



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS

POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

“EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA *IN SILICO*, *IN VITRO* E *IN OVO* DE COMPUESTOS BIOACTIVOS DE *A. SATIVUM*”

TESIS

QUE PRESENTA

LIC. BG. SONIA LETICIA RAMÍREZ VARELA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

DIRECTORES

DRA. GEOVANNA NALLELY QUIÑONEZ BASTIDAS

DR. LORENZO ULISES OSUNA MARTÍNEZ

ASESOR

DR. RAÚL ARGÜELLO GARCÍA

CULIACÁN DE ROSALES, SINALOA, MÉXICO A NOVIEMBRE DE 2024.



Dirección General de Bibliotecas
Ciudad Universitaria
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57
dgbuas@uas.edu.mx

UAS-Dirección General de Bibliotecas

Repositorio Institucional Buelna

Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial
Compartir Igual, 4.0 Internacional



DEDICATORIA

“No lo olvides Zelda... algún día tu sabiduría será tu salvación”

Nayru- Echoes of wisdom.

El siguiente trabajo está dedicado especialmente a mi círculo más cercano, mi familia nuclear y adquirida, gracias a mis padres: María Varela de la Rosa y Manuel Ramírez Lozano, por apoyarme hasta donde sus capacidades lo permitieron, a mi suegra: Maribel Zavala Bejarano, por adoptarme como una hija más y darme un segundo hogar, a mi pareja: Daniel Alcantar Zavala, por acompañarme en este gran trayecto, aconsejarme y hacer más divertido nuestros días.

AGRADECIMIENTOS

Al posgrado en Ciencias Biomédicas por haberme aceptado en el programa de maestría.

Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCYT) por el financiamiento económico para llevar a cabo este trabajo.

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento al Dr. Ulises Osuna Martínez, mi director de tesis, por su invaluable apoyo y orientación durante todo el proceso de investigación. Su conocimiento me permitió profundizar en el proyecto, alcanzar los objetivos propuestos y mejorar mi aportación como miembro del LIFFT. Su dedicación, paciencia y disponibilidad para discutir ideas y resolver dudas fueron fundamentales para el éxito de este proyecto. Agradezco especialmente la confianza brindada para llevar a cabo esta investigación. Su influencia en mi formación académica y personal es imborrable y siempre será recordada con gratitud.

Dra. Geovanna Quiñonez, le agradezco por ser mi directora de tesis, confiar en mí para compartir el conocimiento adquirido con sus alumnos y por sus consejos clave para el desarrollo del proyecto.

Dr. Raúl Argüello García, gracias por su asesoría, orientación, enseñanzas y consejos, por donar los compuestos utilizados en el presente proyecto de investigación y por su disposición en todo momento a resolver dudas.

A los compañeros del laboratorio: Dr. Lumadhar, MCB. Analy, MC. Eduardo, Dra. Alicia, a mis hijos pollitos: LBG. Alfredo y LBG. Janer (que siempre tuvieron la mejor disposición a aprender y compartir sus ideas, en ayudar en todas las fases de experimentación, estoy tan orgullosa de ustedes), a QFB. Denisse, QFB. Dany y MCB. Valeria, por los buenos ratos y el apoyo en este trabajo.

A Laisa, por escucharme, por los consejos y el apoyo incondicional siempre.

A mis hermanos y hermanas, mis sobrinas (os) y a mi pequeñita (con su ternura me da ánimos de seguir esforzándome), siempre al pendiente y orgullosos de mí.

A mi cuñado y cuñada: Dr. Eleazar Alcántar Zavala y a Lic. Diana piña, por su apoyo y consejo, por esas salidas familiares que tanto disfrutamos.

Al tarado, aunque ahora no seamos amigos, de cierta manera también fue parte importante en mi vida.

A Doo-jul, mis dos rayitas... hubiera sido lindo que fueras el primer bebé en el lab, aun así lo sucedido me orilló a aceptar que también es válido cuidar la salud mental y que aunque es bueno enfocarse en los estudios, también es válido tener un espacio personal para aliviar el corazón, me hiciste más humana y a tener mayor empatía.

A todos, los quiero, espero que sigan disfrutando de salud, paz y amor en sus vidas, que todo lo que se propongan lo obtengan, ahí estaré para apoyarlos de igual manera.

ÍNDICE GENERAL

	Página
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT	2
III. INTRODUCCIÓN.....	3
IV. ANTECEDENTES	5
4.1. El ajo en la medicina tradicional	5
4.2. Distribución y producción de <i>A. sativum</i> a nivel mundial y en México	7
4.3. Tipos de ajo.....	9
4.4. Composición general del ajo	10
4.5. Composición química del ajo.....	11
4.6. Efectos secundarios, contraindicaciones y toxicidad del ajo.....	12
4.7. Estudios de toxicidad.....	14
4.7.1. Evaluación de dosis única	16
4.7.2. Evaluación de dosis repetidas.....	16
4.7.3. Evaluación del estudio subagudo.....	17
4.7.4. Evaluación del estudio subcrónico	17
4.7.5. Evaluación del estudio crónico.....	17
4.8. Estudios alternativos de toxicidad	18
4.8.1. Evaluación de hemotoxicidad.....	18
V. JUSTIFICACIÓN	29
VI. HIPÓTESIS	30
VII. OBJETIVOS	31
7.1. Objetivo general	31
7.2. Objetivos específicos	31
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS	32
8.1. Lugar de trabajo.....	32
8.2. Materiales.....	32
8.3. Diseño experimental	33
8.4 Análisis predictivo ADMET mediante plataformas bioinformáticas	34
8.4.1 Plataforma ADMETLab 3.0.....	34

8.8.1	Análisis estadístico de hemotoxicidad <i>in vitro</i> sobre células eritrocitarias humanas	49
8.8.2	Análisis estadístico de embriotoxicidad y teratogénesis <i>in ovo</i> sobre embriones <i>G. gallus</i>	49
8.8.2	Análisis estadístico de regresión lineal para CL ₅₀ embriotóxica y CE ₅₀ teratogénica	49
IX.	RESULTADOS	50
9.1.	Evaluación <i>in silico</i> de propiedades farmacocinéticas de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	50
9.1.1	Probabilidad de absorción gastrointestinal humana de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	50
9.1.2	Probabilidad de unión a proteínas plasmáticas de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	52
9.1.3	Predicción de la permeación de la barrera hematoencefálica para los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	53
9.1.4	Predicción de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> sobre la probabilidad de ser sustrato de PgP	53
9.1.5	Predicción de tiempo de vida medio sobre los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	54
9.1.6	Predicción sobre depuración renal de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	55
9.2.	Evaluación <i>in silico</i> de propiedades de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como inhibidores de subfamilias del CYP450.. ¡Error! Marcador no definido.	
9.2.1	Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como inhibidor del CYP1A2	58
9.2.2	Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como inhibidor del CYP2C9.....	58
9.2.3	Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como inhibidor del CYP2C19.....	59
9.2.4	Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como inhibidor del CYP2D6.....	58
9.2.5	Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como inhibidor del CYP3A4	60
9.3.	Evaluación <i>in silico</i> de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como sustratos de subfamilias del CYP450	61
9.4.	Evaluación <i>in silico</i> del perfil de química medicinal de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	63

9.5. Evaluación <i>in silico</i> del perfil toxicológico de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	66
9.5.1 Evaluación <i>in silico</i> del predictivo de hepatotoxicidad de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	66
9.5.2 Evaluación <i>in silico</i> del predictivo de toxicidad respiratoria de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	68
9.5.3 Evaluación <i>in silico</i> del predictivo de toxicidad oral aguda en ratas de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	¡Error! Marcador no definido.
9.5.4 Evaluación <i>in silico</i> de los predictivos: toxicidad Ames y carcinogénesis de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	69
9.5.5 Evaluación <i>in silico</i> del predictivo de hemotoxicidad y anemia de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	70
9.5.6 Evaluación <i>in silico</i> del predictivo genotóxico, embriotóxico y teratogénico de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	71
9.5.7 Evaluación <i>in silico</i> de reglas de toxicóforo de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	¡Error! Marcador no definido.
9.6. Evaluación <i>in silico</i> de las vías de señalización asociadas a toxicidad de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	¡Error! Marcador no definido.
9.7. Evaluación <i>in vitro</i> de hemotoxicidad de compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> sobre eritrocitos humanos	77
9.8. Evaluación <i>in ovo</i> de embriotoxicidad y teratogénesis de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	81
X. DISCUSIÓN.....	91
XI. CONCLUSIONES.....	114
XII. PERSPECTIVAS	115
XIII. BIBLIOGRAFÍA.....	116
XIV. ANEXOS.....	146
XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES.....	153

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1.	Morfología del ajo	6
2.	Compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	8
3.	Estudios de toxicidad	15
4.	Estudios alternativos de toxicidad: Evaluación <i>in vitro</i> , <i>in ovo</i> e <i>in silico</i>	19
5.	Diseño experimental propuesto en la evaluación <i>in silico</i> de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	35
6.	Diseño experimental propuesto para la evaluación <i>in vitro</i> de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	37
7.	Diseño experimental para la evaluación toxicológica de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	39
8.	Evaluación <i>in vitro</i> de hemotoxicidad de compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> y del control estructural no sulfuroso dialil éter sobre eritrocitos humanos	79

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1.	Distribución de los grupos experimentales para embriotoxicidad y teratogénesis <i>in ovo</i> en embriones <i>G. gallus</i>	45
2.	Evaluación <i>in silico</i> de propiedades farmacocinéticas de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	51
3.	Evaluación <i>in silico</i> de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como inhibidores de subfamilias de CYP450	57
4.	Evaluación <i>in silico</i> de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> como sustrato de subfamilias de CYP450	62
5.	Evaluación <i>in silico</i> del perfil de química medicinal de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	65
6.	Evaluación <i>in silico</i> del perfil toxicológico de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	67
7.	Evaluación <i>in silico</i> de características toxicológicas de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	72
8.	Evaluación <i>in silico</i> de reglas de toxicóforo de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	75
9.	Evaluación <i>in silico</i> de vías de señalización asociadas a toxicidad de 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	76

10.	Tasa de embriotoxicidad <i>in ovo</i> para la concentración de 0.1 mg/mL de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	83
11.	Tasa de embriotoxicidad <i>in ovo</i> para la concentración de 1 mg/mL de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	84
12.	Tasa de embriotoxicidad <i>in ovo</i> para la concentración de 10 mg/mL de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	85
13.	Teratogénesis y criterios sistemáticos <i>in ovo</i> para la concentración de 0.1 mg/mL de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	86
14.	Teratogénesis y criterios sistemáticos <i>in ovo</i> para la concentración de 1 mg/mL de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	88
15.	Teratogénesis y criterios sistemáticos <i>in ovo</i> para la concentración de 10 mg/mL de los compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	89
16.	Integración de resultados de embriotoxicidad y teratogénesis <i>in ovo</i> de los 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i> .	90
17.	Integración de resultados predictivos y biológicos de embriotoxicidad y teratogénesis de los 4 compuestos bioactivos de <i>A. sativum</i>	109

I. RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.), es ampliamente utilizado por su valor terapéutico en la medicina tradicional, en donde se atribuyen sus propiedades a la diversidad de compuestos bioactivos organosulfurados que posee. A pesar de que las plantas se emplean en la medicina tradicional debido a su riqueza en compuestos bioactivos, en ocasiones estos pueden generar efectos secundarios graves, superando incluso los riesgos asociados con la enfermedad. Por ello, la ausencia de un perfil toxicológico robusto actual en los compuestos bioactivos de *A. sativum* subraya la necesidad de una investigación más profunda y específica para abordar cualquier potencial de riesgo antes de escalar a su aplicación clínica. En este contexto, los investigadores han explorado diversas estrategias para agilizar el proceso de evaluación toxicológica de compuestos bioactivos, por ejemplo, usando plataformas bioinformáticas para realizar predicciones farmacocinéticas y farmacodinámicas como el análisis ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) y la realización de evaluaciones toxicológicas *in vitro* e *in ovo*. En el presente proyecto se evaluó el perfil predictivo ADMET utilizando la plataforma bioinformática ADMETLab 3.0, además se realizaron evaluaciones biológicas de hemotoxicidad, embriotoxicidad y teratogenicidad de 4 compuestos tipo tioalilo bioactivos de *A. sativum*: alil mercaptano, dialil sulfuro, dialil disulfuro y alicina. Los resultados predictivos indicaron que el DADS presenta una mayor probabilidad de ser tóxico debido a sus propiedades farmacocinéticas, interacción con CYP450, características toxicológicas y vías de señalización. En eritrocitos humanos, el compuesto bioactivo con mayor efecto hemotóxico (>25%) corresponde al DADS a las concentraciones de 1, 10 y 100 mg/mL. En embriones *G. gallus*, la ALN presentó un mayor riesgo de ser embriotóxico (PT 0.01 y CL₅₀ 0.47 mg/Kg), mientras que DAS presentó un mayor riesgo de inducir teratogénesis (PT 2.51 y CE₅₀ 18.13 mg/Kg).

Palabras clave: *Allium sativum*, Compuestos tioalilo, Hemotoxicidad, Embriotoxicidad, Teratogenicidad, ADMET

II. ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is widely used for its therapeutic value in traditional medicine, where its properties are attributed to the diversity of bioactive organosulfur compounds it possesses. Despite plants being used in traditional medicine due to their richness in bioactive compounds, these can sometimes generate severe side effects, even surpassing the risks associated with the disease. Therefore, the absence of a robust current toxicological profile in *A. sativum* bioactive compounds highlights the need for deeper and more specific research to address any potential risk before scaling up to clinical application. In this context, researchers have explored various strategies to accelerate the toxicological evaluation process of bioactive compounds, such as using bioinformatics platforms to perform pharmacokinetic and pharmacodynamic predictions, such as ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) analysis, and conducting in vitro and in ovo toxicological evaluations. In this project, the predictive ADMET profile was evaluated using the ADMETLab 3.0 bioinformatics platform, and biological evaluations of hemotoxicity, embryotoxicity, and teratogenicity were conducted on 4 thioallyl bioactive compounds from *A. sativum*: allyl mercaptan, diallyl sulfide, diallyl disulfide, and allicin. The predictive results indicated that DADS has a higher probability of being toxic due to its pharmacokinetic properties, interaction with CYP450, toxicological characteristics, and signaling pathways. In human erythrocytes, the bioactive compound with the highest hemotoxic effect (>25%) corresponds to DADS at concentrations of 1, 10, and 100 mg/mL. In *G. gallus* embryos, ALN presented a higher risk of being embryotoxic (PT 0.01 and CL₅₀ 0.47 mg/Kg), while DAS presented a higher risk of inducing teratogenesis (PT 2.51 and CE₅₀ 18.13 mg/Kg) (**Keywords:** *Allium sativum*, *Thioallyl compounds*, *Hemotoxicity*, *Embryotoxicity*, *Teratogenicity*, *ADMET*).

III. INTRODUCCIÓN

La medicina tradicional, basada en gran parte en el uso de plantas medicinales, ha sido una fuente ancestral de compuestos bioactivos con propiedades terapéuticas relevantes (Wangchuk, 2018). Actualmente, del 85-90% de la población mundial recurre a esta práctica, demostrando su persistente relevancia en la atención de la salud, a pesar de los avances en la medicina moderna (Wangchuk, 2018). Las razones subyacentes a esta demanda generalizada pueden atribuirse a varios factores clave, entre ellos se encuentran: a) la relevancia cultural y social b) la percepción de su eficacia en la promoción de la salud y el manejo de enfermedades crónicas, c) la accesibilidad económica y geográfica de los productos naturales, d) la inaccesibilidad financiera de los medicamentos modernos, e) la falta de acceso a servicios de salud debido a la ubicación remota y la insuficiencia de infraestructura médica y f) el reciente impulso mediático en redes sociales hacia el uso de plantas medicinales como herramienta para promover un estilo de vida saludable y sostenible (Gómez-Álvarez, 2012; Wangchuk, 2018; Ghenai y Mejova, 2018; Alotiby, 2021).

Sin embargo, los reportes internacionales indican que el consumo de plantas medicinales causa entre el 1-2% de las intoxicaciones registradas en centros de salud, principalmente por uso inadecuado, afectando especialmente a poblaciones vulnerables como adultos mayores y niños menores de 6 años, quienes representan el 85% de las víctimas (Sánchez y col., 2019; Peacock y col., 2009). Además, estas intoxicaciones representan el 0.2% de las muertes por intoxicación aguda, y su diagnóstico se complica por la falta de registros detallados y escasez de datos toxicológicos sobre especies vegetales y compuestos bioactivos (Sánchez y col., 2019;

Peacock y col., 2009). En este contexto, el ajo (*A. sativum*) es una planta emblemática en la medicina tradicional Mexicana, ampliamente utilizada en remedios caseros por su rica composición química, que incluye compuestos bioactivos organosulfurados, particularmente tipo tioalilo, como alil mercaptano (AM), dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS) y alicina (ALN), que presentan propiedades terapéuticas incluyendo: acción antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria, cardioprotectiva, antihipertensiva, hipoglucemiante, antitrombótica, antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora (Tesfaye, 2021). La incorporación del ajo en remedios caseros, como infusiones, tinturas, pomadas, extractos y aceites esenciales, plantea una notable variabilidad en la cantidad de compuestos bioactivos presentes (Majewski, 2014; Bisen y Emerald, 2016). Aunque se reconoce su valor potencial, aún se requiere investigación adicional para comprender completamente los riesgos y efectos tóxicos potenciales asociados con el uso concentrado y aislado de estos compuestos bioactivos, garantizando así su seguridad y eficacia (Majewski, 2014).

Ante la creciente relevancia terapéutica de utilizar los compuestos bioactivos aislados, se realizó un estudio multidisciplinario enfocado en cuatro compuestos bioactivos puros de *A. sativum*: AM, DAS, DADS y ALN. Estos compuestos presentan en su estructura química el grupo tioalilo ($H_2C=CH-CH_2-S-$). El objetivo inicial de este trabajo consistió en evaluar los perfiles predictivos farmacocinéticos y toxicológicos de estos compuestos mediante análisis computacionales avanzados. Subsecuentemente, se llevó a cabo la evaluación de hemotoxicidad en eritrocitos humanos, seguida del desarrollo de un modelo biológico *in ovo* destinado a evaluar la embriotoxicidad y teratogénesis en embriones *Gallus gallus*.

IV. ANTECEDENTES

4.1. El ajo en la medicina tradicional

Originario de Asia central, el ajo pertenece a la familia *Alliaceae* subfamilia *Allioideae* y al género *Allium*, es una planta aromática de 70 a 80 cm de longitud, que se distingue por su tallo fragante segregado en 6 a 12 bulbos llamados dientes de ajo, los cuales están unidos por una cáscara fina para crear la cabeza del ajo (peso aproximado de 50g), sus raíces pueden crecer hasta una profundidad de 80 cm, mientras que sus hojas miden de 13 a 15 cm, son morfológicamente largas, estrechas y planas, con una punta cilíndrica y afilada, las flores son diminutas y de color púrpura blanquecino complementando la morfología de esta hortaliza (Figura 1) (Juárez-Segovia y col., 2019; El-Saadony y col., 2024).

Las propiedades medicinales del ajo han sido reconocidas desde la antigüedad, lo que ha llevado a su uso extendido en la medicina tradicional, con registros de su uso que se remontan a 3500 a.C. en la civilización Sumeria (civilización Mesopotámica), donde se empleaba para combatir enfermedades parasitarias y prevenir brotes epidémicos (Burba, 2003). Su influencia se extendió a regiones tan diversas como Arabia, Egipto, China y el Mediterráneo, respaldado por sus propiedades antihipertensivas, antimicrobianas, antioxidantes e hipolipemiantes (Burba, 2003; Juárez-Segovia y col., 2019; Ramírez-Concepción y col., 2016).

Este impacto se atribuye a la abundancia de sus compuestos bioactivos organosulfurados, presentes en hojas, tallos, flores y en mayor medida, en los bulbos, que en combinación con su versatilidad en preparaciones (aceites esenciales,

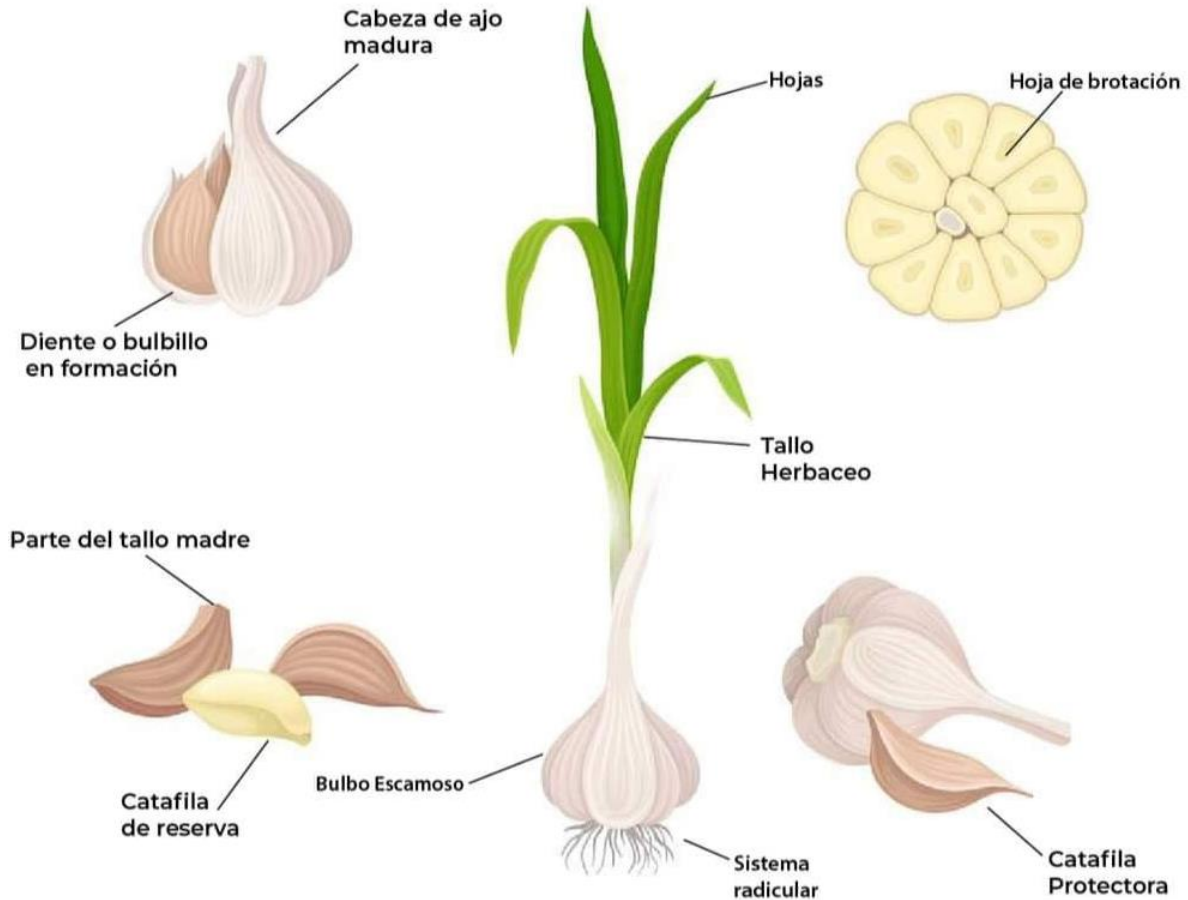


Figura 1. Morfología de *A. sativum*. Estructura morfológica que muestra sus componentes principales: hojas lineales, tallo herbáceo, sistema radicular fibroso y bulbo escamoso. El bulbo escamoso está compuesto por varios dientes o bulbillos, cada uno rodeado por una capa protectora llamada 'catáfila' o 'túnica protectora', que ayuda a preservar la humedad y proteger el diente de agresiones ambientales (Agrokrebs, 2023).

macerados, cataplasmas, extractos e infusiones) ha permitido una amplia gama de aplicaciones en la medicina tradicional (Amagase y col., 2001; Petropoulos y col., 2017; Okoro y col., 2023).

En la actualidad, se ha comprobado que ciertos compuestos bioactivos obtenidos de *A. sativum* destacan por sus propiedades biológicas, por ejemplo: AM, DAS y DADS los cuales presentan propiedades antiinflamatorias y anticancerígenas, induciendo la apoptosis de diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama, pulmón, tracto urinario y colon (Borlinghaus y col., 2014; Wang y col., 2016; Guillamon, 2018). Además, la ALN ha demostrado una potente actividad antimicrobiana contra virus, parásitos, bacterias y hongos, incluyendo: *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli* y *Candida albicans* (Borlinghaus y col., 2014; Wang y col., 2016; Guillamon, 2018) (Figura 2).

4.2. Distribución y producción de *A. sativum* a nivel mundial y en México

La distribución de *A. sativum*, abarca extensas áreas en todo el mundo, principalmente en zonas templadas, cálidas templadas y boreales del hemisferio norte, que presenten un suelo espeso arcilloso, humus y suficiente agua (El-Saadony y col., 2024). El período de crecimiento en el invierno de siembra es de 250 días y puede presentarse un retraso de 40 días (El-Saadony y col., 2024). Después de la cebolla (*Allium cepa* L.), el ajo destaca como la segunda hortaliza del género *Allium* con mayor importancia económica, con una producción anual a nivel mundial de 30,7 millones de toneladas (Artemisa y Lajas, 2022).

