3.090	0.738	
	Neutrófilos (10e3/ μ L)	Control	1.214 ± 0.383		1.444 ± 0.343		
		Tratamiento	0.963 ± 0.056	0.318	1.175 ± 0.044	0.157	
		Centinela	0.845 ± 0.168	0.119	1.522 ± 0.297	0.711	
	Linfocitos (10e3/ μ L)	Control	8.964 ± 2.903		10.002 ± 2.782		
		Tratamiento	5.315 ± 1.128	0.051	5.625 ± 0.604	0.023*	
		Centinela	5.660 ± 0.926	0.067	10.438 ± 2.943	0.816	
	Monocitos (10e3/ μ L)	Control	0.040 ± 0.020		0.088 ± 0.064		
		Tratamiento	0.054 ± 0.019	0.325	0.056 ± 0.016	0.340	
		Centinela	0.102 ± 0.029	0.013*	0.258 ± 0.179	0.081	
	Eosinófilos (10e3/ μ L)	Control	0.002 ± 0.004		0.000 ± 0.000		
		Tratamiento	0.002 ± 0.004	1.000	0.000 ± 0.000	-	
		Centinela	0.002 ± 0.005	0.879	0.000 ± 0.000	-	
Basófilos (10e3/ μ L)	Control	0.012 ± 0.008		0.010 ± 0.007			
	Tratamiento	0.008 ± 0.008	0.471	0.010 ± 0.012	1.000		
	Centinela	0.005 ± 0.005	0.200	0.010 ± 0.000	1.000		

* Valor de $p < 0.05$; DE: Desviación Estándar.

Peso de órganos

Como se aprecia en la tabla 4, los pulmones de los animales para ambos sexos aumentaron de peso significativamente en todos los grupos tratados con el extracto de *C. urticifolia*, pero sólo en las hembras los pulmones mostraron hiperemia vascular y cúmulos linfoides.

Del mismo modo, el significativo aumento en el peso del bazo en los grupos expuestos a *C. urticifolia* de ambos sexos, podría estar relacionado con la alteración leve en hígado descrita anteriormente para los mismos grupos, en tanto que, según Vargas *et al.*, (2013) entre las principales causas del aumento en el tamaño de este órgano, encontramos procesos de alteración de la función hepática.

Tal como se aprecia en la tabla 4, los órganos extraídos mostraron algunas diferencias entre los grupos control y los tratados con la sustancia de estudio. Según Dybing *et al.* (2002) y Höfle (2007), el peso relativo de los órganos es fundamental para diagnosticar si el órgano fue expuesto a la lesión o no. De manera relevante, podemos mencionar el aumento observado en el peso del hígado, bazo y pulmones en los grupos tratados con la sustancia de estudio para ambos sexos, que podría ser un indicativo de daño a estos órganos. Lo anterior concuerda con lo expuesto por Kumar *et al.* (2008), quien afirma que el corazón, el hígado, los riñones, el bazo y los pulmones son los primeros órganos afectados por reacción metabólica causada por agentes tóxicos.

Tabla 4. Valores promedio del peso de órganos.