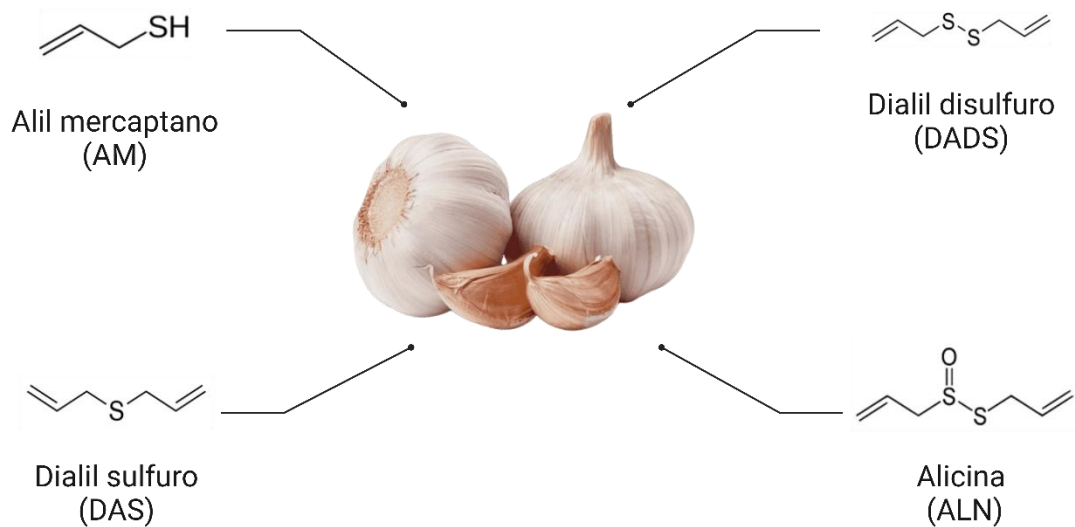


Figura 2. Compuestos bioactivos de *A. sativum*. Estructuras químicas de cuatro compuestos bioactivos de *A. sativum*: alil mercaptano (AM), dialil disulfuro (DADS), dialil sulfuro (DAS) y alicina (ALN), caracterizados por su estructura organosulfurada y presencia del grupo tioalilo (Block, 1992; Kamel y Saleh, 2000).

En México, la producción de ajo se lleva a cabo en 21 entidades, destacando como principales productores los estados de Zacatecas, Puebla, Baja California y Sonora, que contribuyen con el 87.1% de la producción nacional (SIAP, 2019). Este cultivo ha demostrado ser altamente rentable, evidenciado por el incremento del 4,3% en la producción nacional durante el año 2020, alcanzando un volumen total de 86,500 toneladas, consolidando al país como el noveno exportador mundial (SIAP, 2019).

4.3. Tipos de ajo

Las variedades de ajo exhiben diferencias en diversos aspectos, tales como la cantidad de compuestos bioactivos, el color, la forma de las hojas, el número de dientes, así como en su sabor y aroma (Kamenetsky y col., 2007). Además, es posible agrupar y distinguir ecotipos y variedades en función de características morfológicas, como la coloración de la túnica de protección, así como características fisiológicas, incluyendo la duración del fotoperiodo, la precocidad y la emisión el escapo floral (condicionadas por la climatología específica de la zona de cultivo) (Kamenetsky y col., 2007; Hirata y col., 2016). Las dos variedades más comunes en México son: el ajo blanco (túnica de protección blanca, dientes grandes, sabor suave y delicado, aroma moderado y cultivado principalmente al norte de México) y el morado (túnica de protección morada o rosada, dientes más pequeños y picantes, sabor intenso, aroma fuerte y es cultivado principalmente al sur de México) (GOB, 2021).

En Ecuador, el ajo macho es la variedad más cultivada y consumida en la medicina tradicional, destacándose por su alto contenido de compuestos organosulfurados, especialmente la alicina, y caracterizándose por presentar un solo

diente de gran tamaño, con un sabor intenso y picante, un peso promedio de 25-30 gramos y un aroma penetrante y persistente (Nuñez, 2011).

En países como Uruguay, Argentina, Estados Unidos, Chile, Rusia, Egipto, Grecia e India, el ajo elefante es la variedad más comercializada, destacándose por su sabor suave y características físicas notables: bulbos pesados de hasta 500 g, recubiertos de membranas protectoras espesas y compuestos por no más de 6 dientes de gran tamaño (Lanzavechia, 2009).

En Italia, específicamente en localidades como Sulmona, Castelliri, Nubia y Proceno, se cultiva la variedad de ajo rojo conocida como “ajo rojo italiano” o “Aaglio Rosso”, destacada por sus características: sabor intenso y ligeramente dulce, bulbos de tamaño mediano a grande, membrabas rojizas brillantes y dientes de color crema (Biancolillo y col., 2020; Lasalvia y col., 2022).

4.4. Composición general del ajo

A. sativum, está mayormente constituido por agua, representando un 56-68% en peso, seguido por los carbohidratos como la fructosa que conforman un 26-30% del peso total (Lawson, 1998). El ajo presenta en 100g de peso fresco una composición que abarca diversos nutrientes esenciales (Maza y col., 2017). En detalle, se destaca la presencia de 1.20 mg de hierro, 4,30 g de proteínas, 17.8 mg de calcio, 1.20 g de fibra, 446 mg de potasio, 4.70 mg de yodo, 1.10 mg de zinc, 24.10 mg magnesio, 19 mg de sodio, así como trazas de vitamina A (0.16 mg), vitamina B1 (0.02 mg), vitamina B2 (1.02 mg), vitamina B5 (0.32 mg), vitamina B6 (4.8 mg), vitamina B9 (14 mg), vitamina C (0.01 mg), vitamina E (0.32 mg) y vitamina K (134 mg) (Maza y col., 2017). Así mismo, contiene cantidades moderadas de selenio y germanio; sin embargo, las

proporciones de estos minerales estarán influenciadas por las características del suelo en el que se desarrollan los bulbos (Bender-Bojalil y Bárcenas-Pozos, 2013).

4.5. Composición química del ajo

A. sativum, destaca por la compleja variedad de compuestos azufrados hidrosolubles, que representan del 0.1 al 0.2% del peso total, dentro de los cuales están presentes los derivados de cisteína, como la S-Alil-cisteína, S-alil-mercaptanocisteína, S-metilcisteína y gamma-glutamyl-cisteína (Maza y col., 2017). Además, se identifican compuestos inodoros, solubles en aceites, como el DADS, DAS, dialil trisulfuro, aliína y ajoeno (Maza y col., 2017).

En el caso de un bulbo de ajo que se conserve intacto y fresco, la aliína (sulfóxido de S-alil-cisteína) se identifica como el compuesto mayoritario (Maza y col., 2017). Adicionalmente, se hallan otros compuestos azufrados que son solubles en medio acuoso, tales como: S-metil-L-cisteína, S-propenil-S-cisteína, S-glutación y AM (Maza y col., 2017).

Por otro lado, la ruptura de las células del ajo crudo, frecuentemente ocasionada por acciones mecánicas como el corte, desencadena la formación del compuesto oxidante ALN, el cual es responsable del distintivo aroma pungente del ajo (Maza y col., 2017). No obstante, para que se desencadene la reacción, es esencial que la aliína, un componente inodoro y farmacológicamente inactivo conocido como el “componente madre”, experimente una transformación mediante la acción de una enzima del ajo (allinasa), convirtiéndose primero en ALN al entrar en contacto con el

aire y cuando el pH es >3 , se convierte en un precursor de varios compuestos sulfurados (DAS, DADS y AM) (Maza y col., 2017).

La composición química y el perfil de componentes bioactivos de *A. sativum* en preparados utilizados en la medicina tradicional están condicionados por una variedad de factores, que van más allá del método de preparación (El-Saadony y col., 2024). Entre estos factores se encuentran: el genotipo específico de la planta, condiciones climáticas (temperatura, humedad y luz), riego, fertilización y almacenamiento, la variación en estos factores puede modificar la composición química, afectando la eficacia y bioseguridad de los preparados (El-Saadony y col., 2024).

4.6. Efectos secundarios, contraindicaciones y toxicidad del ajo

En la actualidad, muchas personas sostienen de manera equivocada la creencia de que el empleo de plantas para el tratamiento de enfermedades o dolencias es más seguro que la ingesta de medicamentos convencionales (Trumble, 2002; Borrelli y col., 2007). Esta percepción puede ser un factor importante que contribuye a la creciente y sostenida popularidad de *A. sativum* en la medicina tradicional (Trumble, 2002; Borrelli y col., 2007). Es fundamental comprender que la condición de que un producto sea natural no garantiza la seguridad, ya que su consumo debe realizarse de manera adecuada (Gastón y col., 2020). Esto se debe a que algunas plantas pueden interactuar con otros fármacos, resultar tóxicas a dosis elevadas e incluso provocar efectos adversos que incluyen todos los niveles de gravedad en órganos (Gastón y col., 2020).

El uso moderado de *A. sativum* en la cocina y en la medicina tradicional es considerado seguro (1 a 2 bulbillos frescos por persona, 4 gramos); sin embargo, el uso regular y excesivo puede generar efectos adversos, entre los que se destaca: el mal aliento, fuerte olor corporal, irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos, acidez estomacal, diarreas, flatulencias, hemorragias, quemaduras por contacto, dolor de cabeza y síntomas propios de alergia (irritación e hinchazón de la piel) (Borrelli y col., 2007; El-Saadony y col., 2024). La presencia y severidad de estos síntomas dependerá de la cantidad ingerida, periodo de ingesta, método de consumo y condiciones individuales de salud (Borrelli y col., 2007).

Es recomendable que el consumo de *A. sativum* se realice con precaución, particularmente en cuadros de gastritis o úlceras (Borrelli y col., 2007). Además, es importante enfatizar que esta planta puede afectar la función hepática, aumentando la toxicidad en el hígado (Borrelli y col., 2007). Su acción anticoagulante también debe considerarse, ya que podría incrementar el riesgo de hemorragias en personas con trastornos de coagulación sanguínea (Majewski, 2014). En individuos con presión arterial baja, el consumo de *A. sativum* podría agravar aún más la hipotensión arterial (Borrelli y col., 2007). Así mismo, en casos de enfermedad de péndigo, se debe evitar el consumo de *A. sativum*, ya que puede empeorar los síntomas, generando ampollas y llagas en la piel y en mucosas (Borrelli y col., 2007). Por último, si se está bajo tratamiento médico, es relevante destacar que *A. sativum* puede interactuar con diversos medicamentos como: acetaminofén, píldoras anticonceptivas, ciclosporina, teofilina, warfarina y antiinflamatorios no esteroideos (aspirina, naproxeno e ibuprofeno) (Borrelli y col., 2007).

Aunque se han identificado posibles efectos secundarios, contraindicaciones y toxicidad asociados con el consumo de preparados de *A. sativum*, todavía existe una brecha en el conocimiento científico respecto a cómo cada compuesto bioactivo actúa de manera independiente en el organismo humano (Borrelli y col., 2007; El-Saadony y col., 2024). Esta falta de comprensión limita como optimizar la eficacia y seguridad de estos productos (Borrelli y col., 2007; El-Saadony y col., 2024). Así, se requiere profundizar la evaluación toxicológica que permita desarrollar un perfil de bioseguridad de los compuestos bioactivos presentes en *A. sativum* (Venkatesan y Ramanathan, 2017).

4.7. Estudios de toxicidad

La evaluación toxicológica es crucial para determinar la seguridad de un compuesto bioactivo, especialmente antes de su uso en aplicaciones terapéuticas, a fin de optimizar la relación riesgo-beneficio en humanos (Venkatesan y Ramanathan, 2017). Existen diversos tipos de evaluaciones toxicológicas con enfoques diferentes (Figura 3), como la toxicidad aguda intrínseca del compuesto y la toxicidad que afecta sistemas y órganos, incluyendo carcinogénesis, genotoxicidad y teratogénesis (Ouedraogo y col., 2012).

En estudios toxicológicos *in vivo*, el modelo animal es crucial para evaluar la seguridad de compuestos bioactivos, siguiendo principios bioéticos estrictos y la guía de Buenas Prácticas de Laboratorio no clínico (BPL), y adaptando el diseño experimental a las características específicas del compuesto (Gámez y Más, 2007).



Figura 3. Estudios de toxicidad. La evaluación del perfil toxicológico de un compuesto bioactivo implica determinar su potencial de riesgo y estimar el riesgo para la salud humana. Para ello, es fundamental considerar dos factores clave: la dosis y la duración de exposición. Los estudios de toxicidad se clasifican en diferentes categorías, como se muestra en el diagrama adjunto y que incluyen: evaluación de dosis única, evaluación de dosis repetida, evaluación del estudio subagudo, sub crónico y crónico. Estos estudios permiten determinar la dosis letal 50% (DL_{50}) y la concentración letal 50% (CL_{50}), parámetros esenciales para establecer límites de seguridad y evaluar el riesgo potencial para la salud humana (Heimann y Doughty, 2014).

4.7.1. Evaluación de dosis única

La prueba de toxicidad aguda evalúa la seguridad de un compuesto mediante la administración de dosis elevadas a un modelo animal (generalmente ratas) en una sola dosis o durante 24 horas (Sass, 2000; Gámez y Más, 2007; Bhardwaj y Gupta, 2012). Este estudio determina la dosis mínima segura y letal, proporcionando información sobre la toxicidad intrínseca, el riesgo asociado a la exposición aguda y la curva dosis-efecto (Sass, 2000; Bhardwaj y Gupta, 2012).

4.7.2. Evaluación de dosis repetidas

El ensayo requiere definir la duración mínima del tratamiento según su uso en humanos, variando de meses a años, siendo dos años suficiente para estudios crónicos y de carcinogenicidad en modelos murinos (Ballantyne, 2009). Este tipo de evaluación proporciona información fundamental sobre la respuesta del organismo ante el compuesto, efectos adversos no observables y permite examinar órganos, tejidos y fluidos del modelo animal para detectar efectos tóxicos (Silbergeld y Watanabe, 1998; Ballantyne, 2009).

La toxicidad se clasifica en aguda o crónica según el efecto de la exposición al compuesto bioactivo, los *efectos agudos* se manifiestan rápidamente después de una o pocas exposiciones, mientras que los *efectos crónicos* ocurren tras exposiciones repetidas y se dividen en efectos cancerígenos y no cancerígenos (Denny y Stewart, 2017).

4.7.3. Evaluación del estudio subagudo

El estudio subagudo de 2-4 semanas identifica alteraciones clínicas, variaciones en peso corporal y consumo de alimentos, y evalúa patología clínica, hematología, histopatología y toxicidad en órganos diana, además de analizar el periodo de recuperación para detectar daños adversos reversibles (Denny y Stewart., 2017).

4.7.4. Evaluación del estudio subcrónico

El estudio subcrónico tiene una duración de 13 semanas y proporciona información sobre la toxicología y toxicocinética de la molécula en el modelo animal mediante periodos de dosis prolongados (Denny y Stewart, 2017). Los datos obtenidos se utilizan posteriormente para establecer los niveles de dosis en los estudios crónicos y respaldar la aplicación de dosis en humanos durante la etapa clínica (Denny y Stewart, 2017). En este tipo de estudio, se utilizan 20-25 animales pequeños por sexo y grupo, con animales adicionales para evaluar reversibilidad de efectos adversos (Denny y Stewart., 2017).

4.7.5. Evaluación del estudio crónico

Los estudios crónicos (6-12 meses) evalúan parámetros toxicológicos en 20-25 animales, analizando efectos a largo plazo, además es apropiada para analizar un compuesto potencialmente capaz de tratar una enfermedad crónica o mortal, así como examinar su efecto en una diana molecular de la cual se dispongan de datos limitados en humanos (Denny y Stewart, 2017).

4.8. Estudios alternativos de toxicidad

Los avances científicos y éticos han impulsado el desarrollo de estudios alternativos en la evaluación toxicológica (Figura 4), cuyo objetivo principal es minimizar el uso de animales en ensayos, mitigando su estrés y sufrimiento, al mismo tiempo que optimizan la eficiencia, reducen los tiempos de experimentación y los costos asociados (Worth y col., 2014). Estos métodos incluyen pruebas *in vitro*, predicciones *in silico* y métodos animales no estándar (Worth y col., 2014).

4.8.1. Evaluación de hemotoxicidad

Los eritrocitos, células mayoritarias en la circulación sanguínea, transportan oxígeno gracias a su estructura única, caracterizada por una membrana compuesta por un 19.5% de agua, 39.5% de proteínas, 35.1% de lípidos y 5.8% de carbohidratos, que actúa como componente estructural clave debido a la ausencia de núcleo y orgánulos (Pagano y Faggio, 2015). Esta membrana es una bicapa lipídica, estabilizada por enlaces hidrofóbicos y covalentes, cuenta con un esqueleto multiproteico formado por proteínas como espectrina α y β , anquirina y actina (Pagano y Faggio, 2015). La flexibilidad y elasticidad de los eritrocitos, resultado de la interacción entre su estructura membranosa y el citoesqueleto, permiten fluctuaciones nanométricas y deformabilidad reversible (sin fragmentación celular) que facilitan su paso a través de la microcirculación capilar (Pagano y Faggio, 2015).

La hemoglobina, proteína fundamental de los eritrocitos, facilita el transporte de oxígeno y dióxido de carbono entre tejidos, mientras que su membrana, cuya estructura y función reflejan el estado fisiológico de la célula y posibles alteraciones,

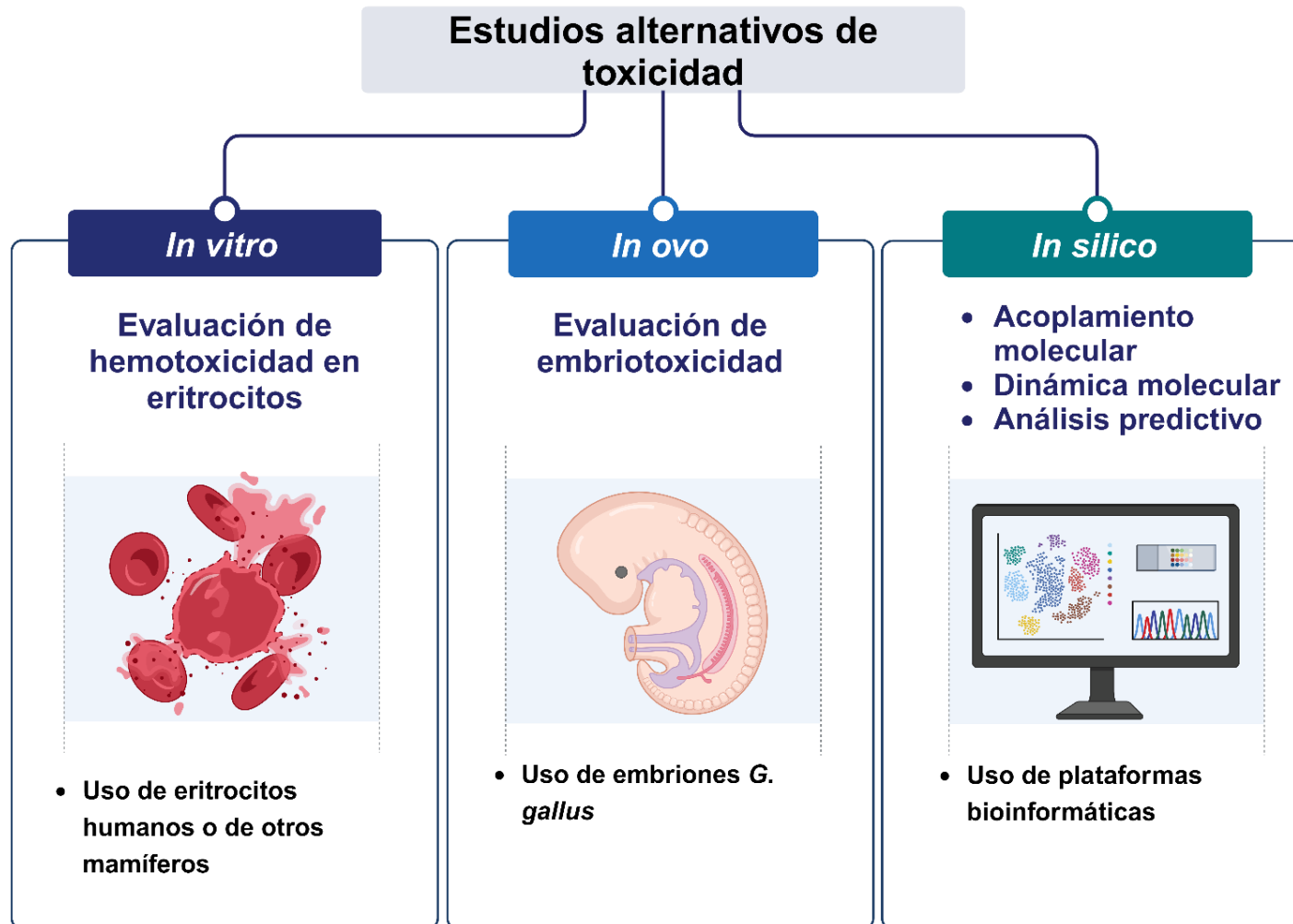


Figura 4. Estudios alternativos de toxicidad: evaluación *in vitro*, *in ovo* e *in silico*. Aquí se incluyen métodos innovadores para evaluar la toxicidad de compuestos bioactivos minimizan el uso de animales. Estos incluyen evaluación

in vitro con eritrocitos humanos/mamíferos para analizar hemotoxicidad y efectos a diferentes concentraciones; evaluación *in ovo* con embriones de *G. gallus* para estudiar embriotoxicidad y efectos tóxicos durante el desarrollo; y evaluación *in silico* mediante plataformas bioinformáticas para análisis molecular, dinámica molecular y predicción de propiedades farmacocinéticas y ADMET, sirviendo como herramientas de cribado para identificar posibles toxicidades (Atanasov., 2015; Pagano y Faggio, 2015; Jessl y col., 2018).

mantiene su forma discoide mediante la interacción entre el citoesqueleto y la viscosidad citoplasmática regulada por la concentración intracelular de hemoglobina (Pagano y Faggio, 2015).

La resistencia de las membranas de los eritrocitos se ha propuesto como método de evaluación de toxicidad en diversos estudios, particularmente la inducción de hemólisis, basándose en la medición del eflujo de hemoglobina de eritrocitos suspendidos en solución (Pagano y Faggio, 2015; Sæbø y col., 2023). Este ensayo implica disminuir gradualmente la concentración de la solución y medir la fracción de células que sufre lisis osmótica, liberando hemoglobina contenida en los eritrocitos (cuantificable con espectrofotómetro a 540 nm) (Pagano y Faggio, 2015). La concentración de esta proteína en el sobrenadante es directamente proporcional al número de células lisadas, lo que hace esencial el análisis de la concentración-respuesta o concentración-efecto en este tipo de estudios (Pagano y Faggio, 2015).

El análisis de hemotoxicidad *in vitro* mediante espectrofotometría es una herramienta efectiva para evaluar el efecto de compuestos bioactivos en eritrocitos humanos, ofreciendo un método de cribado de toxicidad rápido, reproducible y económico (Pagano y Faggio, 2015; Sæbø y col., 2023). Sus ventajas incluyen la evaluación simultánea de múltiples compuestos, reduciendo significativamente la necesidad de pruebas en animales y contribuyendo al logro de las "3R" (reducir, refinar y reemplazar) en la investigación, impulsando la innovación ética y responsable (Pagano y Faggio, 2015).

4.8.2. Evaluación de embriotoxicidad

El objetivo principal de la evaluación embriotóxica consiste en la identificación de posibles efectos adversos o tóxicos que puedan surgir a raíz de la exposición de embriones a un compuesto específico (Ghimire y col., 2022). Durante estos estudios, se administran distintas dosis del compuesto bioactivo a hembras preñadas en momentos específicos del desarrollo embrionario (Ghimire y col., 2022). Asimismo, se llevan a cabo observaciones minuciosas con el fin de detectar posibles alteraciones morfológicas, desarrollo anormal de órganos o tejidos, así como cualquier indicio o efecto negativo en los embriones (Ghimire y col., 2022).

En la evaluación embriotóxica, se emplean animales de laboratorio como ratones, ratas y conejos pese a las limitaciones reconocidas en dicho enfoque, como la rápida absorción de sustancias químicas, las notables variaciones entre especies y los elevados costos asociados al uso de un gran número de animales (Ghimire y col., 2022). No obstante, la Guía de la Sociedad de Toxicología (SOT, Society of Toxicology) se enfoca en minimizar la incomodidad y la angustia experimentadas por los animales de laboratorio, buscando alternativas que reduzcan la cantidad de animales utilizados, sustituyendo a estos por modelos *in vitro* e *in ovo* y cumpliendo con las políticas de bienestar animal (Ghimire y col., 2022).

En este contexto, el embrión de *G. gallus* se ha utilizado ampliamente como un modelo alternativo adecuado para el estudio del desarrollo embrionario y la evaluación de posibles efectos teratogénicos de compuestos bioactivos, demostrando ser una alternativa válida a los bioensayos en mamíferos (Jesl y col., 2018). Los huevos *G.*

gallus ofrecen ventajas significativas en los ensayos de medicamentos potenciales, ya que están disponibles durante todo el año y permiten la inyección directa de sustancias en la yema, lo que facilita dosificaciones específicas y estandarizadas (Jesl y col., 2018).

Además, el huevo *G. gallus* se caracteriza por ser un sistema cerrado que carece del intercambio con su entorno, a excepción del intercambio de gases, por lo tanto, al realizar la inyección de un compuesto de prueba, se obtiene una exposición química crónica, dado que no hay posibilidad de intercambio ni pérdida de la sustancia, como resultado, una sola inyección puede tener suficiente influencia en el desarrollo embrionario (Jesl y col., 2018).

Durante el periodo de incubación aviar de 21 días, se establecen patrones morfológicos y funcionales básicos del organismo, abarcando aspectos físicos, inmunológicos, fisiológicos y locomotores, conforme a las etapas descritas por Hamburger y Hamilton (1951), lo que determina la calidad del producto de gestación.

La exposición a compuestos bioactivos en el modelo *in ovo* puede inducir una amplia gama de efectos toxicológicos, incluyendo alteraciones embrionarias como dismorfologías, retrasos en el crecimiento y en el desarrollo del sistema nervioso central, problemas motores y cognitivos, anomalías craneales, deformidades en el pico y tarsos, lesiones esqueléticas y viscerales, malformaciones oculares y gastrointestinales, como hernias umbilicales o gastrosquisis, así como inflamación y necrosis en diversas estructuras, lo que sugiere un impacto significativo en el desarrollo embrionario (Igarashi y col., 1981; Bellairs y Osmond, 2014; Kiecker, 2016).

4.8.3. Evaluación *in silico*

La incorporación de la medicina tradicional en la atención de la salud pública puede mejorar la accesibilidad, la asequibilidad y la aceptabilidad cultural de los servicios de atención médica (Unnikrishnan, 2010). Sin embargo, es crucial garantizar la seguridad y eficacia de los compuestos bioactivos presentes en los productos herbales (Atanasov y col., 2015). Para acelerar el proceso de evaluación toxicológica, los modelos predictivos *in silico* emergen como una alternativa prometedora (Atanasov y col., 2015). Los enfoques computacionales y de inteligencia artificial permiten realizar simulaciones que proporcionan evaluaciones detalladas de las propiedades farmacocinéticas y químicas de los compuestos bioactivos (Atanasov., 2015; Zulkifli y col., 2023).

La aplicación de plataformas bioinformáticas en toxicología permite evaluar la seguridad potencial de compuestos bioactivos aislados garantizando su calidad y seguridad antes de llevar a cabo ensayos clínicos en humanos, ajustándose a las normativas establecidas por las principales agencias regulatorias de medicamentos y sustancias químicas en cada país (Alfonso y col., 2009; Gozalbes y col., 2014; Speranza y Tamosiunas., 2016). Así, por ejemplo, en Estados Unidos está la FDA (Food and Drug Administration), en Japón se encuentra la MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare) y en la Unión Europea existe la REACH (The Regulation on the Registration, Evaluation, Authorisation and restriction of CHemicals) (Alfonso y col., 2009; Gozalbes y col., 2014; Speranza y Tamosiunas., 2016).

Las evaluaciones *in silico*, permiten el estudio masivo y riguroso de los procesos de ADMET (Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad), generando predicciones confiables sobre posibles eventos moleculares tóxicos (Vedani y Smieško, 2009; Cheng y col., 2013). Esto permite un cribado eficiente y selectivo de compuestos bioactivos, identificando aquellos con perfil de seguridad y eficacia óptimos para su posterior evaluación experimental en modelos celulares y animales (Vedani y Smieško, 2009; Cheng y col., 2013). La implementación de estas estrategias optimiza el proceso de evaluación toxicológica preclínica de compuestos bioactivos, logrando la reducción sustancial en el tiempo y los costos de investigación (Vedani y Smieško, 2009; Cheng y col., 2013).

4.8.3.1 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular (*molecular docking*) en el diseño de fármacos involucra la interacción de moléculas para predecir conformaciones estables y considerar propiedades de unión (Dar y Mir, 2017). Se utiliza para evaluar y buscar candidatos a fármacos potentes y selectivos, especialmente en la activación o inhibición de proteínas asociadas a enfermedades (Dar y Mir, 2017). Se compone de dos elementos esenciales: la predicción de la conformación, posición y orientación del ligando en el sitio de unión del receptor, y la evaluación de la afinidad de unión expresada en energía de unión (EU) en unidades de la energía libre de Gibbs (kcal/mol) (Prieto-Martínez y col., 2019). Bajo este contexto, se ha establecido un umbral aceptable de al menos -6 kcal/mol para seleccionar ligandos con mayor potencial terapéutico en moléculas de bajo peso molecular (Dar y Mir., 2017).

4.8.3.2 Dinámica molecular

La dinámica molecular, una herramienta fundamental en el análisis de biomoléculas, utiliza simulaciones para explorar procesos dinámicos complejos en sistemas biológicos, como estabilidad proteica, cambios conformacionales y reconocimiento molecular (Aguirre, 2009). Su relevancia se encuentra en el desarrollo de fármacos y la determinación estructural que está apoyada por técnicas de espectroscopía de Rayos X y RMN (Resonancia Magnética Nuclear) (Aguirre, 2009).

De forma general, en los análisis de dinámica molecular se modela el movimiento vibratorio de las biomoléculas aisladas o durante su interacción con ligandos u otras moléculas complejas (Aguirre, 2009). Se sustenta en la aplicación de la segunda ley del movimiento de Newton, $F=ma$, donde “F” representa la fuerza que actúa sobre la partícula, “m” es su masa y “a” corresponde a su aceleración, para calcular la aceleración de las partículas a partir de las fuerzas ejercidas sobre ellas, permitiendo obtener una trayectoria que describe las propiedades del sistema a lo largo del tiempo (Aguirre, 2009).

4.8.3.3 Análisis predictivos farmacocinéticos y ADMET

Las características farmacocinéticas desempeñan un papel crucial en la evaluación toxicológica de un compuesto bioactivo (Fernández y col., 2022). Esto incluye aspectos como la localización de su biotransformación, la velocidad y duración de su metabolismo, así como el número de vías metabólicas activas (Fernández y col., 2022). En este contexto, el uso creciente de herramientas computacionales de análisis predictivo ADMET, tales como ADMETLab 3.0, PASS ONLINE, SwissADME, ProTox-

II, pkCSM, FAF-Drugs y admetSAR, ha adquirido gran popularidad en la evaluación de compuestos bioactivos (Dong y col., 2018; Abdul-Hammed y col., 2022). Estas herramientas ofrecen la capacidad de identificar y descartar compuestos bioactivos con subestructuras problemáticas y potencialmente tóxicas, así como brindar una retroalimentación oportuna basada en información ADMET para la optimización de compuestos bioactivos (Lagorce y col., 2008; Kumar y col., 2018).

Por ejemplo, uno de los determinantes influyentes en la variabilidad de la farmacocinética es la actividad catalítica de las enzimas metabolizadoras del sistema citocromo P450 (CYP450) (Crivori y Poggesi, 2006). La inhibición o inducción de estas enzimas puede dar lugar a interacciones farmacológicas clínicamente importantes (disminución de la concentración plasmática, reducción de los efectos terapéuticos, bioacumulación y toxicidad) (Crivori y Poggesi, 2006). Por lo tanto, la estabilidad metabólica del compuesto es un requisito previo importante a fin de mantener concentraciones terapéuticamente relevantes (Crivori y Poggesi, 2006).

En la actualidad, el aumento en el conocimiento de la estructura, actividad y regulación de CYP450, así como la generación continua de nuevos datos, ha impulsado la optimización de las plataformas bioinformáticas para predecir los puntos finales metabólicos de compuestos novedosos, utilizando enfoques basados en mecánica cuántica (QM), relaciones cuantitativas de estructura-actividad/propiedad (QSAR o QSPR), QSAR tridimensional (3D-QSAR) y generación de farmacóforos (Crivori y Poggesi., 2006).

En este contexto, la evaluación *in silico* es el punto de partida para una evaluación integral de la toxicidad de compuestos bioactivos, ya que permite predecir su interacción con moléculas biológicas, así como posibles efectos tóxicos asociados a su estructura química y propiedades fisicoquímicas (Atanasov., 2015; Zulkifli y col., 2023). Al combinar esta estrategia con evaluaciones *in vitro* y modelos animales alternativos, se logra una evaluación detallada y efectiva de la toxicidad, identificando compuestos bioactivos potencialmente peligrosos para la salud y definiendo un perfil de bioseguridad confiable para los productos herbales (Piersma y col., 2013; Roberts y col., 2019).

V. JUSTIFICACIÓN

La medicina tradicional ha utilizado durante siglos el *A. sativum*, comúnmente conocido como ajo, para tratar diversas afecciones. Esta práctica es reflejo de la gran dependencia global en plantas medicinales, que es utilizada entre el 85 al 90% de la población mundial. Sin embargo, los reportes revelan que el consumo de plantas medicinales puede tener consecuencias adversas, causando entre el 1-2% de las intoxicaciones registradas en los centros de salud. Estas intoxicaciones se deben principalmente a un uso inadecuado, como ingesta oral excesiva o aplicación incorrecta de remedios caseros, afectando especialmente a poblaciones vulnerables, como adultos mayores y niños menores de 6 años, quienes representan el 85% de las víctimas. A pesar de la importancia terapéutica de *A. sativum*, la falta de homogeneidad en la preparación de remedios herbales plantea preocupaciones sobre su seguridad y eficacia. Los compuestos bioactivos presentes en *A. sativum*, como AM, DAS, DADS y ALN, han demostrado tener actividades biológicas de relevancia nutracéutica y beneficiosa para la salud. Sin embargo, la toxicidad y bioseguridad de estos compuestos bioactivos aislados aún no han sido completamente evaluadas. La falta de información sobre su potencial impacto en la salud humana justifica la necesidad de investigar su toxicidad. En este contexto, la presente investigación tiene como objetivo determinar la toxicidad de estos 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*, mediante evaluaciones *in silico*, *in vitro* e *in ovo*.

VI. HIPÓTESIS

Los compuestos bioactivos de *A. sativum* AM, DAS, DADS y ALN presentarán un perfil predictivo de bioseguridad aceptable, con un rango de 0-29%, sugiriendo la ausencia de efectos tóxicos, así como porcentajes seguros de hemotoxicidad (0-25%) en células eritrocitarias humanas, así como de embriotoxicidad y teratogenicidad en embriones *G. gallus* (0 al 10%).

VII.OBJETIVOS

7.1. **Objetivo general**

Evaluar los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*: alil mercaptano, dialil sulfuro, dialil disulfuro y alicina, mediante el análisis predictivo farmacocinético y toxicológico utilizando plataformas bioinformáticas, evaluación hemotóxica *in vitro* en células eritrocitarias humanas y evaluación *in ovo* embriotóxica-teratogénica en embriones *G. gallus*.

7.2. **Objetivos específicos**

7.2.1. Realizar un análisis predictivo consenso del perfil ADMET de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*: AM, DAS, DADS y ALN.

7.2.2. Determinar el efecto hemotóxico en eritrocitos humanos de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*: AM, DAS, DADS y ALN.

7.2.3. Determinar el efecto embriotóxico sobre el desarrollo de embriones *G. gallus* de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*: AM, DAS, DADS y ALN.

7.2.4. Determinar el efecto teratogénico sobre el desarrollo de embriones *G. gallus* de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*: AM, DAS, DADS y ALN.

VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Lugar de trabajo

Este proyecto se realizó en el “Laboratorio de Neurofarmacología y Dolor” del Centro de Investigación y Docencia en Ciencias de la Salud (CIDOCS) de la Universidad Autónoma de Sinaloa, con domicilio en Eustaquio Buelna 91, Gabriel Leyva 80030, Culiacán Rosales, Sinaloa y en el “Laboratorio de Investigación en Farmacia, Farmacobiología y Toxicobiología” de la Facultad de Ciencias Químico-Biológicas de la Universidad Autónoma de Sinaloa con domicilio en Calzada de las Américas Norte 2771, Burócrata 80030, Ciudad Universitaria, Culiacán Rosales, Sinaloa.

8.2. Materiales

Para la realización del presente proyecto fue necesario contar con recursos informáticos como: acceso a internet, una computadora personal (Intel Core i7-7700HQ CPU 2.81 Ghz, 32 GB RAM, NVIDIA GeForce GTX 1070, 256 GB SSD/1 TB HDD); también se requirió material de uso clínico en extracción de muestras sanguíneas como: Vacutainer^{MR}, portavacutainer, guantes quirúrgicos, cubrebocas, torniquete para extracción de sangre, torundas con alcohol, tubos para microcentrifuga de 1.5 mL, tubo de polipropileno transparente de 4 mL con EDTA, micropipeta de 100 y 1000 μ L (WESTTUNE), microplaca de 96 pozos (PROLAB), lector de microplacas (modelo EliRead, KontroLab), centrífuga clínica (modelo TC-Spinplus, TopScience), microcentrifuga (modelo GUSTO, Heathrow Scientific), cronómetro, incubadora de convección natural (modelo IC403CR IC, Yamato Scientific), agua tridestilada, Cloruro

de Sodio (Productos Químicos Monterrey), potenciómetro (modelo HQ11D, HACH) e incubadora marca Huacuja, modelo 90H, desinfectante Virkon S.

Los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*: AM, DAS, DADS y ALN, así como el control estructural no sulfuroso (dialil éter, DAE), fueron proporcionados por el Dr. Raúl Argüello García, adscrito en el laboratorio 5 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Los compuestos AM, DAE, DAS y DADS fueron obtenidos comercialmente (Sigma-Aldrich^{MR}) mientras que la ALN fue obtenida por síntesis química mediante la oxidación del DADS empleado como precursor (Argüello-García y col., 2010).

8.3. Diseño experimental

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente proyecto, el trabajo fue dividido en tres etapas. En la primera etapa (Figura 5), se evaluó a los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*: AM, DAS, DADS y ALN, así como a su control estructural no sulfuroso: DAE, mediante las plataformas bioinformáticas ADMETLab 3.0, SwissADME y PASS ONLINE, para conocer su perfil farmacocinético, farmacodinámico y toxicológico. Posteriormente en la segunda etapa (Figura 6), se realizaron evaluaciones de hemotoxicidad sobre eritrocitos humanos de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* y el control estructural no sulfuroso, con el propósito de determinar si presentan efectos hemotóxicos a las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 10 y 100 mg/mL. Por último, en la tercera etapa (Figura 7), se llevó a cabo la evaluación de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* y su control estructural no sulfuroso, mediante la metodología de embriotoxicidad y teratogenicidad en embriones *G. gallus*, con el objetivo de determinar si estos compuestos presentan

posibles efectos toxicológicos a las concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL, para ello se realizaron observaciones detalladas para evaluar el crecimiento embrionario, la formación de estructuras clave y viabilidad, además se analizaron los posibles efectos adversos, como malformaciones o anomalías anatómico-estructurales.

8.4 Análisis predictivo ADMET mediante plataformas bioinformáticas

Los datos que se obtuvieron durante el análisis *in silico*, fueron reportados mediante tablas que incluyen los diferentes parámetros, su valor y su correspondiente probabilidad de predicción, en determinados casos una clasificación de colores (etiqueta semáforo), donde: ● verde representa una probabilidad baja (0-29%), ● amarillo moderado (30-69%) y ● rojo alto (70-100%) (Tian y col., 2022; Quintanar y col., 2024).

8.4.1 Plataforma ADMETLab 3.0

La determinación de los parámetros farmacocinéticos, química medicinal, vías de señalización y perfil toxicológico de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* se realizó utilizando la plataforma ADMETLab 3.0 (acceso: septiembre, 2024; <https://admetlab3.scbdd.com/server/evaluation>) (Fu y col., 2024). Los modelos de evaluación ADMET (absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) *in silico* se emplearon como una herramienta adicional para asistir en la determinación del perfil de bioseguridad de compuestos bioactivos (Fu y col., 2024). En ADMETLab 3.0, se realizó la evaluación a nivel de molécula aislada, lo que permitió calcular 119 criterios relacionados con ADMET, incluyendo 21 normas fisicoquímicas, 20 de química médica, 9 de absorción,

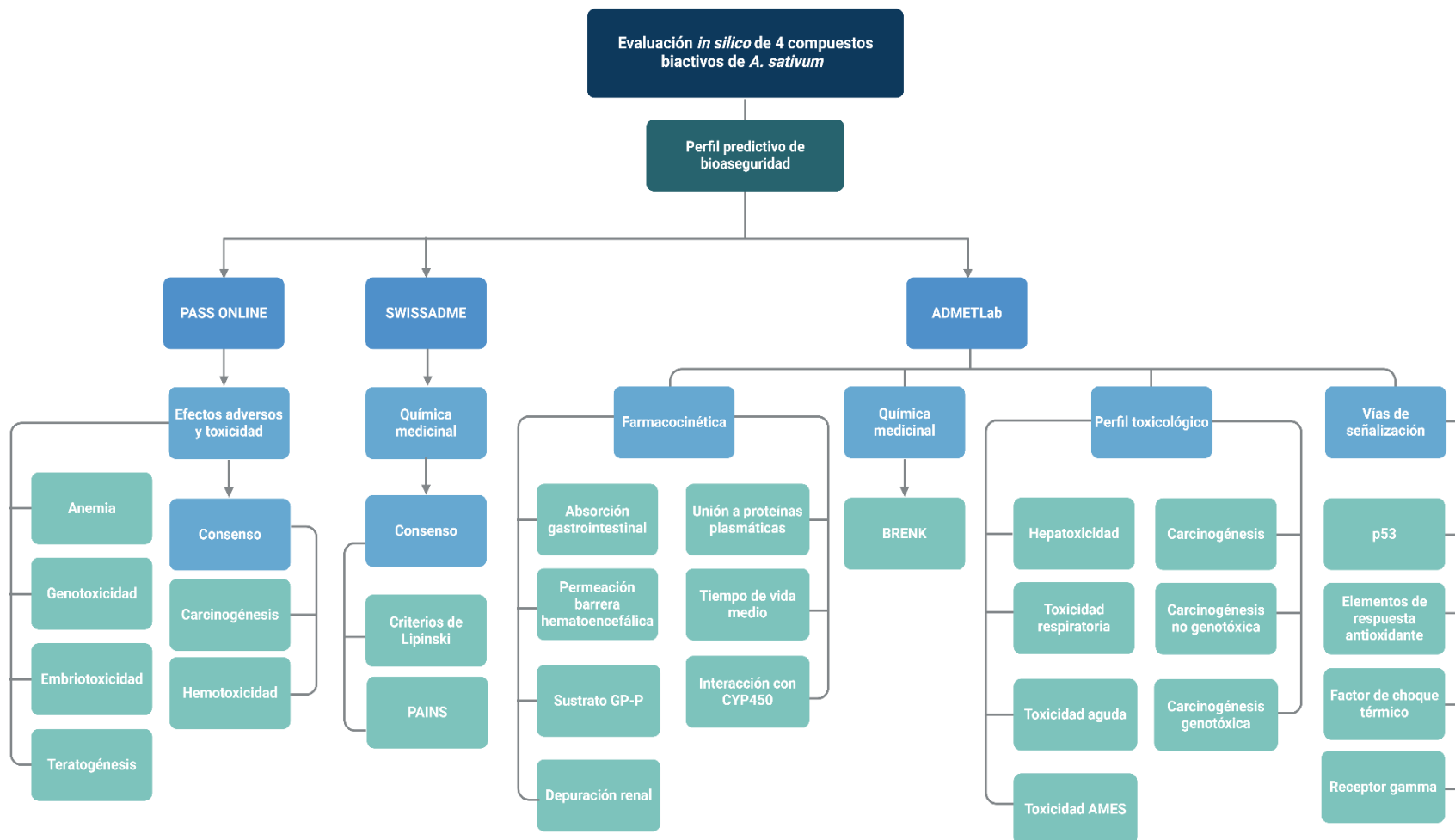


Figura 5. Primera etapa: diseño experimental propuesto en la evaluación *in silico* de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*. Se obtuvieron los resultados predictivos de bioseguridad (propiedades farmacocinéticas y toxicológicas) de 4

compuestos bioactivos de *A. sativum*: alil mercaptano (AM), dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS) y alicina (ALN), utilizando las plataformas bioinformáticas PASS Online, SwissADME y ADMETLab3.0 para generar valores correspondientes a los parámetros indicados en cada caso.



Figura 6. Segunda etapa: diseño experimental propuesto para la evaluación *in vitro* de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*. Se determinó la actividad hemotóxica presente en los eritrocitos humanos al ser expuestos a diversas

concentraciones (0.01, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 10 y 100 mg/mL) de los compuestos bioactivos de *A. sativum*: alil mercaptano (AM), dialil sulfuro (DAS), dialil disulfuro (DADS) y alicina (ALN). Como control estructural se utilizó el compuesto no sulfuroso dialil éter (DE) y como control positivo H₂O. Las muestras fueron centrifugadas (2000 rpm por 10 min) e incubadas durante 1 hora, posteriormente se tomaron alícuotas y se determinó su absorbancia a 550 nm. Finalmente se calculó el %hemotoxicidad = 100 x valor de absorbancia del compuesto bioactivo / el valor de absorbancia del control positivo (Cruz-Silva y col., 2000).

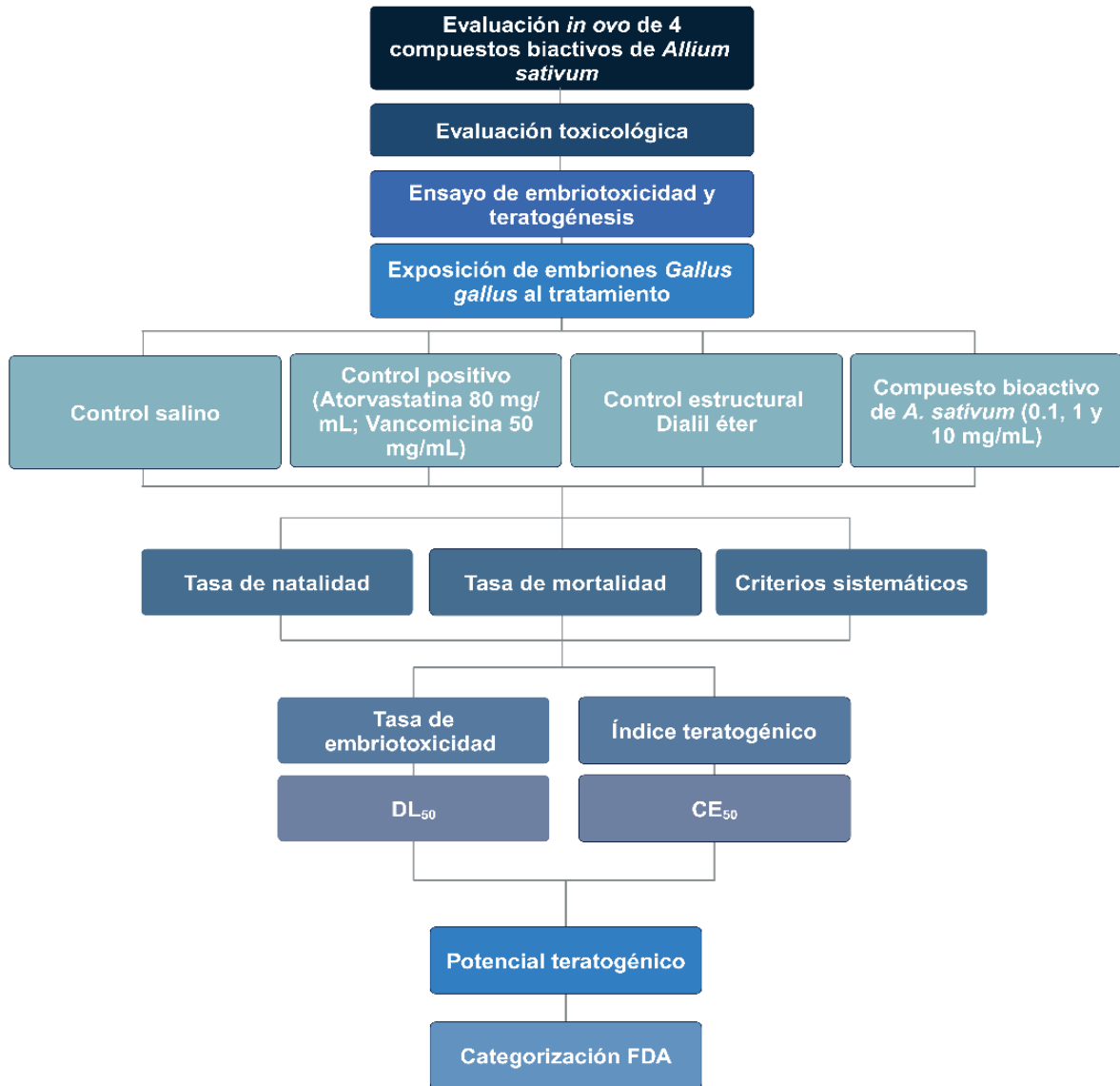


Figura 7. Tercera etapa: diseño experimental para la evaluación toxicológica de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*. Ensayo de embriotoxicidad *in ovo*. Se utilizaron 99 huevos previamente incubados a una temperatura de 37 °C con una humedad relativa de 65%. Los huevos que presentaron desarrollo embrionario se seleccionaron, etiquetaron y distribuyeron aleatoriamente en 9 grupos (n=11) de la forma siguiente: control (salino), control positivo para embriotoxicidad (atorvastatina 80 mg/mL) y teratogénesis (vancomicina 50 mg/mL), 3 grupos del control estructural no

sulfuroso dialil éter (0.1, 1 y 10 mg/mL) y 3 grupos con cada uno de los compuestos bioactivo de *A. sativum* en las diferentes concentraciones a evaluar (0.1, 1 y 10 mg/mL). Se registraron tasas de natalidad, mortalidad y criterios sistemáticos, a partir del cual se determinó CL_{50} para embriotoxicidad y CE_{50} para teratogénesis, se estableció el potencial teratogénico y se clasificó según criterios de FDA (Unfried, 2007; Lujá-Mondragón y col. 2019).

14 de metabolismo, 2 de excreción, 36 de toxicidad y 8 de toxicóforos (400,000 entradas generadas) (Fu y col., 2024). ADMETLab 3.0 implementa 77 modelos de predicción, incluidos 59 modelos de clasificación y 18 modelos de regresión, además cuenta con sólidos modelos DMPNN-Des y DMPNN con una R^2 superior al modelo anteriormente utilizado (MGA) (Fu y col., 2024).

8.4.2 Plataforma WayDrug- Pass Online

El perfil toxicológico para los parámetros: anemia, genotoxicidad, embriotoxicidad y teratogénesis, se obtuvo mediante la plataforma PASS ONLINE (Prediction of Activity Spectra for Substances; acceso: septiembre, 2024), el cual tiene la capacidad de predecir más de 4000 tipos de actividad biológica, abarcando efectos farmacológicos, mecanismos de acción, efectos tóxicos y adversos (Parasuraman, 2011). Este programa funciona según el principio de que la actividad biológica o toxicidad de un compuesto equivale a su estructura (Parasuraman, 2011). El predictivo PASS, se construye utilizando 20,000 compuestos principales de la base de datos MDDR, el algoritmo de estimación del espectro de actividad se basa en el enfoque bayesiano y los resultados son presentados como Pa:Pi (relación principio activo: principio inactivo), en el umbral de predicción de Pa >30%, Pa > 50% y Pa >70%; la precisión de la predicción de PASS es del 95% según la estimación de la validación cruzada de una sola salida (LOOCV) (Parasuraman, 2011). Además, se calculó un consenso entre las plataformas ADMETLab 3.0 y PASS ONLINE para los parámetros toxicológicos de carcinogénesis y hemotoxicidad, mediante la media de los porcentajes de predicción obtenidos (Prieto-Martínez y col., 2019).