Órgano	Grupos	Hembras				Machos			
		Media	±	D.E.	Sig.	Media	±	D.E.	Sig. Bilateral
Hígado	Control	1.096	±	0.099		1.288	±	0.078	
	Tratamiento	1.126	±	0.092	0.635	1.430	±	0.144	0.090
	Centinela	1.190	±	0.068	0.152	1.528	±	0.455	0.000*
Corazón	Control	0.100	±	0.014		0.126	±	0.005	
	Tratamiento	0.106	±	0.015	0.536	0.115	±	0.005	0.022*
	Centinela	0.090	±	0.028	0.508	0.120	±	0.008	0.227
Pulmones	Control	0.132	±	0.008		0.144	±	0.013	
	Tratamiento	0.178	±	0.017	0.001*	0.178	±	0.024	0.028*
	Centinela	0.170	±	0.018	0.002*	0.188	±	0.029	0.016*
Bazo	Control	0.132	±	0.013		0.086	±	0.019	
	Tratamiento	0.137	±	0.005	0.456	0.088	±	0.016	0.865
	Centinela	0.170	±	0.018	0.008*	0.122	±	0.005	0.009*
Riñones	Control	0.172	±	0.005		0.209	±	0.010	
	Tratamiento	0.165	±	0.013	0.309	0.206	±	0.028	0.831
	Centinela	0.195	±	0.004	0.000**	0.210	±	0.015	0.910
Estómago	Control	1.578	±	0.512		0.762	±	0.128	
	Tratamiento	0.622	±	0.114	0.004*	1.110	±	0.439	0.180
	Centinela	0.682	±	0.084	0.011*	0.546	±	0.212	0.119
Intestino Delgado	Control	2.013	±	0.032		1.612	±	0.248	
	Tratamiento	2.046	±	0.178	0.709	1.982	±	0.261	0.086
	Centinela	2.173	±	0.025	0.002*	1.882	±	0.185	0.132
Intestino Grueso	Control	0.884	±	0.101		0.810	±	0.027	
	Tratamiento	0.782	±	0.079	0.116	0.740	±	0.098	0.251
	Centinela	0.815	±	0.078	0.303	0.897	±	0.020	0.001**

* Valor de $p < 0.05$; ** Valor de $p < 0.001$; DE: Desviación Estándar.

Histopatología

Existieron diferencias en las lesiones encontradas en los órganos de los grupos control y de los grupos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* (Figura 1). En los grupos tratados con el extracto vegetal, los pulmones mostraron hiperemia vascular y acúmulos linfoides; además, el hígado aparece con dilatación e infiltrado inflamatorio crónico de interfase y el riñón con hipercelularidad glomerular y focos de infiltrado inflamatorio

crónico. Además, se observa el bazo con dilatación de la pulpa blanca y congestión de la pulpa roja.

La dilatación e infiltrado inflamatorio crónico observado en el grupo de hembras durante el examen microscópico del hígado, además del infiltrado crónico en riñón, concuerda con los valores aumentados de TGO, y demuestran nuevamente el potencial tóxico de esta especie vegetal, lo que concuerda con la toxicidad reportada por Zárybnický *et al.* (2017).

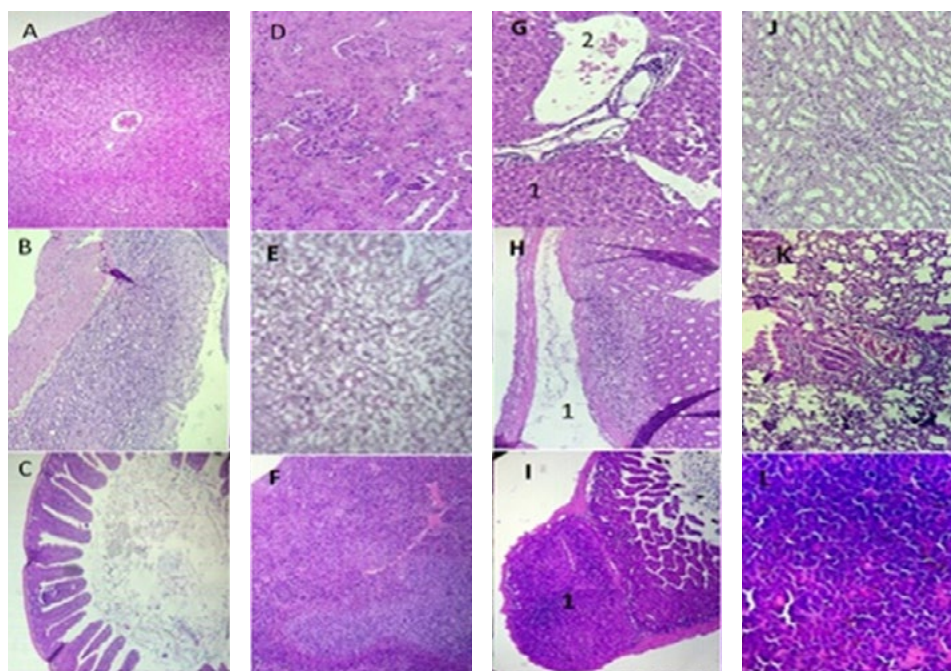


Figura 1. A. Hígado sin alteración. B. Estómago sin alteraciones. C. Intestino sin alteraciones. D. Riñón sin alteraciones. E. Pulmón sin alteraciones. F. Bazo sin alteraciones. G. Hígado con dilatación y congestión vascular (1) e infiltrado inflamatorio crónico (2). H. Estómago con acúmulos de linfocitos (1). I. Intestino con acúmulos linfoides (1). J. Riñón con focos de infiltrado inflamatorio crónico. K. Pulmón con discreto infiltrado inflamatorio crónico. L. Bazo con dilatación de la pulpa blanca y congestión de pulpa roja.

Por otro lado, en la respuesta tóxica del hígado manifestada en inflamación, se produce una migración de linfocitos al espacio porta, alrededor de los hepatocitos necróticos, neutrófilos y otras células inflamatorias (Watson *et al.*, 2003; Jorge y Jorge, 2005), esto explicaría el aumento de los monocitos en grupos tratados con el extracto de *C. urticifolia*. También hubo aumento de peso significativo,

palidez, hipercelularidad glomerular y focos de infiltrado inflamatorio crónico en riñón que sugieren daño renal a causa de la administración del extracto en estudio y concuerda con lo observado por Barbosa de Oliverira (2011), quien reporta daño de la función renal a consecuencia de la administración de una especie vegetal que al igual que *C. urticifolia* presenta sesquiterpenlactonas

como principal sustancia tóxica. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por Schmidt (1999), quien menciona daños en hígado, riñón y mucosa gastrointestinal en necropsias de animales expuestos a plantas con sesquiterpenlactonas.

Por último, queda en evidencia las diferencias en la respuesta tóxica relacionadas al sexo. La reducción en la ganancia y hasta la disminución del peso corporal en los grupos hembras, además de diferencias estadísticamente significativas en algunos parámetros evaluados según el género, demuestran una mayor susceptibilidad de las hembras a los efectos tóxicos en hígado y riñón a causa del extracto en estudio, lo que concuerda con lo reportado por Mennecozzi et al (2015), quienes encontraron una mayor sensibilidad general de los hepatocitos primarios femeninos a hepatotóxicos. Por otro lado, otros autores (Waxman, Holloway, 2009) han identificado genes cuya expresión dependiente del género condiciona un dimorfismo sexual de la función metabólica y la fisiopatología, además de diferencias fenotípicas de la respuesta a agentes tóxicos (Lee et al., 2009; Lee et al, 2015)

Actividad analgésica

Prueba de ácido acético

Con el fin de validar el uso popular como analgésico, que se le atribuye a esta especie vegetal, se llevó a cabo la prueba de ácido acético (Figura 2), y se observó una disminución estadísticamente significativa del dolor (contorsiones abdominales) en los grupos de animales tratados con las tres dosis del extracto vegetal en comparación con el grupo control negativo tratado con agua destilada. Como puede observarse, a medida aumenta la concentración del extracto disminuye el dolor, a tal punto de alcanzar

valores estadísticamente similares entre los grupos tratados con Indometacina y la dosis de 100 mg/kg del extracto clorofórmico de *C. urticifolia*. Estos resultados concuerdan con la actividad analgésica de sesquiterpenlactonas previamente reportada (Valério et al., 2007; Wesolowska et al., 2006), y que además se valida el uso popular de esta especie vegetal como un analgésico natural.