8.4.3 Plataforma SwissADME

Los parámetros de química medicinal: criterios de Lipinski y PAINS, fue realizado en consenso entre las plataformas SwissADME (acceso: septiembre, 2024; <http://www.SwissADME.ch/>) y la plataforma ADMETLab 3.0 considerando la coincidencia de alertas (Prieto-Martínez y col., 2019). SwissADME cuenta con 6 secciones de análisis donde se calculan propiedades fisicoquímicas, lipofilicidad, solubilidad en agua, propiedades farmacocinéticas, similitud con drogas y química medicinal (Daina y col., 2017). En la sección de propiedades fisicoquímicas se compilaron descriptores moleculares y fisicoquímicos simples como peso molecular (PM), refractividad molecular (RM), recuento de tipos de átomos específicos y área de superficie polar (ASP) (Daina y col., 2017). Los valores se calcularon con OpenBabel9, versión 2.3.0 y el PSA se calculó mediante la técnica fragmentaria denominada área superficial polar topológica (ASPT), considerando el azufre y el fósforo como átomos polares (Daina y col., 2017)

8.5 Evaluación de actividad hemotóxica en eritrocitos humanos

Para determinar la actividad hemotóxica de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* y del control estructural no sulfuroso DAE en eritrocitos humanos, se utilizó una modificación de la metodología propuesta por Cruz-Silva y col. en 2000. Esta metodología implica tratar los eritrocitos con diferentes concentraciones del compuesto de interés durante un tiempo determinado y luego medir la cantidad de hemoglobina liberada como un indicador de hemotoxicidad.

En esta investigación se obtuvieron 4 mL de sangre periférica de un individuo sano mediante el uso de un dispositivo Vacutainer^{MR} en presencia del anticoagulante

ácido etilendiaminotetraacético (EDTA). Los eritrocitos humanos fueron separados de la sangre total por medio de centrifugación a 2000 RPM durante 10 minutos en una centrifugadora modelo Spinplus de la marca TopScience. Posteriormente, se realizaron tres lavados con solución salina tamponada con fosfato (PBS). En el último lavado, las células fueron centrifugadas nuevamente a 2000 RPM durante 10 minutos para obtener el paquete globular. Las células fueron luego incubadas a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente, se tomaron alícuotas de 50 µL que fueron colocadas en microtubos de 1.5 mL. Estas se resuspendieron con 400 µL de PBS y se adicionaron 50 µL de diferentes concentraciones a evaluar de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* y del control estructural no sulfuroso DAE para obtener concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 10 y 100 mg/mL en cada uno de los microtubos asignados, donde cada concentración fue evaluada por duplicado. Además, se utilizó agua tridestilada como control de hemólisis al 100%, en el que 50 µL de células sanguíneas se llevaron a 500 µL con agua tridestilada. Por último, se procedió a agitar suavemente cada una de las muestras para homogenizar e incubar hasta 60 minutos. Se realizaron lecturas a 550 nm utilizando un lector de placas de ELISA modelo EliRead de la marca KontroLab. Los resultados se presentaron como porcentaje de hemotoxicidad, el cual fue calculado mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Hemotoxicidad} = \frac{\text{Abs de la muestra}}{\text{Abs del control salino}} \times 100$$

8.6 Evaluación de embriotoxicidad y teratogénesis en embriones *G. gallus*

Para evaluar la embriotoxicidad de los compuestos bioactivos de *A. sativum* y del control estructural no sulfuroso DAE sobre embriones *G. gallus*, se realizó una modificación de la metodología propuesta por Da-Silva en 2024. Para cada uno de los

compuestos bioactivos y para el control estructural no sulfurado, se utilizaron 99 huevos *G. gallus* fecundados obtenidos de la empresa avícola Alvator. Los huevos se pesaron y desinfectaron con una solución de monopersulfato de potasio y cloruro de sodio y se incubaron a 37.7 °C con una humedad relativa de 65% utilizando la incubadora A90 de la marca Huacuja. El día 3 de desarrollo fueron visualizados por ovoscopio para confirmar fertilidad del huevo y posteriormente, los huevos con desarrollo embrionario fueron seleccionados, etiquetados y distribuidos aleatoriamente en 9 grupos con una n = 11 en cada uno (Cuadro 1).

A cada huevo se le realizó un orificio en la bolsa de aire sin perforar la membrana corioalantoidea y se administraron las diferentes soluciones en un volumen de 100 µl, seguidamente se cubrió el orificio con silicona líquida. El manejo de los huevos fue tratado en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar Ecoshell. Una vez tratados con las soluciones, los huevos fueron ingresados a la incubadora para cumplir con el periodo restante de los 21 días de incubación, en el cual se llevó a cabo de forma periódica cada 72 horas la observación y el registro del peso, por medio de un ovoscopio y balanza analítica, verificando la continuidad del desarrollo embrionario, según lo establecido por Hamburger y Hamilton (1951). Se prestó especial atención a la presencia de angiogénesis, crecimiento y movimiento propio del embrión.

En el día 7 y 15 de incubación se realizaron los puntos controles de desarrollo, para ello se abrieron 2 huevos por cada grupo, se observaron las características sistemáticas para embriotoxicidad: ausencia de latido del corazón y licuefacción de proteínas (anexo 1), así como características sistemáticas asociadas a teratogénesis:

Cuadro 1. Distribución de los grupos experimentales para embriotoxicidad y teratogénesis *in ovo* en embriones *G. gallus*

Grupos	Concentración	N
1. Control salino	9 mg/mL	11
2. Control positivo a embriotoxicidad Atorvastatina	80 mg/mL	11
3. Control positivo a teratogénesis Vancomicina	50 mg/mL	11
4. Control estructural no sulfuroso DAE	0.1 mg/mL	11
5. Control estructural no sulfuroso DAE	1 mg/mL	11
6. Control estructural no sulfuroso DAE	10 mg/mL	11
7. Compuesto bioactivo	0.1 mg/mL	11
8. Compuesto bioactivo	1 mg/mL	11
9. Compuesto bioactivo	10 mg/mL	11

malformaciones en cuerpo (cara, pico y extremidades), reservando para el día de eclosión: gastrosquisis y cianosis (anexo 2). Finalmente, a partir del día 21 de incubación, se registraron las eclosiones de los productos de gestación para determinar la frecuencia de embriones vivos y muertos por grupo.

Los resultados obtenidos para embriotoxicidad se presentaron en forma de tasa de natalidad y tasa de mortalidad (Moreno-Altamirano y col., 2000).

Fórmula de tasa de natalidad:

$$\text{Tasa de natalidad (\%)} = \frac{\# \text{ EV}}{\# \text{ ET}} \times 100$$

Donde:

EV = Número de embriones vivos en el grupo tratado

EMT = Número de embriones totales en el grupo tratado

Fórmula de tasa de mortalidad:

$$\text{Tasa de mortalidad (\%)} = \frac{\# \text{ EM}}{\# \text{ ET}} \times 100$$

Donde:

EM = Número de embriones muertos en el grupo tratado

EMT = Número de embriones totales en el grupo tratado

Los datos fueron corregidos utilizando la fórmula de Abbott para determinar la tasa de embriotoxicidad de *G. gallus* con relación a la concentración evaluada de los compuestos bioactivos y del control estructural no sulfuroso DAE (Uslu y col., 2024).

Fórmula Abbot:

$$\text{Tasa de embriotoxicidad corregida Abbott (\%)} = \frac{(\# \text{ EMT} - \# \text{ EMCS})}{(\# \text{ TE} - \# \text{ EMCS})} \times 100$$

Donde:

EMT = Número de embriones muertos en el grupo tratado

EMCS = Número de embriones muertos en el control salino

TE = Número total de embriones en el grupo tratado

Para los resultados de teratogénesis, se calculó el índice teratogénico de Sheppard, con la siguiente fórmula (Shepard, 1994):

$$\text{Índice teratogénico de Sheppard (\%)} = \frac{\# \text{ FT}}{\# \text{ ES}} \times 100$$

Donde:

FT = Número de fetos teratogénicos

ES = Número de embriones sanos

Además, se añadió las frecuencias y porcentajes de eventos ocurridos para el grupo de embriones sanos, el número de embriones totales por grupo (n), así como el desglose de las frecuencias y porcentajes de los criterios sistemáticos evaluados: cianosis, gastrosquisis y malformaciones.

8.7 Potencial teratogénico

Para determinar CL₅₀ embriotóxica y CE₅₀ teratogénica, se realizó un análisis de máxima verosimilitud por regresión lineal, con un intervalo de confianza del 95% por medio del software estadístico SPSS, donde se consideraron las tasas de embriotoxicidad y teratogénesis de las 3 concentraciones evaluadas (0.1, 1 y 10 mg/mL), respectivamente (Luja-Mondragón y col. 2019).

Con la finalidad de integrar los resultados de embriotoxicidad y teratogénesis de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* y del control estructural no sulfuroso DAE, se calculó el potencial teratogénico, que se definió como el cociente de CL₅₀ embriotóxica y CE₅₀ teratogénica (Luja-Mondragón y col. 2019).

$$\text{Potencial Teratogénico (PT)} = \frac{\text{CL}_{50} \text{ embriotóxica}}{\text{CE}_{50} \text{ teratogénica}}$$

Donde:

CL₅₀ embriotóxica: Concentración que causa la muerte del 50% de los embriones

CE₅₀ teratogénica: Concentración que causa malformaciones en el 50% de los embriones

La interpretación del resultado es (Weigt y col., 2011):

PT > 1: El compuesto bioactivo es más teratogénico que embriotóxico (mayor riesgo de malformaciones).

PT = 1: El compuesto bioactivo tiene efectos embriotóxicos y teratogénicos similares.

PT < 1: El compuesto bioactivo es más embriotóxico que teratogénico (mayor riesgo de muerte embrionaria).

8.8 Análisis estadístico

8.8.1 Análisis estadístico de hemotoxicidad *in vitro* sobre células eritrocitarias humanas

Las evaluaciones de hemotoxicidad sobre eritrocitos humanos fueron determinadas como datos cuantitativos y se representaron como la media \pm EEM, posteriormente se elaboró con ellos una base de datos en el programa Microsoft ExcelMR. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente con el software GraphPad PrismMR v.8, mediante la prueba *t-student* no pareada (*unpaired t-test*). Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de p fue inferior a 0.05.

8.8.2 Análisis estadístico de embriotoxicidad y teratogénesis *in ovo* sobre embriones *G. gallus*

Se evaluó la significancia estadística ($p < 0.05$) de las frecuencias de mortalidad y el índice teratogénico de Sheppard entre los grupos de estudio y controles utilizando la prueba de Chi-cuadrada (X^2) con corrección de Yates en IBM SPSS Statistics^{MR} v.26.

8.8.2 Análisis estadístico de regresión lineal para CL₅₀ embriotóxica y CE₅₀ teratogénica

Para el cálculo de CL₅₀ embriotóxica y CE₅₀ teratogénica, se realizó un análisis de regresión lineal de máxima verosimilitud (*likelihood*) considerando los porcentajes de mortalidad e índice teratogénico de Sheppard de los 3 puntos de concentración (0.1, 1 y 10 mg/mL) respectivamente, con un intervalo de confianza del 95%.

IX. RESULTADOS


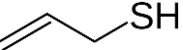
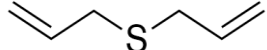
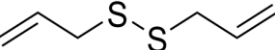
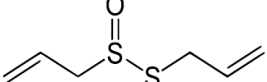
9.1. Evaluación *in silico* de propiedades farmacocinéticas de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

La plataforma bioinformática ADMETLab 3.0 (Fu y col., 2024), determinó las propiedades farmacodinámicas, farmacocinéticas y toxicológicas (perfil ADMET: absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad) para los compuestos bioactivos: AM, DAS, DADS y ALN (acceso: septiembre, 2024). Los resultados obtenidos se orientaron hacia una interpretación toxicológica y comparativa con el control estructural no sulfuroso DAE (Cuadro 2).

9.1.1 Probabilidad de absorción gastrointestinal humana de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

Una vez que son consumidos por vía oral, el perfil de biodisponibilidad y absorción de los derivados del ajo estará influenciado por las propiedades fisicoquímicas de los mismos, así como la anatomía y fisiología del tracto gastrointestinal (Di y col., 2020). Estos factores pueden alterar directamente la cinética de absorción del compuesto a través de la membrana intestinal y su posterior transferencia al torrente sanguíneo, lo cual es crucial para determinar la seguridad y la eficacia terapéutica del compuesto bioactivo (Di y col., 2021).

Cuadro 2. Evaluación *in silico* de propiedades farmacocinéticas de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Estructura	Predicción de propiedades farmacocinéticas					
		AGI (%)	UPP (%)	BHE (%)	Sustrato PgP (%)	T _{1/2} (Horas)	DR mL/min•kg
CE Dialil éter		95.9 ●	71.96 ●	20.1 ●	9.9 ●	1.53 ●	11.422 ●
AM		65.6 ●	45.68 ●	3.5 ●	0.4 ●	1.10 ●	11.438 ●
DAS		98.8 ●	76.88 ●	15.7 ●	4 ●	1.09 ●	11.599 ●
DADS		99.9 ●	57.03 ●	91.5 ●	0.5 ●	2.06 ●	11.316 ●
ALN		99.2 ●	66.04 ●	91.7 ●	6.8 ●	2.11 ●	10.78 ●

AGI: Absorción gastrointestinal humana; UPP: Unión a proteínas plasmáticas; BHE: Permeación de barrera hematoencefálica; PgP: Sustrato de glicoproteína p; T_{1/2}: Tiempo de vida medio (Teórico); DR: Depuración renal.

Etiqueta semáforo, indica la clasificación de los valores de probabilidad de predicción para cada parámetro: ● baja (0-29%), ● moderada (30-69%), ● alta (70-100%).

Parámetros calculados mediante ADMETLab 3.0.

En la evaluación de la absorción gastrointestinal humana (AGI) (cuadro 2), se ha determinado que los compuestos bioactivos DAS, DADS y ALN, exhiben una probabilidad alta (>98.8% y alcanzando hasta el 99.9%), de ser agentes con una AGI mayor del 30%, obteniendo valores de predicción similares al control estructural no sulfuroso DAE (95.9%). En contraste, el AM que tiene un grupo alilo en vez de dos como el DADS y ALN, presentó una probabilidad de AGI moderada (65.6%). En la comparación directa de los análogos DAS y DAE, la presencia del átomo de S en el DAS le confirió un efecto no significativo en su AGI (98.8 vs 95.9%).

9.1.2 Probabilidad de unión a proteínas plasmáticas de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

En el proceso de distribución, los compuestos bioactivos de *A. sativum*, son transportados desde los capilares sanguíneos hacia los tejidos u órganos de mayor perfusión como el corazón, cerebro, hígado y riñones mediante la unión a proteínas plasmáticas (UPP), la fracción libre (no unida) es capaz de atravesar las membranas celulares para ingresar a los tejidos donde puede manifestar su potencial tóxico o terapéutico (Di y col., 2020).

Los 4 compuestos bioactivos evaluados presentaron un porcentaje de UPP <77% (cuadro 2), con valores de probabilidad alta para DADS con el 76.88%, similar al control estructural no sulfuroso DAE (71.96%), así como una probabilidad moderada para los compuestos bioactivos: 66.04% para la ALN, 57.03% para el DAS y 45.68% para el AM. La comparación DAE/DAS sugiere que la presencia del átomo de S en vez del átomo de O disminuye la probabilidad de UPP en un 15% aproximadamente.

9.1.3 Predicción de la permeación de la barrera hematoencefálica para los compuestos bioactivos de *A. sativum*

La transferencia de compuestos bioactivos de *A. sativum* desde la circulación periférica hacia el cerebro y al líquido cefalorraquídeo, se encuentra condicionada por barreras celulares especializadas, tales como la barrera hematoencefálica (BHE) (Qiu y col., 2023). Aquellos compuestos que no se unen a proteínas plasmáticas, son generalmente liposolubles y aquellos con un peso molecular menor a 200 Da, tienen la capacidad de atravesar con facilidad las células endoteliales de los capilares cerebrales, permitiéndoles ejercer su efecto terapéutico o tóxico en el sistema nervioso central (Qiu y col., 2023).

Los datos generados por la plataforma ADMETLab 3.0 (cuadro 2), indican que los bioactivos ALN y DADS, poseen una probabilidad alta, del 91.7% y 91.5%, respectivamente, de penetrar la BHE. En contraste, los compuestos bioactivos DAS y AM, presentan una probabilidad baja de penetrar la BHE (15.7% y del 3.5%, respectivamente) lo cual también ocurre con el control estructural no sulfuroso DAE (20.1%) para este parámetro. Así, la comparación DAE/DAS no sugiere un efecto significativo sobre la capacidad de penetración de la BHE.

9.1.4 Predicción de los compuestos bioactivos de *A. sativum* sobre la probabilidad de ser sustrato de PgP

La glicoproteína p (PgP), perteneciente a una superfamilia de transportadores activos primarios dependientes de ATP, se expresa ampliamente en el organismo, se localiza en la superficie apical de las células polarizadas del hígado y los riñones,

donde contribuye a la eliminación de compuestos bioactivos (Nicolas y de-Lange, 2019). En barreras fisiológicas del intestino, la BHE y la placenta, la PgP se expresa en la superficie luminal de las células, opera como una bomba de expulsión que, mediante el consumo de ATP, transporta activamente los sustratos fuera de las células, impidiendo así su absorción sistémica o distribución en los tejidos y protegiendo al organismo de xenobióticos o sustancias perjudiciales (Nicolas y de-Lange, 2019).

Al analizar la probabilidad de ser sustrato de PgP por medio de la plataforma ADMETLab 3.0 (cuadro 2), los compuestos bioactivos: ALN, DAS, DADS y AM, presentan probabilidad baja (6.8%, 4%, 0.5% y 0.4%, respectivamente), al igual que el control estructural no sulfuroso DAE (9.9%). Por consiguiente, la comparación del binomio DAE/DAS no indica una diferencia significativa en su probabilidad de ser sustratos de la PgP.

9.1.5 Predicción de tiempo de vida medio sobre los compuestos bioactivos de *A. sativum*

El tiempo de vida medio ($T_{1/2}$) representa el intervalo durante el cual la concentración plasmática de un compuesto bioactivo disminuye en un 50% desde su nivel inicial (Khan y col., 2018). Este parámetro farmacocinético es significativo, ya que proporciona una estimación de la rapidez con la que el compuesto es distribuido y eliminado por el cuerpo (Khan y col., 2018).

La plataforma ADMETLab 3.0 permitió estimar las horas de vida media para cada uno de los 4 compuestos bioactivos. De acuerdo con los resultados (cuadro 2), los

compuestos bioactivos ALN, DADS, AM y DAS tienen una vida media baja, con valores de 2.1, 2.06, 1.10 y 1.09 horas, respectivamente. Estos tiempos son similares al estimado para el control estructural no sulfuroso DAE (1.53 horas), por lo que la sustitución de los átomos de O (DAE) por S (DAS) no cambia de forma importante su cinética de distribución y eliminación.

9.1.6 Predicción sobre depuración renal de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

La depuración renal de compuestos bioactivos es un proceso complejo determinado por factores patológicos y fisiológicos como la filtración glomerular, la secreción y reabsorción tubular, afinidad por proteínas plasmáticas y el peso molecular, que deben ser cuidadosamente considerados para prescribir una dosificación que asegure la eliminación efectiva del compuesto y prevenga la toxicidad por acumulación (Fagerholm, 2007; Quesada, 1997).

En la plataforma ADMETLab 3.0, se clasifica la depuración renal en función de valores predictivos: aquellos inferiores a 5 mL/min/kg se consideran de baja depuración renal, los que están entre 5 y 15 mL/min/kg indican una depuración renal moderada, y los superiores a 15 mL/min/kg sugieren una alta depuración renal. Bajo esta clasificación, los 4 compuestos bioactivos: DAS, AM, DADS y ALN, presentaron valores predictivos de depuración renal de: 11.599, 11.428, 11.316 y 10.78 mL/min/kg (cuadro 2), respectivamente, valores predictivos similares al control estructural no sulfuroso DAE (11.422 mL/min/kg), lo cual indica que todos ellos se asocian a una

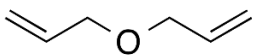
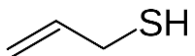
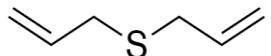
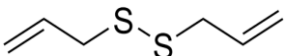
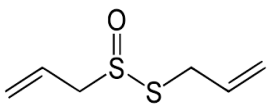
depuración renal moderada y, como en comparaciones DAS/DAE anteriores, la sustitución SxO no parece cambiar la capacidad de depuración renal.

9.2. Evaluación *in silico* de propiedades de los compuestos bioactivos de *A. sativum* como inhibidores de subfamilias del CYP450

El sistema enzimático del citocromo P450 (CYP450) abarca una amplia superfamilia de enzimas hemoproteínas monooxigenasas, cuya distribución se encuentra en riñones, pulmones, intestinos, placenta y mayoritariamente en el hígado, específicamente en las mitocondrias y en el retículo endoplásmico de hepatocitos (Viruete, 2015; Renaud y col., 2011, Guengerich, 2001). Estas enzimas participan en la bioactivación y desintoxicación de xenobióticos, así como el metabolismo de endobióticos como el colesterol, progesterona y testosterona (Viruete, 2015; Renaud y col., 2011, Guengerich, 2001). La actividad inhibidora producto de interacciones metabólicas de algunos compuestos bioactivos con las subfamilias del CYP450, provoca la acumulación de metabolitos endógenos como hormonas (estrógenos y andrógenos), ácidos biliares y bilirrubina (Viruete, 2015; Renaud y col., 2011, Guengerich, 2001). Esto último se traduce en desequilibrio hormonal, daño hepático, estrés oxidativo y aumento del riesgo de enfermedades, afectando significativamente la homeostasis y salud del individuo (Guengerich, 2017).

Los compuestos bioactivos AM, DAS, DADS y ALN, al igual que el control estructural no sulfuroso DAE, fueron evaluados respecto a la probabilidad de actuar como inhibidor de subfamilias del CYP450 (1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4) por medio de la plataforma ADMETLab 3.0 (cuadro 3). A continuación, se desglosan estos aspectos.

Cuadro 3. Evaluación *in silico* de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* como inhibidores de subfamilias de CYP450.

Compuesto	Estructura	Probabilidad de interacción como inhibidor de subfamilias del CYP450				
		1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
Dialil éter		73.6 ●	6.2 ●	30.8 ●	15.4 ●	95.9 ●
AM		49.9 ●	0 ●	0.2 ●	0.6 ●	54.4 ●
DAS		99.9 ●	60.7 ●	99 ●	71 ●	99.9 ●
DADS		100 ●	99.1 ●	100 ●	2 ●	93.1 ●
ALN		88.7 ●	1.4 ●	96.4 ●	1.4 ●	64.2 ●

Los parámetros evaluados mediante la plataforma ADMETLab 3.0 se presentan como valores de probabilidad para actuar como inhibidor.

Etiqueta semáforo, indica la clasificación de los valores de probabilidad de predicción para cada parámetro: ● baja (0-29%), ● moderada (30-69%), ● alta (70-100%).

9.2.1 Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de *A. sativum* como inhibidor del CYP1A2

El CYP1A2 constituye cerca del 13% del contenido total de enzimas presentes en el hígado, interviene en la velocidad metabólica y eliminación de hormonas como estradiol, estrona y melatonina, además se ha asociado al CYP1A2 con la bioactivación de procarcinógenos (Ohki y col., 2023; Lu y col., 2020; Usmani y col., 2006; Faber y col., 2005).

Los resultados predictivos (cuadro 3), sugieren que los compuestos bioactivos DADS, DAS y ALN, presentan una probabilidad alta de interaccionar como inhibidor de CYP1A2 (100%, 99.9%, 88.7%, respectivamente) mientras que en el control estructural no sulfuroso DAE fue ligeramente menor (73.6%). Por su parte, el compuesto bioactivo AM presentó una probabilidad significativamente menor, catalogada como moderada, del 49.9%. En este caso, la sustitución SxO en el binomio DAS/DAE disminuye la probabilidad de metabolización vía CYP1A2.

9.2.2 Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de *A. sativum* como inhibidor del CYP2C9

El CYP2C9, es el segundo citocromo mayormente expresado en el hígado, participa en el metabolismo del 15 al 20% de todos los xenobióticos y compuestos endógenos de fase I, como por ejemplo el ácido araquidónico (Rettie y Jones, 2005; Kirchheiner y col., 2004).

Los resultados proporcionados por la plataforma ADMETLab 3.0 (cuadro 3), para el compuesto DADS, establece una probabilidad alta del 99.1%, probabilidad

moderada para DAS (60.7%) y baja probabilidad para ALN (1.4%) y AM (0%). Estos últimos son similares al control estructural no sulfuroso DAE (6.2%), por lo que en este caso la sustitución SxO en el binomio DAS/DAE afecta notoriamente la probabilidad de actividad inhibitoria del CYP2C9.

9.2.3 Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de *A. sativum* como inhibidor del CYP2C19

El CYP2C19, es una importante enzima metabolizadora presente en el hígado e intestino, implicada en la biotransformación de compuestos endógenos como neurotransmisores (hidroxitriptamina o serotonina), ácidos grasos incluyendo el canabidiol y ácido araquidónico (Stingl y col., 2021).

Durante el análisis del posible efecto inhibidor sobre el CYP2C19 (cuadro 3), la plataforma ADMETLab 3.0 reporto para los compuestos bioactivos: DADS, DAS y ALN, una probabilidad alta (100%, 99% y 96.4% respectivamente), de actuar como inhibidor de CYP2C19, la cual fue moderada para el control estructural no sulfuroso DAE (30.8%) y muy baja probabilidad para el compuesto bioactivo: AM (0.2%). De esta forma, La sustitución SxO en el binomio DAS/DAE indica una reducción significativa en actividad inhibitoria sobre el CYP2C19.

9.2.4 Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de *A. sativum* como inhibidor del CYP2D6

El CYP2D6, mantiene un pequeño porcentaje (1.5%) de todos los citocromos hepáticos; sin embargo, es de gran importancia al metabolizar una serie de

compuestos endógenos incluidas las aminas en el cerebro, incluyendo la tiramina y la 5-metoxitriptamina, así como la anandamida y la progesterona (Darney, 2021).

La plataforma ADMETLab 3.0 (cuadro 3), indicó para el compuesto bioactivo: DAS una probabilidad alta (71%) de interaccionar como inhibidor de CYP2D6, mientras que para los compuestos bioactivos: DADS, ALN y AM, la probabilidad fue baja (2%, 1.4% y 0.6%, respectivamente), en forma similar al control estructural no sulfuroso DAE (15.4%). Como en el caso anterior, la sustitución SxO del binomio DAS/DAE sugiere una menor probabilidad de inhibir al CYP2D6.

9.2.5 Probabilidad de interacción de los compuestos bioactivos de *A. sativum* como inhibidor del CYP3A4

El CYP3A4 es el citocromo con mayor porcentaje de expresión en el hígado e intestino, representando cerca del 60% del total de citocromos en el hígado. Es el encargado de metabolizar sustratos endógenos como progesterona, cortisol, estradiol y testosterona (Fujino y col., 2021; Dostalek y col; 2011; Quiñones y col., 2008).

Al evaluar el posible efecto inhibidor de los compuestos bioactivos sobre CYP3A4 (cuadro 3), la plataforma ADMETLab 3.0 arrojó las siguientes probabilidades que son clasificadas como altas para el DAS (99.9%) y el DADS (93.1%) que son valores predictivos similares al control estructural no sulfuroso DAE (95.9%), mientras que los compuestos bioactivos ALN y AM exhibieron una probabilidad moderada del 64.2% y 54.4%, respectivamente. Por consiguiente, la sustitución SxO del binomio DAS/DAE no redujo la probabilidad de ser inhibidores del CYP3A4. De forma

interesante, el átomo de O adicional que diferencia la ALN del DADS abate dramáticamente esta actividad.

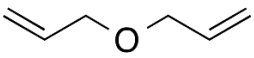
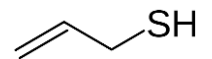
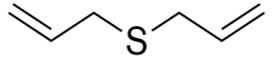
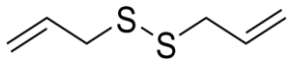
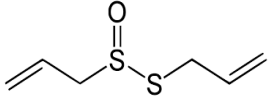
9.3. Evaluación *in silico* de los compuestos bioactivos de *A. sativum* como sustratos de subfamilias del CYP450

En el contexto de toxicidad, los sustratos de las subfamilias CYP450, pueden clasificarse en dos categorías: 1) profármacos (sustancias que requieren ser metabolizados por enzimas CYP450 para activarse y ejercer su efecto tóxico) y 2) compuestos que son activos y tóxicos en su forma original, pero que al ser metabolizados se convierten en formas inactivas y posteriormente se excretan (Ortiz-Montellano., 2013; Orellana y Guajardo, 2004).

Los compuestos bioactivos: AM, DAS, DADS y ALN, fueron evaluados en la plataforma ADMETLab 3.0 para predecir la probabilidad de interaccionar como sustrato de subfamilias del CYP450: 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4, los resultados que exponen una probabilidad >50% se consideraron relevantes (cuadro 4).

Los siguientes compuestos bioactivos presentaron una probabilidad alta de ser sustratos del CYP1A2: DAS (98.6%), DADS (91.3%) y ALN (79.7%), mientras que el control estructural no sulfuroso DAE presentó una probabilidad significativamente menor (moderada) del 32.4%. En el caso del análisis para el CYP2C9, las probabilidades de ser sustrato fueron altas para DADS (100%), ALN (99.5%) y DAS (99.3%), las cuales fueron similares al control estructural no sulfuroso DAE (99.1%), mientras que AM presentó una probabilidad moderada del 67.4%.

Cuadro 4. Evaluación in silico de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* como sustrato de subfamilias de CYP450.

Compuesto	Estructura	Probabilidad de interacción como sustrato de subfamilias del CYP450				
		1A2	2C9	2C19	2D6	3A4
DAE		32.4 ●	99.1 ●	12.8 ●	85.2 ●	1.1 ●
AM		8.3 ●	67.4 ●	19.1 ●	99.8 ●	0.3 ●
DAS		98.6 ●	99.3 ●	23.9 ●	97.8 ●	5.3 ●
DADS		91.3 ●	100 ●	32.9 ●	100 ●	18.9 ●
ALN		79.7 ●	99.5 ●	89.4 ●	96.9 ●	0.4 ●

Los parámetros evaluados mediante la plataforma ADMETLab 3.0 se presentan como valores de probabilidad para actuar como sustrato.

Etiqueta semáforo, indica la clasificación de los valores de probabilidad de predicción para cada parámetro: ● baja (0-29%), ● moderada (30-69%), ● alta (70-100%)

Al evaluar el CYP2C19, solo el compuesto bioactivo ALN mostró una probabilidad alta, con un 89.4%, superando ampliamente el valor predictivo clasificado como bajo para el control estructural no sulfuroso DAE (12.8%). Para el CYP2D6, todos los compuestos bioactivos evaluados demostraron una probabilidad clasificada como alta de interaccionar como sustratos, con una probabilidad máxima del 100% para DADS y mínima del 96.8% para ALN, mientras que esta fue ligeramente menor para el control estructural no sulfuroso DAE (85.2%). Por último, al analizar la interacción como sustratos del CYP3A4, ningún compuesto mostró una probabilidad superior al 50%, con probabilidad máxima para el DADS (18.9%) y mínima para el AM 0.3%, donde el control estructural no sulfuroso DAE presentó el 1.1%, clasificándolos en la categoría de interacción baja.

De manera general, todos los compuestos bioactivos de *A. sativum* evaluados son posiblemente metabolizados por los citocromos CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, pero no por CYP3A4; mientras que la ALN también puede ser metabolizada vía CYP2C19. El control estructural no sulfuroso DAE resultó ser un posible sustrato de un repertorio más limitado: CYP2C9 y CYP2D6.

9.4. Evaluación *in silico* del perfil de química medicinal de los compuestos bioactivos de *A. sativum*


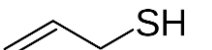
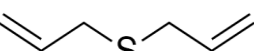
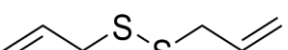
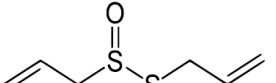
Para los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* y su control estructural no sulfuroso DAE, se realizó una evaluación *in silico* del perfil de química medicinal incluyendo los parámetros: Lipinski y PAINS, utilizando la plataforma ADMETLab 3.0

y el parámetro Brenk mediante la plataforma SwissADME (acceso: septiembre 2024; cuadro 5).

La regla de Lipinski, también conocida como la “regla de los cinco”, sugiere que una absorción o permeabilidad deficiente en compuestos bioactivos es más probable cuando se presentan las siguientes características fisicoquímicas: más de cinco donantes de enlaces de hidrógeno, más de diez aceptadores de enlaces de hidrógeno, un peso molecular superior a 500 Da y un Log P calculado mayor que cinco (Yang y col., 2020). Bajo este contexto, ningún compuesto bioactivo de *A. sativum*, ni el control estructural no sulfuroso DAE, violan estas reglas (recuadro 4).

Además, se evaluó la sección PAINS (Pan-Assay Interference Compounds) para los 4 compuestos bioactivos y el control estructural no sulfuroso DAE, con el objetivo de identificar alertas subestructurales inestables, reactivos o propensos a reaccionar de forma inespecífica con múltiples proteínas o enzimas, lo que podría conducir a efectos tóxicos en el organismo o efectos secundarios adversos (Capuzzi y col., 2017; Daina y col., 2017). Los hallazgos confirmaron la ausencia de tales alertas subestructurales para todos los compuestos evaluados (cuadro 5).

Cuadro 5. Evaluación in silico del perfil de química medicinal de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Estructura	Análisis predictivo de química medicinal		
		Lipinski (# violaciones) *	PAINS*	Brenk**
Dialil éter		0	0	1
AM		0	0	2
DAS		0	0	1
DADS		0	0	2
ALN		0	0	2

Lipinski: Criterios de Lipinski; PAINS: Compuestos de interferencia de ensayo panorámico; Brenk: alerta estructural de fracciones químicas que pueden ser tóxicas, inestables, colorantes, etc.

*Parámetros consenso entre la plataforma ADMETLab y PASS ONLINE.

** Parámetro calculado mediante ADMETLab 3.0

El método predictivo Brenk, se emplea para examinar una serie de 105 fragmentos moleculares con el fin de identificar aquellos que poseen características asociadas con una farmacocinética desfavorable, toxicidad, reactividad química o inestabilidad metabólica (Daina y col., 2017). El predictivo Brenk, incluido en la plataforma SwissADME (cuadro 5), demostró que en todos los compuestos bioactivos evaluados de *A. sativum* y en el control estructural no sulfuroso DAE, la estructura problemática corresponde al alqueno aislado (C=C) y para los compuestos bioactivos AM, DADS y ALN se implicó además como fragmento problemático el grupo disulfuro (R-S-S-R').

9.5. Evaluación *in silico* del perfil toxicológico de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

La evaluación *in silico* del perfil toxicológico de AM, DAS, DADS, ALN y el control estructural no sulfuroso DAE, fue determinado utilizando la plataforma ADMETLab 3.0 y la plataforma PASS ONLINE (acceso: septiembre 2024, cuadro 5).

9.5.1 Evaluación *in silico* del predictivo de hepatotoxicidad de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

La hepatotoxicidad (Ht) se refiere al daño que puede generar un compuesto bioactivo o metabolito sobre el hígado, produciendo alteraciones puntuales como el aumento de alanina transferasa, bilirrubina directa sérica y de aspartato aminotransferasa (Iorga y Dara, 2019).

Referente a la predicción de Ht (Cuadro 6), los resultados indican una probabilidad alta para AM (88.1%) de ser tóxico en humanos, mientras que el

Cuadro 6. Evaluación in silico del perfil toxicológico de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto bioactivo	Predicción de características toxicológicas						
	Ht (%)	TR (%)	TOAR (%)	TAmes (%)	Cg *	Hemo *	Anemia **
DAE	27.1 ●	73.8 ●	51.6 ●	52.8 ●	67.3 ●	30.9 ●	76 ●
AM	88.1 ●	99.4 ●	84.9 ●	54.8 ●	33.4 ●	71.6 ●	79 ●
DAS	30.1 ●	71.2 ●	59.1 ●	54 ●	47.15 ●	30.4 ●	54 ●
DADS	13.3 ●	85.3 ●	74.4 ●	49.5 ●	41.5 ●	20.25 ●	47 ●
ALN	18.5 ●	98.8 ●	77.5 ●	88.5 ●	44 ●	1.2 ●	28 ●

Ht: Hepatotoxicidad; TR: Toxicidad respiratoria; TOAR: Toxicidad aguda oral en rata; TAmes: Toxicidad Ames; Cg: Carcinogénesis; Hemo: Hemotoxicidad.

Etiqueta semáforo, indica la clasificación de los valores de probabilidad de predicción para cada parámetro: ● baja (0-29%), ● moderada (30-69%), ● alta (70-100%)

*Parámetros consenso entre la plataforma ADMETLab y PASS ONLINE.

** Parámetro realizado con la plataforma PASS ONLINE.

compuesto bioactivo DAS presentó una probabilidad menor y moderada (30.1%), por otra parte, ALN y DADS presentaron una probabilidad baja (18.5% y 13.3% respectivamente), cualitativamente similar a la predicción del control estructural no sulfuroso DAE (27.1%).

9.5.2 Evaluación *in silico* del predictivo de toxicidad respiratoria de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

La exposición a sustancias tóxicas a través de la inhalación constituye una ruta significativa de riesgo para la salud humana. Esta vía puede provocar daño en pulmones, los cuales frecuentemente se asocian con la generación de radicales libres, alteraciones de la permeabilidad de los capilares pulmonares y respuestas inmunológicas adversas (Sharma y col., 2023; Clippinger y col., 2018; Haro y col., 2002).

Los predictivos realizados sobre toxicidad respiratoria (TR) (cuadro 6) para los compuestos bioactivos AM, ALN, DADS y DAS presentaron una probabilidad alta del 99.4%, 98.8%, 85.3% y 71.2% respectivamente, para generar afectación pulmonar, los cuales son valores predictivos similares al control estructural no sulfuroso DAE (73.8%). De forma interesante, el binomio DAS/DAE presentó una probabilidad similar tanto en Ht como en TR.

9.5.3 Evaluación *in silico* del predictivo de toxicidad oral aguda en ratas de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

La evaluación de la toxicidad oral aguda en ratas (TOAR), es un procedimiento cuantitativo de riesgo para determinar la categorización de peligro de compuestos

bioactivos (Karmaus y col., 2022). Este proceso se centra en determinar la dosis letal media (DL50), definida como la cantidad de sustancia que al ser ingerida causa la muerte del 50% de un grupo específico de animales en un tiempo determinado (Karmaus y col., 2022).

Al evaluar TOAR en los compuestos bioactivos de *A. sativum* (cuadro 6), los compuestos: AM, ALN y DADS, reportaron una probabilidad alta de ser tóxicos en mamíferos (84.9%, 77.5% y 74.4% respectivamente). Para el compuesto bioactivo DAS, este exhibió una probabilidad moderada del 59.1%, similar al control estructural no sulfuroso DAE (51.5%).

9.5.4 Evaluación *in silico* de los predictivos: toxicidad Ames y carcinogénesis de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

El ensayo de toxicidad Ames (TAmes), es utilizado para evaluar el potencial mutagénico de compuestos bioactivos, utilizando cepas de *Salmonella typhimurium* dependientes de histidina para detectar mutaciones (sustituciones, adiciones o eliminación de uno o más nucleótidos de ADN) (Pillco y de la Peña, 2014).

En los análisis predictivos de TAmes (cuadro 6), se observó que el compuesto bioactivo ALN tiene una alta probabilidad (88.5%) de ser tóxico y alterar estructuras del ADN. Para los compuestos bioactivos AM, DAS y DADS, los resultados indican una probabilidad moderada, con valores de 54.8%, 54% y 49.5%, respectivamente, similar al control estructural no sulfuroso DAE (52.8%).

Además, TAmes se relaciona con la carcinogenicidad (Cg), el cual es un criterio de valoración toxicológico para analizar la capacidad de un compuesto bioactivo de

dañar el genoma humano o interrumpir los procesos metabólicos celulares (Xiong y col., 2021). Los resultados predictivos para Cg (cuadro 6) se obtuvieron mediante un consenso de las plataformas informáticas ADMETLab 3.0 y PASS ONLINE, en donde todos los compuestos bioactivos exhibieron una probabilidad moderada, siendo las siguientes: DAS 47.15%, ALN 44%, DADS 41.5% y AM 33.4%, valores similares al control estructural no sulfuroso DAE (67.3%). En este caso, la sustitución SxO en el binomio DAS/DAE disminuyó apreciablemente la Cg.

9.5.5 Evaluación *in silico* del predictivo de hemotoxicidad y anemia de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

Los compuestos bioactivos: AM, DAS, DADS, ALN y el control estructural no sulfuroso DAE fueron evaluados por medio de la plataforma ADMETLab 3.0 y PASS ONLINE (acceso: septiembre 2024), con el objetivo de predecir la capacidad de producir hemotoxicidad y anemia (cuadro 6).

La hemotoxicidad se refiere a la capacidad de un compuesto bioactivo para causar la destrucción de las células eritrocitarias, lo que puede originar enfermedades como la anemia (Benz y Schiff, 2017). Esta condición se caracteriza por una variedad de síntomas, incluyendo fatiga, debilidad, palidez, mareos, dificultad para respirar y taquicardia (Benzi y Schiff, 2017). En casos severos, la reducción extrema de eritrocitos puede causar una insuficiencia de oxígeno en los tejidos y órganos, lo que puede llevar a la muerte del individuo afectado (Benz y Schiff, 2017).

Los resultados predictivos para hemotoxicidad se obtuvieron mediante un consenso de las plataformas informáticas ADMETLab 3.0 y PASS ONLINE (cuadro 6).

El compuesto bioactivo AM, presentó un valor predictivo alto de ser hemotóxico (71.6%); sin embargo, el DAS exhibió una probabilidad moderada del 30.4%, una predicción similar al control estructural no sulfuroso DAE (30.9%). Por otra parte, los compuestos DADS y ALN presentaron valores predictivos bajos, 20.25% y 1.2 %, respectivamente.


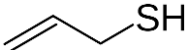
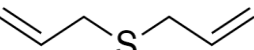
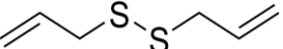
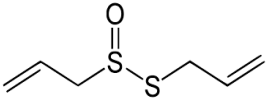
Asimismo, el valor predictivo sobre la capacidad de los compuestos bioactivos para generar anemia (cuadro 6), indicó una predicción alta (79%) para el compuesto AM, similar al mostrado por el control estructural no sulfuroso DAE (76%), mientras que los compuestos bioactivos DAS y DADS, presentaron una probabilidad moderada del 54% y 47% respectivamente. Por último, el compuesto bioactivo ALN, presentó una probabilidad baja del 28%. Así, la sustitución SxO en el binomio DAS/DAE redujo ligeramente la capacidad de producir anemia de estos compuestos.

9.5.6 Evaluación *in silico* del predictivo genotóxico, embriotóxico y teratogénico de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

Los compuestos bioactivos: AM, DAS, DADS, ALN y el control estructural no sulfuroso DAE, fueron evaluados por medio de la plataforma PASS ONLINE (acceso: septiembre 2024), con la finalidad de predecir la capacidad de ser genotóxico, embriotóxico y teratogénico (cuadro 7).

La evaluación de la genotoxicidad se basa en la capacidad de un compuesto bioactivo para dañar el ADN celular, lo que puede conducir a mutaciones genéticas y potencialmente cáncer (Valbuena y col., 2020). Los predictivos establecieron una probabilidad moderada del 31.1% para el compuesto bioactivo DAS, ligeramente

Cuadro 7. Evaluación *in silico* de características toxicológicas de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Estructura	Predicción de características toxicológicas		
		Genotoxicidad (%)	Embriotoxicidad (%)	Teratogenicidad (%)
DAE		51.4 ●	67.6 ●	36.4 ●
AM		19.2 ●	53 ●	51.7 ●
DAS		31.3 ●	38.6 ●	36.4 ●
DADS		21.5 ●	45.6 ●	37.5 ●
ALN		13.6 ●	0 ●	0 ●

Parámetros calculados mediante PASS ONLINE.

Etiqueta semáforo, indica la clasificación de los valores de probabilidad de predicción para cada parámetro: ● baja (0-29%), ● moderada (30-69%), ● alta (70-100%).

menor pero cualitativamente similar al control estructural no sulfuroso DAE (51.4%). Sin embargo, para los compuestos bioactivos DADS, AM y ALN, la probabilidad fue baja, correspondiente al 21.5%, 19.2% y 13.6%, respectivamente.

La embriotoxicidad, por otro lado, se refiere a la capacidad de un compuesto bioactivo para interferir con el desarrollo embrionario normal, afectando la formación y crecimiento del feto, provocando potencialmente malformaciones o abortos (Valdés y col., 2018). Los resultados predictivos de embriotoxicidad (cuadro 7), se clasificaron como moderados para los compuestos bioactivos AM (53%), DADS (45.6%) y DAS (38.6%), los cuales fueron ligeramente inferiores, pero cualitativamente similares al control estructural no sulfuroso DAE con el 67.6%. En estos análisis, la probabilidad de embriotoxicidad para el compuesto ALN fue prácticamente nula (0%).

La teratogenicidad, a su vez, describe la capacidad de un compuesto bioactivo para causar anomalías congénitas graves durante el desarrollo fetal (Valdés y col., 2018). El resultado predictivo de teratogenicidad (cuadro 7), mostró que los compuestos bioactivos AM, DADS y DAS, presentan una probabilidad moderada del 51.7%, 37.5% y 36.4%, respectivamente, similar al control estructural no sulfuroso DAE (36.4%). De forma similar a la embriotoxicidad, la ALN exhibió una probabilidad nula de teratogénesis (0%).

9.5.7 Evaluación *in silico* de reglas de toxicóforo de los compuestos bioactivos de *A. sativum*

La potencial toxicidad de un compuesto bioactivo puede ser inducida por la fracción de toxicóforo presente en su estructura (Singh y col., 2016). Hasta la fecha,

una de las metodologías más utilizadas para identificar y estimar toxicóforos son los enfoques computacionales (Singh y col., 2016).


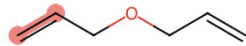

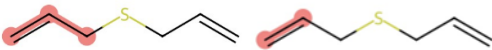
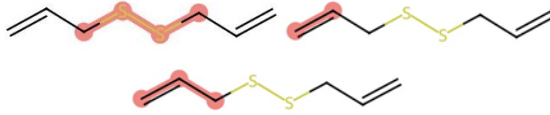
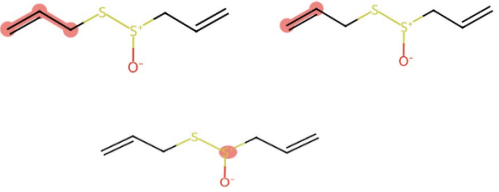
Al evaluar las reglas de toxicóforo (cuadro 8), no existieron alertas para los compuestos bioactivos AM, DAS, DADS y ALN que indicaran subestructuras que puedan causar toxicidad aguda (TA), mismo caso para carcinogénesis no genotóxica (Cg no Gt) y para carcinogénesis genotóxica (Cg Gt). No obstante, en este último parámetro, se observó una alerta para el control estructural no sulfuroso DAE, correspondiente a la subestructura: alcohol alílico (C₃H₆O). Respecto a las alertas para riesgo tóxico, todos los compuestos bioactivos de *A. sativum* presentaron una alerta para la subestructura: propileno (C=CC), de igual manera con la subestructura etileno (C=C), aunque en este caso el control estructural no sulfuroso DAE presentó la misma alerta. Además, para los compuestos bioactivos AM, DADS y ALN, se anexó una alerta más, correspondiente al metanotiol (CS), dimetil disulfuro (CSSC) y azufre (S), respectivamente.

9.6. Evaluación *in silico* de las vías de señalización asociadas a toxicidad de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Los compuestos bioactivos: AM, DAS, DADS, ALN y el control estructural no sulfuroso DAE, fueron evaluados por medio de la plataforma ADMETLab 3.0 con la finalidad de predecir las vías de señalización asociadas a toxicidad (acceso: septiembre 2024; cuadro 9).

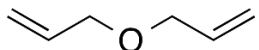
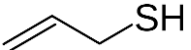
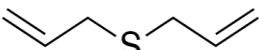
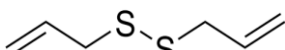
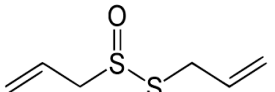
Las vías de señalización celular están involucradas en la regulación de la toxicidad, permitiendo que las células interpreten y respondan a señales externas e

Cuadro 8. Evaluación *in silico* de reglas de toxicóforo de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Reglas de toxicóforo						
Compuesto	TA	Cg no Gt	Cg Gt	Grupos funcionales asociado a Cg Gt	Riesgo tóxico	Grupo funcional asociado a riesgo tóxico
DAE	0	0	1 alerta		1 alerta	
AM	0	0	0		3 alertas	
DAS	0	0	0		2 alertas	
DADS	0	0	0		3 alertas	
ALN	0	0	0		3 alertas	

Parámetros calculados por ADMETLab 3.0.

Cuadro 9. Evaluación *in silico* de vías de señalización asociadas a toxicidad de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Estructura	Predicción de activación de vías de señalización			
		PPAR-gamma (%)	FCT (%)	ERA (%)	p53 (%)
DAE		0 ●	0 ●	99 ●	0.1 ●
AM		0 ●	0.6 ●	20.1 ●	5.2 ●
DAS		0 ●	0 ●	98 ●	4.6 ●
DADS		0 ●	0.1 ●	2.2 ●	98.1 ●
ALN		0 ●	0 ●	5.2 ●	35.8 ●

PPAR-gamma: Receptor gamma activado por proliferador de peroxisoma; FCT: Factor de choque térmico; ERA: Elementos de respuesta antioxidante; p53: Supresor tumoral p53.

Etiqueta semáforo, indica la clasificación de los valores de probabilidad de predicción para cada parámetro: ● baja (0-29%), ● moderada (30-69%), ● alta (70-100%).

internas, asegurando la homeostasis y la adaptación a cambios en el entorno (Aydemir y col., 2024). Entre las vías más destacadas se encuentran: receptores activados por peroxisomas (PPAR-gamma) en el metabolismo de lípidos y la inflamación, factor de choque térmico (FCT) en la protección celular, elementos de respuesta antioxidante (ERA) contra el daño oxidativo y el supresor tumoral p53 (p53) en la prevención del cáncer (Shukla y col., 2012; Khoo y col., 2014; Aydemir y col., 2024).

Los resultados predictivos de activación para la vía PPAR-gamma (cuadro 9), presentaron una probabilidad baja, siendo del 0% para todos los compuestos bioactivos analizados y el control estructural no sulfuroso DAE. Referente a la probabilidad de activación para FCT, los compuestos presentaron una probabilidad baja, siendo esta del 0.6% para AM, 0.1% para DADS, y del 0% para el control DAE y los compuestos bioactivos DAS y ALN.

Al realizar la evaluación predictiva sobre ERA (cuadro 9), el control estructural no sulfuroso DAE presentó una probabilidad alta del 99%, similar a su análogo sulfuroso DAS (98%) y se observó una probabilidad baja para los compuestos bioactivos AM (20.1%), ALN (5.2%) y DADS (2.2%).

En el análisis predictivo sobre la activación de p53 (cuadro 9), una probabilidad mayor del 50% se considera indicativa de la capacidad del compuesto bioactivo por causar daño celular. En este contexto, el compuesto DADS destacó con una probabilidad alta del 98.1% de inducir tal activación. Por otra parte, el compuesto ALN presentó una probabilidad moderada del 35.8% y esta fue baja para los compuestos AM (5.2%) y DAS (4.6%), similar al control estructural no sulfuroso DAE (0.1%).