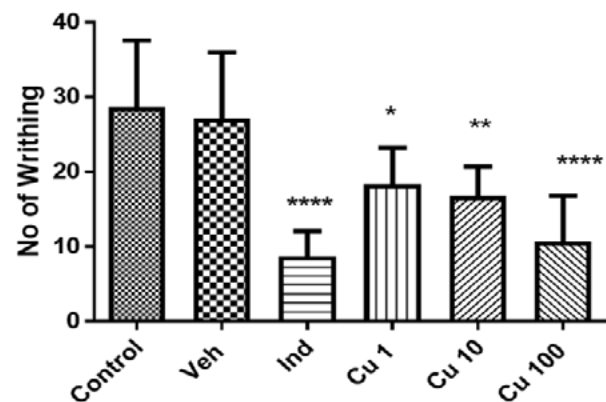


Figura 2. Contorsiones abdominales en ratones tratados con *Calea urticifolia*. Los valores están expresados como media \pm Desviación estándar (n= 8). Anova de una vía, post test de Dunnet. *= p<0.02; **= p<0.001; ****= p<0.0001, significativamente diferentes al grupo control. Cu 1, *C. urticifolia* 1 mg/Kg; Cu 10, *C. urticifolia* 10 mg/Kg; Cu 100, *C. urticifolia* 100 mg/Kg; Ind, indometacina 10 mg/Kg.

CONCLUSIONES

Las signos tóxicos más relevantes encontrados en los grupos tratados con el extracto clorofórmico de *C. urticifolia* son lesiones en hígado, riñón y mucosa gastrointestinal. Además, fue manifestada por deshidratación, piloerección, vasoconstricción periférica, disminución de la temperatura corporal, encorvamiento de la espalda, disminución en la actividad motora, disminución del peso corporal y el aumento de peso en hígado, pulmones y bazo de algunos de los grupos tratados con la sustancia de ensayo. A pesar de que se validó el uso popular como analgésico de *C. urticifolia*, no se recomienda el

uso prolongado de esta especie vegetal debido a su potencial tóxico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Hay AJB, Hamburger M, Hostettmann K, Hoult JRS. Toxic inhibition of smooth muscle contractility by plant-derived sesquiterpenes caused by their chemically reactive α -methylenebutyrolactone functions. *Br. J. Pharmacol.* 1994;112, 9-12.
- Amorim MHR, Gil da Costa RM, Lopes C, Bastos MMSM. Sesquiterpene lactones: Adverse health effects and toxicity mechanisms. *Crit Rev Toxicol*, 2013; 43, 559-579.
- De Oliveira RB, de Paula DAC, Rocha BA, Franco JJ, Gobbo-Neto L, Uyemura SA, Da Costa FB. Renal toxicity caused by oral use of medicinal plants: The yacon example. *J. Ethnopharmacol.*, 2011; 133, 434-441.
- CCAC. Manual sobre el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación. Consejo Canadiense de Protección de los Animales. Manual vol. 1 (2nda edición), 1998; 322 p.
- Chaurasiya ND, Gogineni V, Khaled M, Elokely KM, León F, Núñez MJ, Klein ML, Walker LA, Cutler SJ, Tekwani BL. Isolation of acacetin from *Calea urticifolia* with Inhibitory Properties against Human Monoamine Oxidase-A and -B, *J. Nat. Prod.* 2016; 79, 2538-2544.
- Crook MA. Clinical Chemistry and Metabolic Medicine. 7 Edition. Hodder Arnold, London, p. 426; 2006.
- Dybing E, Doe J, Groten J, Kleiner J, O'Brien J, Renwick A, Younes M. Hazard characterization of chemicals in food and diet. *Food and Chem. Toxicol.* 2002; 40, 237-282.
- Gogineni V, Nael MA, León F, Núñez MJ, Cutler SJ. Computationally aided stereochemical assignment of undescribed bisabolones from *Calea urticifolia*, *Phytochemistry*, 2019; 157, 145-150.
- González Ayala JC. Botánica Medicinal Popular, Etnobotánica Medicinal de El Salvador, Editorial Cuscatlania, 2a Edición, Vol. 2, p. 189; 2002.
- González Torres Y, Scull Campos I, Bada Barro AM, Fuentes Morales D, González Navarro B, Arteaga Pérez ME. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. *Rev Cubana Plant Med.* 2006; 11(2).
- Hoffmann D. Medicinal herbalism: the science and practice of herbal medicine. Rochester, UK: Healing Arts Press; 2003.
- Höfle U. Técnicas de Diagnóstico Post-Mortem: Necropsia y Toma de Muestras. España: Sevilla de la Jara; 2007.
- Jorge OA, Jorge AD. Hepatotoxicity associated with the ingestion of *Centella asiatica*. *Rev. Esp. Enferm. Dig.*, 2005; 97, 115-124.
- Koster R, Anderson M, De Beer YJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, 1959; 18:412.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins y Cotran. Patología Estructural y funcional. 8ª edición. Barcelona: Elsevier Saunders; 2010.
- Lee J, Prokopec SD, Watson JD. et al. Male and female mice show significant differences in hepatic transcriptomic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *BMC Genomics*. 2015. 16, 625.
- Mancebo A, Scull I, González Y, Arteaga ME, González BO, Fuentes D, Hernández O, Correa. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. *Rev Toxicol.* 2002. 19, 73-78.
- Mennecozi M, Landesmann B, Palosaari T,

- Harris G, Whelan M. Sex Differences in Liver Toxicity—Do Female and Male Human Primary Hepatocytes React Differently to Toxicants In Vitro?. *PLoS ONE*. 2015. 10(4).
- Nuñez MJ, Villacorta Hernández JR, Rivas RM, Sánchez-Pérez JP, Martínez de Díaz ML. Cuantificación de sesquiterpenlactonas procedentes de las hojas de *Calea urticifolia* (Asteraceae) durante el año 2012. *Revista Científica Multidisciplinaria De La Universidad De El Salvador-Revista Minerva*, 2017; 1, 43-52.
- OECD. Guideline for the testing of chemicals N° 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Organization for Economic Cooperation and Development; 1998.
- OECD. Guideline for Testing of Chemicals N°420. Acute Oral Toxicity—Fixed Dose Procedure. Organization for Economic Cooperation and Development; 2001.
- Ortiz Segura MC. Evaluación del extracto etanólico de *Calea urticifolia* (mill.) Dc. Sobre la regulación de la secreción de adipocinas asociadas a la resistencia a la insulina. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias Químicas, Ingeniería y Medicina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí; 2011.
- Ríos J. Patología General. Tomo I. 3ª Edición. Librería Editorial Juventud. La Paz, Bolivia; 1998.
- Robles M, Argullin M, West J, Rodriguez E. Recent Studies on the Zoopharmacognosy, Pharmacology and Neurotoxicology of Sesquiterpene Lactones. *Planta Med.*, 1995; 61, 199-203.
- Silva LFC, Valadares Filho SC, Chizzotti ML, Rotta PP, Prados LF, Valadares RFD, Zanetti D, Braga JMS. (2012). Creatinine excretion and relationship with body weight of Nellore cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41(3), 807-810.
- Schmidt TJ. Toxic Activities of Sesquiterpene Lactones – Structural and Biochemical Aspects. *Current Org. Chem.*, 1999; 3, 577-605.
- Tejada Cifuentes F. Hepatotoxicidad por Fármacos. *Rev. Clín. Med. Fam.*, 2010; 3, 177-191
- Valério DAR, Cunha TM, Arakawa NS, Lemos HP, Da Costa FB, Parada CA, Verri WA. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *Eur. J. Pharmacol.*, 2007; 562, 155-163.
- Vargas VP, Hurtado MR, Villalobos AJÁ. Esplenomegalia. *Rev. Fac. Med. UNAM*. 2013; 56, 37-45.
- Watson WH, Dahm LJ, Jones DP. Mechanisms of chemically induced liver disease. En Zakim D, Boyer TD. *Hepatology. A text book of Liver Disease*. Philadelphia: Saunders, 2003. p. 739-53.
- Waxman DJ, Holloway MG. Sex differences in the expression of hepatic drug metabolizing enzymes. *Mol. Pharmacol.* 2009. v.76, n.2, p.215-228.
- Wesołowska A, Nikiforuk A, Michalska K, Kisiel W, Chojnacka-Wójcik E. Analgesic and sedative activities of lactucin and some lactucin-like guaianolides in mice. *J. Ethnopharmacol.*, 2006; 107, 254-258.
- Zárybnický T, Boušová I, Ambrož M, Skálová L. (2017). Hepatotoxicity of monoterpenes and sesquiterpenes. *Arch. Toxicol.*, 2017; 92, 1-13.