9.7. Evaluación *in vitro* de hemotoxicidad de compuestos bioactivos de *A. sativum* sobre eritrocitos humanos

El análisis *in vitro* de hemotoxicidad permite cuantificar los efectos tóxicos directos de compuestos bioactivos en eritrocitos humanos, situación que se manifiesta por la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y radicales libres (Mameri y col., 2021). Esto puede provocar una serie de cambios en la membrana, que incluyen peroxidación de lípidos, reducción de la deformabilidad (capacidad de los eritrocitos para cambiar su forma y adaptarse a diferentes condiciones del torrente sanguíneo), cambios en la morfología celular, fragmentación y hemólisis (Mameri y col., 2021).

Se determinó el grado de hemotoxicidad de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* y se comparó con el grado de hemotoxicidad del control estructural no sulfuroso DAE (figura 8). Los resultados indicaron que a las concentraciones de 0.1 a 0.75 mg/mL, el grado de hemotoxicidad en todos los compuestos bioactivos osciló entre 5.7% y 9.2%. Sin embargo, a una concentración de 1 mg/mL, el porcentaje de hemotoxicidad alcanzó el 16.4% para el AM y del 25.6% para el DADS, mostrando diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control estructural no sulfuroso DAE ($p < 0.05$). De igual forma los compuestos DAS, DADS y AM en concentración de 10 mg/mL presentaron hemotoxicidad del 100%, 31.6% y 31.5% respectivamente, siendo estadísticamente mayores en comparación del control estructural no sulfuroso DAE ($p < 0.05$). A la concentración de 100 mg/mL, los compuestos DAS y AM presentaron hemotoxicidad al 100%, mientras que el compuesto DADS presentó una hemotoxicidad significativamente menor ($p < 0.05$) del

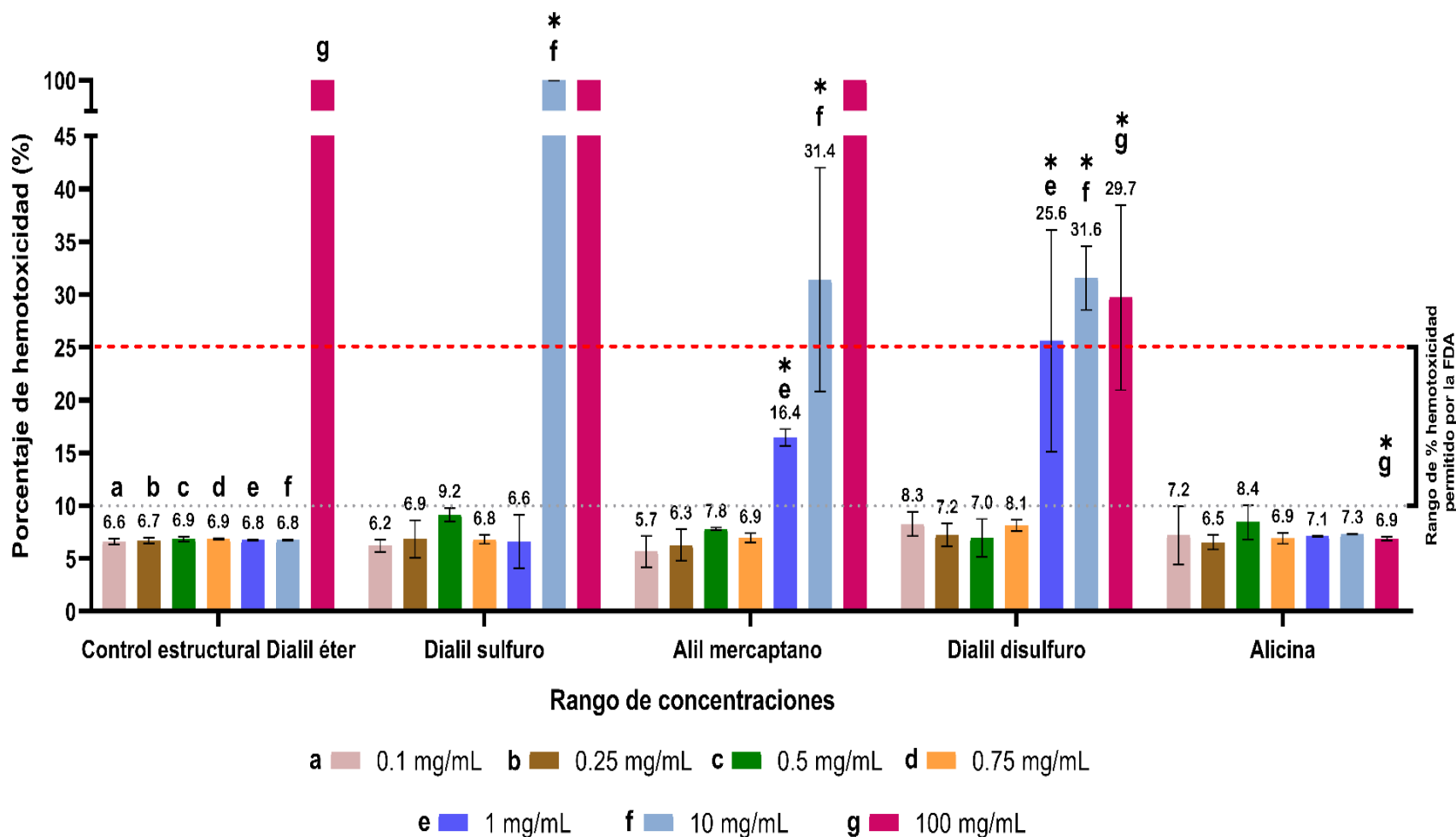


Figura 8. Evaluación *in vitro* de hemotoxicidad de compuestos bioactivos de *A. sativum* y del control estructural no sulfuroso dialil éter sobre eritrocitos humanos. Se presentan los porcentajes (%) de hemotoxicidad de los 4 compuestos bioactivos: DAS, AM, DADS y ALN, así como el control estructural DAE, a las concentraciones de 0.1, 0.25,

0.5, 0.75, 1, 10 y 100 mg/mL. Se muestra el límite inferior (10%, línea de segmentos pequeños) y superior (25%, línea de segmentos amplios) del rango de % hemotoxicidad (asociado a hemotoxicidad) permitido por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos de América. Valores hemotóxicos < 10% se consideran no hemotóxicos y valores > 25% se consideran hemotóxicos en eritrocitos humanos (Amin y Dannenfelser, 2006). * $p < 0.05$ al compararse con el control estructural no sulfuroso dialil éter.

29.71%, al compararse con el control estructural no sulfuroso DAE (100%). En forma interesante, la ALN no provocó hemotoxicidad significativa (<10%) aun en concentración de 100 mg/mL

9.8. Evaluación *in ovo* de embriotoxicidad y teratogénesis de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

La embriotoxicidad se refiere a los efectos adversos/tóxicos que las sustancias pueden tener sobre el embrión en desarrollo, teniendo la posibilidad de causar daños al material genético y en consecuencia inhibir el crecimiento (Peña, 2008; Rohwedel y col., 2001). La teratogénesis, por su parte, implica la inducción o producción de malformaciones en el embrión o feto en desarrollo debido a la interacción con teratógenos, que son sustancias o compuestos bioactivos capaces de causar defectos congénitos (Álvarez, 2011).

En el caso específico *A. sativum*, este bulbo aromático contiene diversos compuestos bioactivos como ALN, AM, DADS y DAS. Sin embargo, no se han encontrado estudios en la literatura que evalúen el efecto directo de los compuestos bioactivos aislados de *A. sativum* en el desarrollo embrionario y teratogénesis, por lo que es necesario llevar a cabo una evaluación exploratoria preclínica para comprender su impacto en el desarrollo embrionario y fetal. La evaluación *in ovo* permite evaluar tanto la embriotoxicidad como la teratogénesis de los compuestos bioactivos de *A. sativum* en etapas tempranas del desarrollo.

En el presente estudio, los criterios de valoración de embriotoxicidad consistieron en licuefacción de proteínas y no detección de latidos del corazón (Anexo 1) y para teratogenicidad: cianosis, gastrosquisis y malformaciones en cuerpo (Anexo 2).

Se determinó la tasa de embriotoxicidad *in ovo* de los compuestos bioactivos DAS, DADS, AM y ALN, así como del control estructural no sulfuroso DAE, a concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL. Para la concentración de 0.1 mg/mL (cuadro 10), la tasa de embriotoxicidad corregida (Abbott) en los 4 compuestos bioactivos evaluados fue del 9.09%, al igual que el control estructural no sulfuroso DAE. En tanto, a la concentración de 1 mg/mL (cuadro 11), se obtuvieron porcentajes de embriotoxicidad del 72.72% para ALN, 18.18% para DADS, 9.09% para el control estructural DAE y 0% para los compuestos bioactivos DAS y AM. Por último, a la concentración de 10 mg/mL (cuadro 12), la tasa de embriotoxicidad fue del 100% para ALN, 90.9% para DADS y AM, del 18.18% para el DAS y del 0% para el control estructural no sulfuroso DAE. En su conjunto, estos datos sugieren que la presencia de átomos de S provoca incrementos en la embriotoxicidad de estos compuestos.

En experimentos adicionales, se determinó el índice teratogénico Sheppard (ITS) a concentraciones de 0.1, 1 y 10 mg/mL. A la concentración de 0.1 mg/mL (cuadro 13) el compuesto DADS mostró un ITS del 18.18%, asociado a dos eventos teratogénicos específicos (gastrosquisis y malformaciones), mientras que los compuestos bioactivos AM, DAS y ALN, así como el control estructural no sulfuroso DAE presentaron un 0% de ITS. Estos resultados fueron estadísticamente menores ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control tratado con vancomicina (ITS = 100%).

Cuadro 10. Tasa de embriotoxicidad *in ovo* para la concentración de 0.1 mg/mL de los compuestos bioactivos de *A.*

sativum.

Compuesto	Tasas de embriotoxicidad <i>in ovo</i> por la administración del tratamiento (0.1 mg/mL)					
	# Embriones vivos	# Embriones muertos	# Embriones totales	Tasa de mortalidad (%)	Tasa de Natalidad (%)	Tasa de embriotoxicidad corregida (Abbott)
Control Atorvastatina	0	11	11	100% ^B	0%	---
Control salino	11	0	11	0% ^A	100%	---
DAE	10	1	11	9.09% ^A	90.90%	9.09%
AM	10	1	11	9.09% ^A	90.90%	9.09%
DAS	10	1	11	9.09% ^A	90.90%	9.09%
DADS	10	1	11	9.09% ^A	90.90%	9.09%
ALN	10	1	11	9.09% ^A	90.90%	9.09%

Diferentes letras en la misma columna representan significancia estadística (P <0.05).

Cuadro 11. Tasa de embriotoxicidad *in ovo* para la concentración de 1 mg/mL de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Tasas de embriotoxicidad por la administración del tratamiento (1 mg/mL)					
	# Embriones vivos	# Embriones muertos	# Embriones totales	Tasa de mortalidad (%)	Tasa de Natalidad (%)	Tasa de embriotoxicidad corregida (Abbott)
Control Atorvastatina	0	11	11	100% ^B	0%	---
Control salino	11	0	11	0% ^A	100%	---
DAE	10	1	11	9.09% ^A	90.90%	9.09%
AM	11	0	11	0% ^A	100%	0%
DAS	11	0	11	0% ^A	100%	0%
DADS	9	2	11	18.18% ^A	81.82%	18.18%
ALN	3	8	11	72.73% ^B	27.27%	72.73%

Diferentes letras en la misma columna representan significancia estadística (P <0.05).

Cuadro 12. Tasa de embriotoxicidad *in ovo* para la concentración de 10 mg/mL de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Tasas de embriotoxicidad por la administración del tratamiento (10 mg/mL)					
	# Embriones vivos	# Embriones muertos	# Embriones totales	Tasa de mortalidad (%)	Tasa de Natalidad (%)	Tasa de embriotoxicidad corregida (Abbott)
Control Atorvastatina	0	11	11	100% ^B	0%	---
Control salino	11	0	11	0% ^A	100%	---
DAE	11	0	11	0% ^A	100%	0%
AM	1	10	11	90.90% ^B	9.09%	90.90%
DAS	9	2	11	18.18% ^A	81.81%	18.18%
DADS	1	10	11	90.90% ^B	9.09%	90.90%
ALN	0	11	11	100% ^B	0%	100%

Diferentes letras en la misma columna representan significancia estadística ($P < 0.05$).

Cuadro 13. Teratogénesis y criterios sistemáticos *in ovo* para la concentración de 0.1 mg/mL de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Teratogenicidad <i>in ovo</i> por la administración del tratamiento (0.1 mg/mL)					
	Índice Teratogénico Sheppard (%)	Embriones Sanos (%)	# Embriones Totales	Criterios de valoración		
				Cianosis (%)	Gastrosquisis (%)	Malformaciones (%)
Control vancomicina	11 (100%) ^B	0	11	0	0	11 (100%)
Control NaCl	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0
DAE	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0
AM	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0
DAS	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0
DADS	2 (18.18%) ^A	9 (81.82%)	11	0	1 (9.09%)	1 (9.09%)
ALN	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0

Diferentes letras en la misma columna representan significancia estadística (P <0.05).

Los resultados para la concentración de 1 mg/mL (cuadro 14), indican que el compuesto DAS mostró un ITS del 18.18%, asociado a dos eventos teratogénicos específicos (cianosis y malformaciones). Por su parte, los compuestos DADS, ALN y el control estructural no sulfuroso DAE presentaron un ITS del 9.09% respectivamente, asociado a un evento teratogénico común (gastrosquisis). Asimismo, el compuesto AM presentó un 0% de ITS. Estos resultados fueron estadísticamente menores ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control tratado con vancomicina.

En la concentración de 10 mg/mL (Cuadro 15), el compuesto AM y el control estructural no sulfuroso DAE, presentaron un ITS del 9.09%, asociado a un evento teratogénico común: cianosis. Los compuestos bioactivos DAS, DADS y ALN presentaron 0% de ITS. En general, estos datos fueron estadísticamente menores ($p < 0.05$) en comparación con el grupo control tratado con vancomicina.

Posteriormente, se calculó la Concentración Letal 50 (CL50) para embriotoxicidad y la Concentración Efectiva 50 (CE50) para teratogenicidad, utilizando los resultados de la tasa de embriotoxicidad corregida de Abbott y el ITS. Además, se determinó el Potencial Teratogénico (PT) de los compuestos bioactivos evaluados (Cuadro 16), revelando un alto potencial teratogénico ($PT > 1$) para DAS (2.54) y muy alto para el control estructural no sulfuroso DAE (32.47), mientras que DADS (0.16), AM (0.04) y ALN (0.01) presentaron un bajo potencial teratogénico ($PT < 1$). En estos casos, la sustitución SxO en el binomio DAS/DAE redujo el potencial teratogénico, donde la ALN mostró el menor efecto

Cuadro 14. Teratogénesis y criterios sistemáticos *in ovo* para la concentración de 1 mg/mL de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Teratogenicidad <i>in ovo</i> por la administración del tratamiento (1 mg/mL)					
	Índice Teratogénico Sheppard (%)	Embriones Sanos (%)	# Embriones Totales	Criterios de valoración		
				Cianosis (%)	Gastrosquisis (%)	Malformaciones (%)
Control vancomicina	11 (100%) ^B	0	11	%	0%	11 (100%)
Control NaCl	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0
DAE	1 (9.09%) ^A	10 (90.91%)	11	0	1 (9.09%)	0
AM	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0
DAS	2 (18.18%) ^A	9 (81.82%)	11	1 (9.09%)	0	1 (9.09%)
DADS	1 (9.09%) ^A	10 (90.91%)	11	0	1 (9.09%)	0
ALN	1 (9.09%) ^A	10 (90.91%)	11	0	1 (9.09%)	0

Diferentes letras en la misma columna representan significancia estadística (P <0.05).

Cuadro 15. Teratogénesis y criterios sistemáticos *in ovo* para la concentración de 10 mg/mL de los compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Teratogenicidad <i>in ovo</i> por la administración del tratamiento (10 mg/mL)					
	Índice Teratogénico Sheppard (%)	Embriones Sanos (%)	# Embriones Totales	Criterios de valoración		
				Cianosis (%)	Gastrosquisis (%)	Malformaciones (%)
Control vancomicina	11 (100%) ^B	0	11	%	0%	11 (100%)
Control salino	0 ^A	11 (100%)	11	0	0	0
DAE	1 (9.09%) ^A	10 (90.91%)	11	1 (9.09%)	0	0
AM	1 (9.09%) ^A	10 (90.91%)	11	1 (9.09%)	0	0
DAS	0 ^A	11(100%)	11	0	0	0
DADS	0 ^A	11(100%)	11	0	0	0
ALN	0 ^A	11(100%)	11	0	0	0

Diferentes letras en la misma columna representan significancia estadística (P <0.05).

Cuadro 16. Integración de resultados de embriotoxicidad y teratogénesis *in ovo* de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*.

Compuesto	Integración de resultados embriotoxicidad y teratogénesis		
	CL ₅₀ mg/kg	CE ₅₀ mg/kg	Potencial teratogénico
DAE	982.10	30.24	32.47
AM	3.71	82.82	0.04
DAS	45.54	18.13	2.51
DADS	2.59	15.96	0.16
ALN	0.47	46.90	0.01

CL₅₀: Dosis letal para producir embriotoxicidad en el 50% de la población.

CE₅₀: Concentración efectiva para producir teratogénesis en el 50% de la población.

X. DISCUSIÓN

Los compuestos bioactivos del ajo como AM, DAS, DADS y ALN poseen múltiples propiedades y usos en la salud humana (Madariaga y col., 2020). No obstante, es imperativo conocer y caracterizar sus efectos adversos/tóxicos de una forma sistemática para proporcionar datos de referencia para su uso racionalizado para fines preventivos y terapéuticos en una amplia gama de entidades tanto infecciosas como crónico-degenerativas (Venkatesan y Ramanathan, 2017). En el presente trabajo, se realizó una evaluación de los compuestos mencionado a niveles bioinformáticos (*in silico*) y experimentales (*in vitro*, *in ovo*) (Worth y col., 2014). De esta forma, es importante destacar y detallar implicaciones relevantes relacionadas con los resultados que se generaron en el presente trabajo (Worth y col., 2014).

En relación con los análisis farmacocinéticos predictivos, en la investigación reportada por Hoshino y col. (2001), se evaluaron los efectos de los compuestos bioactivos organosulfurados: ALN, aliína y alil cisteína (40 mg/sitio), presentes en las preparaciones de *A. sativum* crudo en polvo, sobre la mucosa gastrointestinal de perros machos adultos Beagle. Se observaron cambios significativos en la mucosa estomacal, enrojecimiento y erosión similar a una úlcera, provocando la pérdida de células epiteliales en las criptas y aspecto irregular en los pliegues, así como congestión del íleon, cuando el contenido de ALN se aumentó a > 8 mg (Hoshino y col., 2001). Además, Amagase y col. (2001) reportaron que las reacciones adversas gastrointestinales en humanos pueden atribuirse a un exceso de los compuestos bioactivos organosulfurados liposolubles (ALN, DADS, DAS, AM), mientras que los compuestos bioactivos solubles en agua (cisteína y aliína) pueden presentar una

menor toxicidad en las preparaciones de *A. sativum*. En nuestra investigación, los compuestos bioactivos analizados: ALN, AM, DADS y DAS que son solubles en aceite y pese a presentar una AGI de moderada a alta, son susceptibles a generar efectos adversos si son consumidos por vía oral, situación que además podría afectar su biodisponibilidad en torrente sanguíneo.

Por otro lado, durante el embarazo, la disminución de proteínas plasmáticas aumenta la fracción no unida de compuestos bioactivos, lo que puede alterar su unión a receptores y respuesta terapéutica (Tasnif y col., 2016). En especial, compuestos bioactivos con alta afinidad (>80%) son particularmente sensibles a cambios en la UPP, ya que pequeñas variaciones pueden significativamente alterar la concentración libre y aumentar el riesgo de nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y otros efectos adversos (Tasnif y col., 2016). Las evaluaciones *in silico* realizadas revelan que los 4 compuestos bioactivos evaluados presentan UPP de moderada a alta, con porcentajes que oscilan entre 45% y 77%, indicando que la fracción libre de los compuestos bioactivos puede aumentar durante el embarazo. Esto puede intensificar su interacción con receptores y tejidos para, consecuentemente, aumentar el riesgo de efectos adversos y toxicidad en las mujeres embarazadas (Tasnif y col., 2016). Por lo tanto, es crucial realizar una evaluación exhaustiva del riesgo de toxicidad fetal y materna, determinar las dosis seguras y efectivas, así como considerar posibles interacciones con otros productos herbales, medicamentos y condiciones de salud preexistentes durante el embarazo (Tasnif y col., 2016).

En lo relacionado a la penetración a través de la BHE, los compuestos bioactivos derivados de plantas también pueden tener efectos secundarios no deseados en el

sistema nervioso central o interferir con otros compuestos administrados concomitantemente, ya que también pueden interactuar con proteínas funcionales que se encuentran en la barrera hematoencefálica (Fricker., 2008). En un estudio publicado por Satsantitham y col. (2024), se evaluó la capacidad de la ALN para cruzar la barrera hematoencefálica. Esta investigación se basó en resultados previos obtenidos mediante SwissADME, que sugirió que la ALN tiene propiedades permeantes a esta barrera. Para probar esa hipótesis, los investigadores implementaron un modelo *in vitro* de células endoteliales microvasculares cerebrales humanas (hCMEC/D3) (Satsantiham y col., 20024). Sus resultados confirmaron que ALN puede atravesar la barrera hematoencefálica, encontrando además que concentraciones superiores a 5 µg/mL son tóxicas, generando cambios morfológicos significativos en las células, llevando al proceso de apoptosis y muerte celular (Satsantiham y col., 20024). Nuestros resultados predictivos utilizando la plataforma ADMETLab 3.0 revelan una concordancia con la predicción previa de SwissADME, indicando que la ALN tiene una alta probabilidad (91.7%) de atravesar la barrera hematoencefálica, dato que se confirma con los resultados reportados en el reciente estudio mencionado (Satsantiham y col., 20024). Esto respalda la validez de nuestro enfoque predictivo y, además, nuestro análisis sugiere que DAS también tiene una alta probabilidad (91.5%) de cruzar la barrera hematoencefálica, lo que sugiere que podría tener un comportamiento similar a ALN en términos de permeabilidad y potencial toxicidad (Satsantiham y col., 20024).

Con respecto al bombeo extracelular de los compuestos bioactivos del ajo evaluados, la ausencia de interacción con la PgP puede tener implicaciones críticas

durante el embarazo, ya que la PgP en la placenta protege al feto transportando sustratos potencialmente teratogénicos de regreso a la circulación materna (Daud y col., 2015). Sin esta barrera protectora, la exposición fetal a teratógenos puede aumentar significativamente, especialmente cuando se combinan con otros sustratos o inhibidores de la PgP, lo que puede potenciar el riesgo de anomalías congénitas y efectos adversos fetales en una relación dosis-dependiente (Daud y col., 2015). Aquí destaca la importancia de considerar la interacción fármaco-P-gp en la evaluación de la seguridad durante el embarazo (Daud y col., 2015). Nuestro estudio predictivo sobre los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*, establecen una probabilidad de ser sustrato < 6.8%, en concordancia a la investigación de Daud y col. (2015), que establece la relevancia de interactuar con PgP para evitar el ingreso de compuestos nocivos a placenta, lo cual implicaría que los bioactivos AM, DAS, DADS y ALN pueden alcanzar concentraciones más altas en circulación del producto y por ende aumentar el riesgo de toxicidad y daño fetal.

En cuanto a la vida media de los compuestos bioactivos de *A. sativum* en el organismo, la evaluación *in silico* de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* mostró un $T_{1/2}$ bajo, entre 1-2 horas. Esto sugiere que la administración o frecuencia de uso puede requerir ajustes para alcanzar una concentración plasmática efectiva y evitar concentraciones altas innecesarias, como se ha reportado en la literatura (Smith y col., 2017). Sin embargo, estos ajustes de dosificación o frecuencia de uso plantean desafíos para la eficacia, seguridad y cumplimiento del tratamiento, ya que la fluctuación en la concentración del compuesto bioactivo puede aumentar el riesgo de sobreexposición y efectos adversos (Smith y col., 2017).

En lo referente a la eliminación vía renal de los compuestos bioactivos evaluados, la medicina tradicional anualmente ha experimentado un aumento alarmante en los informes de reacciones adversas, especialmente en poblaciones rurales donde el uso combinado de productos herbales es común (Jha, 2010). Aquí destaca como una de las principales consecuencias de su uso la nefrotoxicidad, caracterizada por lesiones tubulares renales graves, inflamación, degeneración y necrosis, que compromete la depuración renal de compuestos bioactivos y aumenta el riesgo de intoxicación (Jha, 2010; Xu y col., 2020). En nuestra investigación *in silico*, los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*, presentaron valores predictivos moderados de DR (10.78 a 11.59 mL/min/kg). Sin embargo, en poblaciones vulnerables, como aquellas con preexistencia de enfermedades renales, la DR de estos compuestos bioactivos disminuye. Esto puede conducir a una bioacumulación y, posteriormente, a daño celular adicional, lo que puede acelerar la progresión de la enfermedad renal y exacerbar su gravedad (Mishra y col., 2022). Lo anterior constituye un punto importante que puede limitar el uso de bioactivos sulfurosos del ajo en poblaciones con condiciones renales especiales.

Otro aspecto del metabolismo de xenobióticos es su interacción con enzimas del complejo citocromo P450. Nuestros resultados predictivos revelan que los compuestos bioactivos AM, DAD, DADS y ALN inhiben CYP1A2, con una probabilidad superior al 49.9%. Este hallazgo es particularmente relevante, ya que el CYP1A2 juega un papel crucial en el metabolismo de diversas sustancias endógenas clave, como melatonina, bilirrubina, uroporfirinógeno, estrógenos y ácido araquidónico (Zhou y col., 2009). La inhibición de este enzima ha sido asociada con un aumento en el riesgo de

desarrollar enfermedades como trastornos del sueño, depresión, ansiedad, ictericia, cirrosis hepática, porfiria cutánea, cáncer de mama, útero y próstata, endometriosis, osteoporosis, enfermedad de Alzheimer, Parkinson y esclerosis múltiple (Zhou y col., 2009). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que el uso de estos compuestos bioactivos podría tener implicaciones directas en el desarrollo de enfermedades asociadas con la inhibición del metabolismo de sustancias endógenas (Zhou y col., 2009).

En el mismo sentido, la inhibición de la enzima CYP2C9 se asocia con una reducción significativa en la síntesis de factores hiperpolarizantes derivados del endotelio (EDF), moléculas clave para la relajación vascular, especialmente en arterias de tamaño resistente, donde regulan el flujo sanguíneo tisular (Campbell y Gauthier, 2002; Ercan y col., 2008). Nuestros resultados revelan que los compuestos bioactivos DADS y DAS presentan una probabilidad alta a moderada (99.1% y 60.7%) de inhibir el CYP2C9, lo que podría tener implicaciones cardiovasculares significativas. Específicamente, esta inhibición podría conducir a un aumento de la resistencia vascular y la presión arterial, así como a una disminución del flujo sanguíneo, comprometiendo la oxigenación y el suministro de nutrientes a los tejidos (Campbell y Harder, 1999; Wang y col., 2021). Por lo tanto, es fundamental evitar combinar estos compuestos bioactivos con remedios caseros o bebidas hipertensivas, como efedra, café y matcha, debido al riesgo de daño irreversible en órganos vitales como el corazón, riñones y cerebro (Willis y col., 2006; Surma y Oparil, 2021; Willems y Foster, 2024). Por el contrario, otros derivados como la ALN que en estos estudios mostraron una baja probabilidad de inhibir a CYP2C9 (1.4%) han mostrado efectos favorables en

modelos de patología renal experimental, similares a los observados con hipotensores de uso clínico como el losartan (García-Trejo y col., 2017).

Durante el embarazo, la madre es la principal proveedora de ácidos grasos esenciales para el desarrollo y crecimiento del embrión (Higa y Jawerbaum, 2013). En este proceso, el CYP2C19 desempeña un papel fundamental al metabolizar los ácidos grasos poliinsaturados, específicamente transformando el ácido linoleico y linolénico en ácidos grasos de alta importancia biológica, como el ácido araquidónico, eicosapentaenoico y docosahexaenoico (Valenzuela y col., 2014). Nuestros resultados predictivos revelan que los compuestos DADS, DAS y ALN inhiben fuertemente al CYP2C19 (100%, 99% y 96.4%, respectivamente). Esta inhibición puede tener consecuencias graves en la salud fetal y materna, ya que la deficiencia de ácidos grasos esenciales puede provocar malformaciones congénitas, problemas visuales y cognitivos, y restricción del crecimiento fetal (Higa y Jawerbaum, 2013).

La enzima CYP2D6 juega un papel crucial en la inactivación del ácido retinoico y según un estudio publicado por Fukami y col. (2010), reveló que la deficiencia de CYP2D6 puede llevar a un metabolismo aberrante del ácido retinoico, lo que a su vez puede causar anomalías anorrectales y urinarias en humanos. En nuestro estudio, hemos identificado que el compuesto DAS tiene un 71% de probabilidad de ser un inhibidor del citocromo CYP2D6. Nuestros resultados sugieren que la exposición a DAS puede alterar la regulación del ácido retinoico, aumentando el riesgo de teratogénesis, por lo que se recomienda evitar el uso de remedios o formulaciones ricas en ajo en mujeres gestantes, y realizar estudios de corroboración biológica para confirmar estos hallazgos y evaluar su impacto en el desarrollo embrionario.

De la misma forma, nuestros resultados revelan que los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* exhiben un alto potencial como inhibidores de la enzima CYP3A4, con una probabilidad superior al 54.4%. Esto es particularmente relevante, considerando que la alteración del metabolismo de la testosterona, catalizada por CYP3A4, se ha relacionado con un mayor riesgo de enfermedad cardiovascular, caracterizada por cambios en los niveles de colesterol, inflamación y disfunción endotelial (Zhou y col., 2009). Nuestros hallazgos sugieren una posible asociación entre la inhibición del CYP3A4 y el aumento del riesgo cardiovascular, lo que subraya la importancia de considerar los efectos potenciales de estos compuestos bioactivos en la generación de enfermedades como hipertensión arterial, arritmia cardíaca, insuficiencia cardíaca e infarto agudo al miocardio entre otras.

En lo que respecta a la posible metabolización de los compuestos bioactivos tipo tioalil del ajo por enzimas tipo CYP450, el uso simultáneo de múltiples remedios caseros es una práctica común en la medicina tradicional para abordar diversas afecciones, lo que puede generar interacciones complejas entre compuestos activos y potenciar riesgos para la salud. En particular, los adultos mayores están expuestos a un mayor riesgo debido a cambios fisiológicos asociados con la edad y a una tasa alta de polifarmacia (Mora y Galindo, 2014). Por ejemplo, los flavonoides, compuestos bioactivos presentes en plantas como el té (*Camellia sinensis*), la manzanilla (*Matricaria chamomilla*) y la ortiga (*Urtica dioica*), han sido utilizados durante siglos para tratar diversas condiciones, incluyendo inflamaciones y enfermedades cardiovasculares (Franco y col., 2020; Li y col., 2023; Tarasevičienė y col., 2023). Sin embargo, estos compuestos pueden inhibir las enzimas CYP450, lo que puede

afectar el metabolismo de compuestos bioactivos y aumentar el riesgo de reacciones adversas (Hodek y col., 2002; Deodhar y col., 2020). Nuestro estudio *in silico* identificó una alta probabilidad (>85%) de interacción como sustrato entre los compuestos bioactivos y las enzimas CYP450, específicamente: ALN, DAS y DADS con CYP1A2 y CYP2C9, ALN con CYP2C19, y todos los compuestos (AM, ALN, DADS y DAS) con CYP2D6. Esto sugiere que el uso simultáneo de remedios caseros que contienen flavonoides puede inhibir la actividad de las enzimas CYP450, lo que reduce el metabolismo de los compuestos bioactivos de *A. sativum* y aumenta su concentración plasmática, incrementando así el riesgo de efectos adversos.

La evaluación *in silico* de 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* según criterios de Lipinski y PAINS reveló un gran potencial farmacológico ya que no existen violaciones o alertas estructurales sobre estructuras inestables relacionadas a una selectividad deficiente (Ion y Nitulescu, 2019). Al cumplir con la regla de Lipinski, estos compuestos probablemente presentarán buena absorción intestinal, permeabilidad celular y distribución tisular, lo que puede aumentar su concentración y exposición en los sitios de acción (Lipinski y col., 2001; Di y col., 2020). Sin embargo, esto también puede incrementar el riesgo de toxicidad debido a interacciones no específicas con proteínas y receptores, inhibición enzimática y respuestas oxidativas (Huth y col., 2007). El análisis predictivo Brenk que se practicó en este trabajo identificó estructuras químicas problemáticas, como el alqueno aislado y el grupo disulfuro; esto se combina con nuestros resultados sobre la BHE que revela una alta probabilidad (>91%) de acceso de ALN y DAS al sistema nervioso central, respaldados por el estudio de Satsantitham y col. (2024) que demostró la permeabilidad de ALN a través de la BHE.

De manera específica, el alqueno aislado puede inducir disfunción en la terminal nerviosa y contribuir a enfermedades neurodegenerativas al formar aductos con los tiolatos de sulfhidrilo de los residuos de cisteína en las proteínas presinápticas, como NSF (N-ethylmaleimide-Sensitive Factor) y SNAP-25 (Synaptosomal-Associated Protein), a través de reacciones de tipo Michael, alterando su estructura, función y desencadenando procesos neurotóxicos que pueden llevar a enfermedades como Alzheimer, Parkinson y esclerosis lateral amiotrófica (LoPachin y col., 2014). Adicionalmente, el metabolismo del alqueno mediado por la mieloperoxidasa puede generar clorohidrinás que pueden biotransformarse posteriormente en metabolitos reactivos modificadores del ADN y de proteínas, contribuyendo a la carcinogenicidad (Zhang y Elfarra, 2017). Por otro lado, los metabolitos del grupo disulfuro exhiben citotoxicidad significativa en hepatocitos, agotando el glutatión intracelular y alterando la homeostasis del calcio, lo que plantea preocupaciones sobre la seguridad humana, especialmente en relación con la posible toxicidad hepática y alteraciones en la homeostasis celular (Jatoo y col., 1988).

En la evaluación *in silico* del índice predictivo de hepatotoxicidad, el compuesto AM mostró una probabilidad alta de hepatotoxicidad (88.1%). Aunque no existen estudios *in vitro* o *in vivo* sobre la hepatotoxicidad de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* aislados, un caso reportado por Shaikh y col. en 2017 proporciona un punto de referencia sobre el primer caso de hepatotoxicidad registrado en una persona con antecedentes de trasplante hepático ortotópico y síndrome hepatopulmonar. En este caso, el paciente recibió dosis altas de Garlicin Cardio® vía oral (6 tabletas diarias, cada una con 3.2 g de ALN por un período de 7 días) y posteriormente, presentó

resultados anormales en las pruebas de función hepática, con niveles elevados de ALT (alanina aminotransferasa) y fosfatasa alcalina. La suspensión del tratamiento y la biopsia hepática revelaron una reacción colestásica periportal leve, sugiriendo una posible etiología inducida por el suplemento dietético. Nuestro análisis indica que el compuesto bioactivo AM, resultado de la descomposición de la ALN por la enzima alinasa en el tracto gastrointestinal, puede ser el responsable de la hepatotoxicidad observada en el caso clínico reportado por Shaikh y col. (2017), lo que sugiere una correlación entre nuestro modelo predictivo y el evento clínico observado.

Sobre estudios previos que hayan evaluado TR *in vivo*, *in vitro* o *in silico* de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* evaluados en este trabajo, se carece de antecedentes directos. Sin embargo, un estudio reciente de Kamal y col. (2023), investigó los efectos nefropulmonares y nefrológicos del extracto acuoso de *A. sativum* en ratas albinas hembras preñadas sanas. Mediante cromatografía, se identificaron 20 compuestos bioactivos distintivos, incluyendo sulfuros derivados de la degradación de la ALN. Los resultados mostraron que la administración de 1 mL/rata/día desde el día 6 hasta el 19 de gestación indujo manifestaciones histopatológicas graves en tejidos fetales y maternos del riñón y pulmón, caracterizadas por necrosis renal, hemorragia pulmonar, congestión severa y engrosamiento de los vasos sanguíneos.

En el mismo sentido, nuestro análisis predictivo sugiere que los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* tienen un alto potencial de TR (>71.2-99.4%). Considerando la presencia de una variedad de compuestos organosulfurados en los extractos acuosos, es crucial realizar futuras evaluaciones toxicológicas *in vitro* o *in vivo* para

determinar si la toxicidad se asocia específicamente con uno o más compuestos bioactivos aislados y si está relacionada con la concentración de los mismos.

Por otra parte, nuestros análisis predictivos sobre TOAR revelan que los compuestos bioactivos AM (84.9%), ALN (77.5%) y DADS (74.4%) presentaron una toxicidad potencial alta, mientras que DAS (59.1%) mostró una toxicidad moderada, según el criterio de ADMETLab 3.0 para $DL_{50} < 500$ mg/kg para probabilidades $> 70\%$. De esta forma, los compuestos bioactivos mencionados se clasificarían oscilando entre la categoría 0 al 3 ($DL_{50} < 300$ mg/kg) y categoría 4 ($DL_{50} 300-2000$ mg/kg), de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (GHS) (Farrás y col., 2010; ONU-SGA, 2011).

Estos hallazgos son comparables con las fichas de seguridad de los compuestos bioactivos, que clasifican al AM como nocivo (categoría 4) y a ALN y DADS como tóxicos (categoría 3) en caso de ingestión (Fisher Scientific, 2023, 2024b). Por otro lado, el DAS presentó una DL_{50} de 2980 mg/kg, lo que no cumple con los criterios de clasificación como tóxico por vía oral (Fisher Scientific, 2024a, 2024c).

Con respecto a nuestros análisis predictivos de TAMES, estos revelaron que ALN tiene un alto riesgo (88.5%) de toxicidad y alteración del ADN, mientras que AM, DAS y DADS presentan un riesgo moderado (49.5-54.8%). En la predicción de Cg, todos los compuestos mostraron un riesgo moderado (33.4-47.15%). Un estudio previo realizado por Musk y col. (1997), demostró que DAS y DADS indujeron aberraciones cromatídicas y SCE (intercambios de cromátidas hermanas) en células *in vitro* de ovario de hámster chino, indicando daño en el ADN, especialmente a dosis altas (> 200 μ g/mL para DAS y > 10 μ g/mL para DADS), estableciendo que DAS y DADS son

carcinógenos potenciales. Considerando nuestros resultados predictivos y la evidencia experimental de Musk y col. (1997), es importante destacar que el consumo excesivo de *A. sativum* podría elevar los niveles de estos compuestos bioactivos a concentraciones perjudiciales, particularmente en mujeres embarazadas, donde los cambios hormonales y fisiológicos pueden ralentizar el metabolismo, aumentar la exposición a estos compuestos bioactivos y potenciar los efectos adversos.

Los resultados predictivos sobre hemotoxicidad y anemia indicaron que el compuesto bioactivo AM tiene una alta probabilidad (>70%) de inducir hemotoxicidad y anemia, mientras que DADS presentó una probabilidad moderada (30-60%), mientras que el DAS mostró una probabilidad moderada de generar exclusivamente anemia. En la literatura, se han reportado evaluaciones *in vivo* en modelos murinos que indican que el extracto de *A. sativum* puede inducir anemia hemolítica (Oboh, 2004). En perros, este extracto provoca una disminución en el recuento de eritrocitos, hematocrito y concentración de hemoglobina, además de aumentar la fragilidad osmótica e inducir hemólisis (Lee y col., 2000). No obstante, las implicaciones tóxicas de los compuestos bioactivos aislados de *A. sativum* en EH aún no se comprenden completamente. Para abordar esta laguna en el conocimiento, se propone realizar una validación *in vitro* sobre EH, con el fin de explorar más a fondo la precisión de las predicciones *in silico*.

En otras evaluaciones, los resultados predictivos muestran que DAS tiene una probabilidad moderada (31.1%) de ser genotóxico, en contraste con DADS, AM y ALN, que presentan probabilidades bajas (13.6-21.5%). La genotoxicidad de compuestos organosulfurados ha sido poco estudiada; sin embargo, estudios previos han arrojado

resultados contradictorios. Belloir y col. (2006), encontraron que ALN, DAS, DADS y AM no indujeron rupturas en el ADN en células HepG2 a concentraciones de 5-100 μM por un tiempo de exposición de 20 horas. En contraste, Arranz y col. (2007), reportaron que DAS y DADS no causaron daño al ADN a concentraciones bajas (1-50 μM y 1-5 μM , respectivamente), pero DADS mostró genotoxicidad a concentraciones más altas ($> 5 \mu\text{M}$) por un tiempo de exposición de 24 horas. Estos resultados destacan la importancia de considerar la concentración y el tiempo de exposición en la evaluación de la genotoxicidad. Nuestros análisis predictivos, que indican un riesgo moderado de genotoxicidad para DAS y un riesgo bajo para DADS, AM y ALN, deben considerarse en conjunto con estos hallazgos experimentales.

Asimismo, se ha establecido que el daño al ADN está asociado con anomalías en el desarrollo embrio-fetal y aumento de la mortalidad de embriones, lo que subraya la importancia de evaluar la seguridad de estos compuestos bioactivos (Sánchez-Argüello y col., 2012; Sogbanmu y col., 2016). Nuestros análisis predictivos revelan que los compuestos AM, DADS y DAS presentan un riesgo moderado de embriotoxicidad (38.6-53%) y teratogenicidad (36.4-51.7%), mientras que ALN muestra un riesgo nulo en ambos casos (0%). Dado el potencial riesgo genotóxico, embriotóxico y teratogénico de estos compuestos bioactivos se considera esencial investigar a fondo el impacto real y sus efectos en el desarrollo embrionario.

Los resultados predictivos sobre alertas para riesgo tóxico revelan que todos los compuestos bioactivos de *A. sativum* presentan alertas comunes relacionadas con las subestructuras de propileno (C=CC) y etileno (C=C). Según Filser y col. (2008), aunque el propileno no demostró ser cancerígeno en estudios a largo plazo en

roedores, su biotransformación en óxido de propileno mediante la enzima CYP2E1 plantea preocupaciones sobre su potencial riesgo cancerígeno, ya que el óxido de propileno puede alquilar macromoléculas, ser mutagénico y clastogénico directo e inducir tumores en roedores a altas concentraciones (>300 mg/kg). Por otra parte, el etileno a altas concentraciones (>20000 ppm) fue agudamente hepatotóxico en ratas y el óxido de etileno (producto del metabolismo del etileno por CYP2E1) está asociado a la alquilación directa de proteínas de unión a ARN y ADN, es mutagénico en células procariotas y eucariotas, es genotóxico, clastogénico, causa translocaciones hereditarias en células germinales de ratones expuestos y es cancerígeno en ratones y ratas (Filser y Klein, 2018).

En adición, los compuestos AM, DADS y ALN mostraron alertas adicionales específicas, correspondientes a metanotiol (CS), dimetil disulfuro (CSSC) y azufre elemental (S) respectivamente. En investigaciones previas, Shults y col. (1970), declararon el caso clínico de un hombre de 53 años el cual fue hospitalizado debido a un coma que apareció poco después de la exposición al metanotiol, en donde desarrolló anemia hemolítica grave y metahemoglobinemia, donde el mecanismo probable de la hemólisis fue el efecto oxidante del metanotiol en una persona con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa eritrocitaria (G-6-PD). El coma profundo persistió hasta la muerte, 28 días después de la exposición. Los estudios en modelos murinos revelan que el metanotiol induce toxicidad en el sistema nervioso central y en tejidos respiratorios; los efectos neurotóxicos incluyen inquietud, debilidad muscular progresiva, convulsiones, depresión respiratoria y cianosis, asociados con metahemoglobinemia (Shults y col., 1970). Además, en células epiteliales bronquiales

humanas (16HBE), el metanotiol induce citotoxicidad a concentraciones de 10-50 μM , mediante la generación de especies reactivas de oxígeno, activación del factor de necrosis tumoral, disminución del potencial de membrana mitocondrial y necrosis celular. (Lei y col., 2022).

Respecto al dimetil disulfuro, es una sustancia peligrosa cuyos efectos nocivos aumentan conforme se eleva la concentración de exposición por inhalación (>1% molar), provocando síntomas que van desde un mal sabor de boca, náuseas, vómitos, irritación de mucosas, ojos y piel, hasta necrosis, y en casos de sobreexposición, puede tener efectos sistémicos adicionales como depresión respiratoria y alteraciones del sistema nervioso central mortales, incluida la parálisis diafragmática y el coma (Demchuk y col., 2018). En tanto, el azufre elemental genera síntomas respiratorios y una disminución de la función pulmonar, efectos tóxicos que están influenciados por factores como la concentración, el tiempo de exposición y el estado redox de los organismos afectados (Četkauskaitė y col., 2004; Raanan y col., 2017).

En conjunto, estos hallazgos indican que los compuestos bioactivos de *A. sativum* pueden representar un riesgo para la salud humana debido a la presencia de subestructuras potencialmente tóxicas como propileno, etileno, metanotiol, dimetil disulfuro y azufre elemental que pueden inducir daño celular, oxidativo y genotóxico.

En relación con nuestro análisis predictivo sobre ERA, este revela que el compuesto bioactivo DAS tuvo una probabilidad alta (98%) de activar esta vía. La predicción de activación de ERA se corrobora con el estudio reportado por Egbujor y col. (2022), sobre compuestos organosulfurados derivados de *A. sativum* (alliina y DAS) que destaca el papel crucial del azufre en la activación de la vía de señalización

de Nrf2 (factor eritroide 2), inducida por daño celular y estrés oxidativo, mediante su reacción con grupos sulfhidrilo (-SH) y posterior unión a ERA, lo que induce la transcripción de genes antioxidantes como glutatión S-transferasa, superóxido dismutasa y catalasa; si esta inducción es excesiva conlleva a una desregulación de procesos oxido-reducción, que reduce la actividad metabólica de las células afectadas (Pérez-Torres y Rubio-Ruiz, 2017).

En cuanto al análisis predictivo sobre la activación de p53, este indica que el compuesto bioactivo DADS tiene una probabilidad alta (98.1%) de activarla. Esta predicción está en concordancia con el estudio previo de Yin y col. (2014), quienes mediante un ensayo MTT, demostraron que DADS redujo la viabilidad celular de manera dependiente de la dosis y el tiempo en el carcinoma de células escamosas del esófago, mostrando además citotoxicidad en células hepáticas normales, mediante detención de la fase G2/M debido a la disminución de ciclina en concomitancia con la activación de la vía p53. Lo anterior podría llevar a la generación de hepatopatías tóxicas como la hepatitis tóxica fulminante.

En general, las predicciones *in silico* realizadas sobre los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* (30 en total) indican que el compuesto DADS presenta un mayor número de parámetros asociados o que favorecen la toxicidad (12 parámetros), con probabilidades altas (70-100%) de exhibir tales características, según la evaluación de propiedades farmacocinéticas, interacciones con CYP450, características toxicológicas y vías de señalización; seguido de los compuestos bioactivos ALN y DAS (11 parámetros) (Cuadro 17). Por el contrario, el AM y la ALN

mostraron la mayor cantidad de parámetros favorables o potencialmente no tóxicos (14).

En este trabajo se realizaron evaluaciones *in vitro* empleando EH como entidades de referencia sobre hemotoxicidad y anemia. Después del contacto directo de los EH con los tratamientos de diferentes concentraciones (0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 10 y 100 mg/mL) de los compuestos bioactivos de *A. sativum* (AM, DAS, DADS y ALN), se observó una hemotoxicidad superior al 25% (límite bioseguro establecido por la FDA) en concentraciones de 10 y 100 mg/mL para DAS, AM y DADS, y adicionalmente en 1 mg/mL para DADS (Amin y Dannenfelser, 2006).

Al momento de redactar el presente trabajo, no se han reportado estudios sobre la actividad hemolítica en EH de los compuestos bioactivos aislados de *A. sativum*, por lo que se realizó la evaluación de toxicidad en células eritrocitarias. Sin embargo, nuestro estudio es comparable con la investigación *in vitro* reportada por Furdak y col. (2024), quienes evaluaron los efectos del extracto de *A. sativum* (rico en ALN y otros compuestos organosulfurados como AM, DAS y DADS) en EH. En dicho estudio, se observó que el extracto indujo la unión de la hemoglobina a la membrana de los EH, característica de la agregación de hemoglobina oxidada y desnaturalizada, y aumentó la fragilidad osmótica, lo que llevó a hemólisis de manera dosis-dependiente (CE50 65.9 mM). En adición, Munday y col. (2003), evaluaron el efecto de varios sulfuros alifáticos, incluyendo DAS y DADS, en un modelo murino. Sus resultados demostraron que los compuestos alilo, como DAS y DADS, tienen una mayor capacidad para generar peróxido de hidrógeno y causar daño oxidativo en eritrocitos, lo que puede inducir anemia hemolítica.

Cuadro 17. Integración de resultados predictivos de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*

EP CB	Propiedades farmacocinéticas						Inhibidor de subfamilias CYP450					Sustrato de subfamilias CYP450					Características toxicológicas						Vías de señalización				Distribución de parámetros						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	B	M	A
DAE	Red	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Red	Verde	Amarillo	Verde	Red	Amarillo	Red	Verde	Red	Verde	Red	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Red	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Verde	Red	Verde	Verde	11	10	9
AM	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Verde	Amarillo	Verde	Red	Verde	Red	Red	Red	Amarillo	Amarillo	Red	Red	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	14	10	6
DAS	Red	Red	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Red	Amarillo	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Verde	Amarillo	Red	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Amarillo	Red	Verde	Verde	Verde	8	11	11
DADS	Red	Amarillo	Red	Verde	Verde	Amarillo	Red	Red	Red	Verde	Red	Red	Red	Red	Red	Verde	Verde	Red	Red	Amarillo	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Red	Verde	Red	10	8	12
ALN	Red	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Amarillo	Verde	Red	Red	Verde	Amarillo	Red	Red	Red	Red	Red	Verde	Red	Red	Red	Amarillo	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Verde	Amarillo	14	5	11

Etiqueta semáforo: verde indica una probabilidad de 0-29%, amarillo indica una probabilidad de 30-69%, rojo indica una probabilidad de 70-100%

EP: Evaluación predictiva; CB: Compuesto bioactivo; DAE: Control estructural Dialil éter; Propiedades farmacocinéticas: 1. AGI, 2. UPP, 3. BHE, 4. Sustrato PgP, 5. T1/2, 6. DR; Inhibidor de subfamilias CYP450: 7. 1A2, 8. 2C9, 9. 2C19, 10. 2D6, 11. 3A4; Sustrato de subfamilias CYP450: 12. 1A2, 13. 2C9, 14. 2C19, 15. 2D6, 16. 3A4; Características toxicológicas: 17. HT, 18. TR, 19. TOAR, 20. Tames, 21. Cg, 22. Hemo, 23. Anemia, 24. Genotoxicidad, 25. Embriotoxicidad, 26. Teratogenicidad; Vías de señalización: 27. PPAR-Gamma, 28. FCT, 29. ERA, 30. p53

B: Número de parámetros con probabilidad baja (0- 29%), M: Número de parámetros con probabilidad moderada (30-69%), A: Número de parámetros con probabilidad alta (70-100%).

Las observaciones derivadas del presente trabajo sugieren que los compuestos bioactivos de *A. sativum* pueden representar un riesgo para la salud humana dependiente de la dosis, debido a su capacidad para inducir hemotoxicidad en eritrocitos humanos. Estos resultados tienen implicaciones importantes para la evaluación del riesgo-beneficio del uso de estos compuestos bioactivos en aplicaciones terapéuticas.

En lo referente a las evaluaciones toxicológicas en embriones de *G. gallus*, todos los compuestos bioactivos evaluados presentaron en al menos una concentración un criterio sistemático relacionado a embriotoxicidad o teratogénesis, considerando los datos del ensayo *in ovo* (cuadro 9-14), de aquí se calculó tanto la CL₅₀ embriotóxica como la CE₅₀ teratogénica (Cuadro 15), facilitando la ponderación de los efectos tóxicos en el desarrollo embrio-fetal.

Los resultados mostraron que los compuestos bioactivos con un valor de PT < 1 presentaron una mayor tendencia a inducir muerte embrionaria antes de que se produzcan defectos congénitos (Selderslaghs y col., 2009). En este sentido, se puede establecer una jerarquía de toxicidad embriotóxica entre los compuestos evaluados. En específico, el compuesto bioactivo más embriotóxico corresponde a la ALN (PT 0.01) con una CL₅₀ de 0.47 mg/kg, CE₅₀ de 46.90 mg/kg. En segundo lugar, AM (PT 0.04) con una CL₅₀ de 3.71 mg/kg, CE₅₀ de 82.82 mg/kg y en tercer lugar el DADS (PT 0.16) con una CL₅₀ de 2.59, CE₅₀ de 15.96; ubicándolos en la categoría C de factor de riesgo en embarazo establecido por la FDA. Esto implica que su uso debe ser cuidadosamente evaluado, considerando la relación beneficio/riesgo, en virtud de

la evidencia de efectos adversos en modelos animales y la falta de estudios controlados en humanos (cuadro 18) (Unfried., 2007).

El mecanismo embriotóxico de ALN, AM y DADS se atribuye probablemente a su capacidad para generar especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de dañar las estructuras celulares y provocar apoptosis en las células embrionarias, además de tener como diana específica a la β -tubulina la cual es S-tiolada y esta modificación inhibe su capacidad de formar microtúbulos durante la mitosis y por tanto afecta la división celular (Chu y col., 2013; Smith y col., 2016). Nuestros resultados se correlacionan con los hallazgos de Thomas y col. (1987), quienes evaluaron la embriotoxicidad del n-butil mercaptano, un compuesto que contiene grupos tiol pero que carece de grupos alilo como los compuestos bioactivos aquí evaluados. En ese estudio, se observó que la exposición a 68 y 152 ppm de n-butil mercaptano indujo un aumento significativo en la pérdida postimplantacional y la reabsorción temprana en ratones, indicando una clara embriotoxicidad.

Por último, cuando el valor de PT >1, indica que el compuesto bioactivo tiene un mayor potencial para causar defectos congénitos a dosis que no son letales para el embrión, entre mayor sea PT más efectos teratogénicos se esperarán (Selderslaghs y col., 2009). Así, tanto el compuesto bioactivo DAS (PT 2.51, CL₅₀: 45.54 mg/kg, CE₅₀: 18.13 mg/kg) como el control estructural no sulfuroso DAE (PT 32.47, CL₅₀: 982.10 mg/kg, CE₅₀: 30.24 mg/kg) presentaron un mayor riesgo de inducir teratogenicidad (cianosis, gastrosquisis y malformaciones) en comparación de los otros compuestos bioactivos evaluados. La FDA los clasifica en la categoría C-D, indicando evidencia de riesgo fetal en modelos animales y no recomienda su uso, especialmente en dosis

elevadas y administración prolongada o intermitente, debido a su asociación con mayor mortalidad perinatal y efectos teratogénicos adversos (Cuadro 18) (Unfried., 2007).

De manera general, la evaluación embriotóxica y teratogénica *in ovo* sobre los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum* concluye que el compuesto ALN es el más embriotóxico, con una CL_{50} de 0.47 mg/Kg, mientras que el compuesto DAS mostró el mayor potencial teratogénico, con una CE_{50} del 18.13 mg/Kg.

Cuadro 18. Integración de resultados predictivos y biológicos de embriotoxicidad y teratogénesis de los 4 compuestos bioactivos de *A. sativum*

Compuesto	Integración de resultados embriotoxicidad y teratogénesis					
	Embriotoxicidad <i>In silico</i> (%)	Teratogénesis <i>In silico</i> (%)	CL ₅₀ mg/kg	CE ₅₀ mg/kg	Potencial teratogénico	Categorización FDA
DAE	67.6	36.4	982.10	30.24	32.47	C-D
AM	53 (I)	51.7 (I)	3.71 (III)	82.82 (IV)	0.04	C
DAS	38.6 (III)	36.4 (III)	45.54 (IV)	18.13 (II)	2.51	C-D
DADS	45.6 (II)	37.5 (II)	2.59 (II)	15.96 (I)	0.16	C
ALN	0 (IV)	0 (IV)	0.47 (I)	46.90 (III)	0.01	C

Los compuestos bioactivos se clasificaron en orden decreciente de toxicidad, desde I (máximo) hasta IV (mínimo).

XI. CONCLUSIONES

11.1. El análisis predictivo *in silico* indicó que el compuesto bioactivo DADS presenta una mayor probabilidad de ser tóxico debido a sus propiedades farmacocinéticas, interacción con CYP450, características toxicológicas y vías de señalización.

11.2. Se determinó que el compuesto bioactivo con mayor efecto hemotóxico sobre células eritrocitarias corresponde al DADS, al superar los límites de bioseguridad establecidos por la FDA (>25% de hemotoxicidad) a las concentraciones de 1, 10 y 100 mg/mL.

11.3. Se determinó que ALN es el compuesto bioactivo con mayor efecto embriotóxico sobre embriones *G. gallus*, con un valor de PT 0.01 y una CL₅₀ 0.47 mg/Kg, indicativo de presentar un mayor riesgo de inducir muerte embrionaria (embriotoxicidad) antes de que se produzcan defectos congénitos (teratogénesis).

11.4. La evaluación teratogénica *in ovo* determinó que el compuesto bioactivo DAS presenta un mayor riesgo de inducir defectos congénitos con un valor de PT 2.51 y una CE₅₀ 18.13 mg/Kg, estos resultados posicionan a este compuesto en la categoría C-D de la FDA, en donde se desaconseja su uso a dosis elevadas y administración prolongada.

XII. PERSPECTIVAS

1. Realizar análisis de interacción entre compuestos bioactivos de *A. sativum* y otros fitofármacos para identificar posibles sinergias, aditividad, indiferencias o interacciones adversas (antagonismos) a nivel *in vitro* (EH) e *in vivo* (*in ovo*).
2. Desarrollar y evaluar formulaciones farmacéuticas que presenten concentraciones seguras de los compuestos bioactivos.
3. Caracterizar el mecanismo molecular por el cual los compuestos bioactivos de *A. sativum* inducen efectos teratogénicos.
4. Realizar estudios toxicológicos en modelos animales como ratón o rata con patologías específicas para ponderar la relación riesgo-beneficio.

XIII. BIBLIOGRAFÍA

Abdul-Hammed, M., Adedotun, I., Olajide, M., Irabor, C., Afolabi, T., Gbadebo, I., y Ramasami, P. (2022). Virtual screening, ADMET profiling, PASS prediction, and bioactivity studies of potential inhibitory roles of alkaloids, phytosterols, and flavonoids against COVID-19 main protease (Mpro). *Natural Product Research*, 36(12), 3110-3116. <https://doi.org/10.1080/14786419.2021.1935933>

Agrokrebs, (2023). Morfología del ajo. Instagram. https://www.instagram.com/p/Cx_L1kevBiW/?igsh=MTVuZ2RkankyeWRodw==

Aguirre, A. (2009). Estudio mecanocuántico, docking y dinámica molecular de tioazúcares como inhibidores de la proteína fucosidasa: algoritmos para el análisis conformacional y programa para el cálculo de constantes de acoplamiento vecinales (CAL3JHH). [Tesis Doctoral, Universidad de Granada]. Repositorio Digibug. <http://hdl.handle.net/10481/2412>

Alfonso, G., Guerrero, M., Lorenzana-Jiménez, M. (2009). Developing phases of new medicaments. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM (México)*, 52(6), 260–264.

Alotiby, A. (2021). The impact of media on public health awareness concerning the use of natural remedies against the COVID-19 outbreak in Saudi Arabia. *International Journal of General Medicine*, 14, 3145-3152. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S317348>

Álvarez, C. (2011). Efectos teratogénicos del nitrato de plomo en el desarrollo embrionario del pez cebra danio rerio (Hamilton, 1822) a cinco dosis subletales. Pontificia

<https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8844>

Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., y Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *The Journal of nutrition*, 131(3), 955S-962S.

Amin, K. y Dannenfelser, R.M. (2006). In vitro hemolysis: Guidance for the pharmaceutical scientist. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(6), 1173–1176.
<https://doi:10.1002/jps.20627>

Arguello-Garcia, R., Medina-Campos, O. N., Perez-Hernandez, N., Pedraza-Chaverri, J., & Ortega-Pierres, G. (2010). Hypochlorous acid scavenging activities of thioallyl compounds from garlic. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(21), 11226-11233.

Arranz, N., Haza, A. I., García, A., Möller, L., Rafter, J., & Morales, P. (2007). Protective effects of organosulfur compounds towards N-nitrosamine-induced DNA damage in the single-cell gel electrophoresis (SCGE)/HepG2 assay. *Food and chemical toxicology*, 45(9), 1662-1669.

Artemisa, L., y Lajas, M. (2024). Las Oligosacarinas estimulan el crecimiento y desarrollo de plantas de ajo elefante (*Allium ampeloprasum* L.). *Cultivos Tropicales*, 45(2).

Atanasov, A. G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E. M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., ... & Stuppner, H. (2015). Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology advances*, 33(8), 1582-1614.

- Aydemir, M. C., Yaman, İ., & Kilic, M. A. (2024). Membrane Receptor-Mediated Disruption of Cellular Homeostasis: Changes in Intracellular Signaling Pathways Increase the Toxicity of Ochratoxin A. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2300777.
- Ballantyne, B. (2009). Repeated exposure toxicity. *General, Applied and Systems Toxicology*.
- Bellairs, R. y Osmond, M. (2014). Chapter 2- Techniques. In *Atlas of Chick Development* (Third Edition) (pp. 7-14).
- Belloir, C., Singh, V., Daurat, C., Siess, M. H., & Le Bon, A. M. (2006). Protective effects of garlic sulfur compounds against DNA damage induced by direct-and indirect-acting genotoxic agents in HepG2 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44(6), 827-834.
- Bender-Bojalil, D., & Bárcenas-Pozos, M. E. (2013). El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos. *Revista Temas Selectos Ingeniera en Alimentos*, 7(1), 25-36.
- Benz, E. J., Berliner, N., & Schiff, F. J. (2017). Specific Forms of Anemia.
- Bhardwaj, S., y Gupta, D. (2012). Study of acute, sub acute and chronic toxicity test. *International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical & Bio Sciences*, 1(3), 103-130.
- Biancolillo, A., Marini, F., & D'Archivio, A. A. (2020). Geographical discrimination of red garlic (*Allium sativum* L.) using fast and non-invasive Attenuated Total Reflectance-Fourier Transformed Infrared (ATR-FTIR) spectroscopy combined with chemometrics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 86, 103351.

- Bisen, P. S., & Emerald, M. (2016). Nutritional and Therapeutic Potential of Garlic and Onion (*Allium* sp.). *Current Nutrition & Food Science*, 12(3), 190-199.
- Block, E. (1992). The organosulfur chemistry of the genus *Allium*—implications for the organic chemistry of sulfur. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 31(9), 1135-1178.
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M. C., Nwachukwu, I. D., & Slusarenko, A. J. (2014). Allicin: chemistry and biological properties. *Molecules*, 19(8), 12591-12618.
- Borrelli, F., Capasso, R., Izzo, A. (2007) Garlic (*Allium sativum* L.): adverse effects and drug interactions in humans. *Mol Nutr Food Res*. 51(11):1386-97.
<https://doi:10.1002/mnfr.200700072>
- Burba, J. L. (2003). Producción de ajo. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. INTA EEA La Consulta. Mendoza, Argentina, 24-27.
- Campbell, W. B. y Gauthier, K. M. (2002). What is new in endothelium-derived hyperpolarizing factors?. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 11(2), 177-183.
- Campbell, W., y Harder, D. (1999). Endothelium-derived hyperpolarizing factors and vascular cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid in the regulation of tone. *Circulation research*, 84(4), 484-488.
- Capuzzi, S. J., Muratov, E. N., & Tropsha, A. (2017). Phantom PAINS: Problems with the Utility of Alerts for P an-A ssay IN terference Compound S. *Journal of chemical information and modeling*, 57(3), 417-427.

- Četkauskaitė, A., Pessala, P., & Södergren, A. (2004). Elemental sulfur: Toxicity in vivo and in vitro to bacterial luciferase, in vitro yeast alcohol dehydrogenase, and bovine liver catalase. *Environmental Toxicology: An International Journal*, 19(4), 372-386.
- Clippinger, A. J., Allen, D., Behrsing, H., BéruBé, K. A., Bolger, M. B., Casey, W., ... & Jarabek, A. M. (2018). Pathway-based predictive approaches for non-animal assessment of acute inhalation toxicity. *Toxicology in Vitro*, 52, 131-145.
- Crivori, P., y Poggesi, I. (2006). Computational approaches for predicting CYP-related metabolism properties in the screening of new drugs. *European journal of medicinal chemistry*, 41(7), 795-808.
- Cruz-Silva MM, Madeira VM, Almeida LM, Custódio BA. (2000). Hemolysis of human erythrocytes induced by tamoxifen is related to disruption of membrane structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*. 1464(1), 49–61. doi:10.1016/S0005-2736(99)00237-0
- Cheng, F., Li, W., Liu, G., & Tang, Y. (2013). In silico ADMET prediction: recent advances, current challenges and future trends. *Current topics in medicinal chemistry*, 13(11), 1273-1289.
- Chu, Y. L., Ho, C. T., Chung, J. G., Raghu, R., Lo, Y. C., & Sheen, L. Y. (2013). Allicin induces anti-human liver cancer cells through the p53 gene modulating apoptosis and autophagy. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(41), 9839-9848.

- Daina A, Michielin O, Zoete V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/srep42717
- Dar, A. M., y Mir, S. (2017). Molecular docking: approaches, types, applications and basic challenges. *J Anal Bioanal Tech*, 8(2), 1-3.
- Darney, K., Lautz, L. S., Béchaux, C., Wiecek, W., Testai, E., Amzal, B., & Dorne, J. L. C. M. (2021). Human variability in polymorphic CYP2D6 metabolism: Implications for the risk assessment of chemicals in food and emerging designer drugs. *Environment International*, 156, 106760.
- Da-Silva, T. F., Guimarães, B. L. A. A., de Carvalho, E. A. B., Castro, M. I. D. A. L., de Lima Aires, A., de Souza, M. A. A., ... & da Silva, E. C. (2024). AVALIAÇÃO DO EFEITO EMBRIOTÓXICO DA LECTINA DE *Bothrops leucurus* (BIL) NO MODELO DE *Gallus gallus domesticus*. *Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, 12(1), 4077-4087.
- Daud, A. N., Bergman, J. E., Bakker, M. K., Wang, H., Kerstjens-Frederikse, W. S., de Walle, H. E., y Wilffert, B. (2015). P-glycoprotein-mediated drug interactions in pregnancy and changes in the risk of congenital anomalies: a case-reference study. *Drug safety*, 38, 651-659.
- Demchuk, E., Ball, S. L., Le, S. L., & Prussia, A. J. (2018). Concentration-time extrapolation of short-term inhalation exposure levels: dimethyl sulfide, a case study using a chemical-specific toxic load exponent. *Inhalation toxicology*, 30(11-12), 448-462.

- Denny, K. H., & Stewart, C. W. (2017). Acute, Subacute, Subchronic, and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. In *A Comprehensive Guide to Toxicology in Nonclinical Drug Development* (pp. 109-127). Academic Press.
- Deodhar, M., Al Rihani, S. B., Arwood, M. J., Darakjian, L., Dow, P., Turgeon, J., & Michaud, V. (2020). Mechanisms of CYP450 inhibition: understanding drug-drug interactions due to mechanism-based inhibition in clinical practice. *Pharmaceutics*, 12(9), 846.
- Di, L., Artursson, P., Avdeef, A., Benet, L. Z., Houston, J. B., Kansy, M., ... y Sugano, K. (2020). El papel crítico de la permeabilidad pasiva en el diseño de fármacos exitosos. *ChemMedChem*, 15(20), 1862-1874.
- Dong, J., Wang, N. N., Yao, Z. J., Zhang, L., Cheng, Y., Ouyang, D., ... & Cao, D. S. (2018). ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *Journal of cheminformatics*, 10, 1-11.
- Dostalek, M., Court, M. H., Yan, B., & Akhlaghi, F. (2011). Significantly reduced cytochrome P450 3A4 expression and activity in liver from humans with diabetes mellitus. *British journal of pharmacology*, 163(5), 937-947.
- Egbujor, M. C., Petrosino, M., Zuhra, K., & Saso, L. (2022). The role of organosulfur compounds as Nrf2 activators and their antioxidant effects. *Antioxidants*, 11(7), 1255.
- El-Saadony, M. T., Saad, A. M., Korma, S. A., Salem, H. M., Abd El-Mageed, T. A., Alkafaas, S. S., y Ibrahim, S. A. (2024). Garlic bioactive substances and their therapeutic

applications for improving human health: a comprehensive review. *Frontiers in Immunology*, 15, 1277074. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1277074>

Ercan, B., Ayaz, L., Cicek, D., y Tamer, L. (2008). Role of CYP2C9 and CYP2C19 polymorphisms in patients with atherosclerosis. *Cell Biochemistry and Function: Cellular biochemistry and its modulation by active agents or disease*, 26(3), 309-313.

Faber, M. S., Jetter, A., & Fuhr, U. (2005). Assessment of CYP1A2 activity in clinical practice: why, how, and when?. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 97(3), 125-134.

Fagerholm, U. (2007). Prediction of human pharmacokinetics—renal metabolic and excretion clearance. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 59(11), 1463-1471.

Farrás, J. G., Solà, X. G., Odriozola, M. E. C., & Beberide, S. R. (2010). NTP 727: Clasificación y etiquetado de productos químicos: comparación entre el GHS y la reglamentación europea Legislación y sentencias. Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo, tabla 5.

Fernández, R. G., Leblanch, E. R., Peacock, B. M., Toujague, H. M., y Lores, O. F. (2022). Potencialidades farmacológicas de plantas medicinales cubanas como base para la conservación de su biodiversidad. *Orange Journal*, 4(7), 4-15.

Filser, J. G., & Klein, D. (2018). A physiologically based toxicokinetic model for inhaled ethylene and ethylene oxide in mouse, rat, and human. *Toxicology letters*, 286, 54-79.

Filser, J. G., Hutzler, C., Rampf, F., Kessler, W., Faller, T. H., Leibold, E., ... & Csanády, G. A. (2008). Concentrations of the propylene metabolite propylene oxide in blood of

propylene-exposed rats and humans—a basis for risk assessment. *Toxicological sciences*, 102(2), 219-231.

Fisher Scientific. (2023). FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD – Allicin (13591000). Thermo Fisher (Kandel) GmbH. Recuperado de: https://www.fishersci.es/chemicalProductData_uk/wercs?itemCode=10387110&lang=ES

Fisher Scientific. (2024a). FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD – Allyl mercaptan (153710250). Thermo Fisher (Kandel) GmbH. Recuperado de: https://www.fishersci.es/chemicalProductData_uk/wercs?itemCode=10572741&lang=ES

Fisher Scientific. (2024b). FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD – Diallyl disulfide (L1106). Thermo Fisher (Kandel) GmbH. Recuperado de: <https://www.fishersci.es/store/msds?partNumber=11397556&countryCode=ES&language=es>

Fisher Scientific. (2024c). FICHA DE DATOS DE SEGURIDAD – Diallyl sulfide (L10971). Thermo Fisher (Kandel) GmbH. Recuperado de: <https://www.fishersci.es/store/msds?partNumber=11363106&countryCode=ES&language=es>

Forsyth, J. T., Grünewald, R. A., Rostami-Hodjegan, A., Lennard, M. S., Sagar, H. J., y Tucker, G. T. (2000). Parkinson's disease and CYP1A2 activity. *British journal of clinical pharmacology*, 50(4), 303-309. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.2000.00259.x>

Franco, E. P. D. D., Contesini, F. J., Lima da Silva, B., Alves de Piloto Fernandes, A. M., Wielewski Leme, C., Goncalves Cirino, J. P., ... & de Oliveira Carvalho, P. (2020). Enzyme-assisted modification of flavonoids from *Matricaria chamomilla*: antioxidant activity and inhibitory effect on digestive enzymes. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 35(1), 42-49.

Fricker, G. (2008). Drug Interactions with Natural Products at the Blood Brain Barrier. *Current Drug Metabolism*, 9(10), 1019–1026. doi:10.2174/138920008786927758

Fu, L., Shi, S., Yi, J., Wang, N., He, Y., Wu, Z., ... & Cao, D. (2024). ADMETlab 3.0: an updated comprehensive online ADMET prediction platform enhanced with broader coverage, improved performance, API functionality and decision support. *Nucleic Acids Research*, gkae236.

Fujino, C., Sanoh, S., & Katsura, T. (2021). Variation in expression of cytochrome P450 3A isoforms and toxicological effects: endo-and exogenous substances as regulatory factors and substrates. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 44(11), 1617-1634.

Fukami, M., Nagai, T., Mochizuki, H., Muroya, K., Yamada, G., Takitani, K., & Ogata, T. (2010). Anorectal and urinary anomalies and aberrant retinoic acid metabolism in cytochrome P450 oxidoreductase deficiency. *Molecular genetics and metabolism*, 100(3), 269-273.

Furdak, P., Bartosz, G., Stefaniuk, I., Cieniek, B., Bieszczad-Bedrejczuk, E., Soszyński, M., & Sadowska-Bartosz, I. (2024). Effect of Garlic Extract on the Erythrocyte as a Simple Model Cell. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10), 5115.

- Gámez R, Más R. (2007). Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 38(3), 204-208.
<https://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=a9h&AN=31131140&lang=es&site=ehost-live>
- García Trejo, E. M. Á., Arellano Buendía, A. S., Sánchez Reyes, O., García Arroyo, F. E., Arguello García, R., Loredó Mendoza, M. L., ... & Osorio Alonso, H. (2017). The beneficial effects of allicin in chronic kidney disease are comparable to losartan. International journal of molecular sciences, 18(9), 1980.
- Gaston, T. E., Mendrick, D. L., Paine, M. F., Roe, A. L., & Yeung, C. K. (2020). “Natural” is not synonymous with “Safe”: Toxicity of natural products alone and in combination with pharmaceutical agents. Regulatory toxicology and pharmacology, 113, 104642.
- Ghenai, A., y Mejova, Y. (2018). Fake cures: user-centric modeling of health misinformation in social media. Proceedings of the ACM on human-computer interaction, 2(CSCW), 1-20. <https://doi.org/10.1145/3274327>
- Ghimire, S., Zhang, X., Zhang, J., y Wu, C. (2022). Use of chicken embryo model in toxicity studies of endocrine-disrupting chemicals and nanoparticles. Chemical Research in Toxicology, 35(4), 550-568.
- Gobierno de México (GOB). (2021). Recuperado de: <https://www.gob.mx/agricultura/prensa/se-ubica-mexico-como-el-noveno-exportador-mundial-de-ajos?idiom=es>

- Gómez-Álvarez, R. (2012). Plantas medicinales en una aldea del estado de Tabasco, México. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), 43-49. <https://doi.org/10.35196/rfm.2012.1.43>
- Gozalbes, R., de Julián-Ortiz, J. V., & Fito-López, C. (2014). Métodos computacionales en toxicología predictiva: aplicación a la reducción de ensayos con animales en el contexto de la legislación comunitaria REACH. *Revista de Toxicología*, 31(2), 157-167.
- Guengerich, F. P. (2001). Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chemical research in toxicology*, 14(6), 611-650.
- Guengerich, F. P. (2017). Intersection of the roles of cytochrome P450 enzymes with xenobiotic and endogenous substrates: relevance to toxicity and drug interactions. *Chemical research in toxicology*, 30(1), 2-12.
- Guillamón, E. (2018). Efecto de compuestos fitoquímicos del género *Allium* sobre el sistema inmune y la respuesta inflamatoria. *Ars Pharmaceutica*, 59(3).
- Hamburger, V., & Hamilton, H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of morphology*, 88(1), 49-92.
- Haro Estarriol, M., Rubio Goday, M., & Turmo, L. B. (2002). Lesiones pulmonares inducidas por fármacos. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*, 40(2), 64-75.
- Heimann, K. G., & Doughty, K. (2014). Examination of Acute and Chronic Toxicity. *Regulatory Toxicology*, 81–88. doi:10.1007/978-3-642-35374-1_31

- Higa, R., y Jawerbaum, A. (2013). Intrauterine effects of impaired lipid homeostasis in pregnancy diseases. *Current medicinal chemistry*, 20(18), 2338-2350.
- Hirata, S., Abdelrahman, M., Yamauchi, N., & Shigyo, M. (2016). Diversity evaluation based on morphological, physiological and isozyme variation in genetic resources of garlic (*Allium sativum* L.) collected worldwide. *Genes & genetic systems*, 91(3), 161-173.
- Hodek, P., Trefil, P., & Stiborová, M. (2002). Flavonoids-potent and versatile biologically active compounds interacting with cytochromes P450. *Chemico-biological interactions*, 139(1), 1-21.
- Hoshino, T., Kashimoto, N., & Kasuga, S. (2001). Effects of garlic preparations on the gastrointestinal mucosa. *The Journal of nutrition*, 131(3), 1109S-1113S.
- Huth, J. R., Song, D., Mendoza, R. R., Black-Schaefer, C. L., Mack, J. C., Dorwin, S. A., ... & Hajduk, P. J. (2007). Toxicological evaluation of thiol-reactive compounds identified using a la assay to detect reactive molecules by nuclear magnetic resonance. *Chemical research in toxicology*, 20(12), 1752-1759.
- Igarashi, S., Demorestt, D., y Lauber, J. (1981). Changes in fluorescence spectra during early development of chick embryo. *Comparative Biochemistry and Physiology- A Molecular and Integrative Physiology*, 69(B), 157-167.
- Ion, G. N. D., & Nitulescu, G. M. (2019). Drugs and PAINs: a DrugBank analysis of pan-assay interference compounds.

- Iorga, A., y Dara, L. (2019). Cell death in drug-induced liver injury. *Advances in Pharmacology*, 85, 31-74.
- Jatoo, S. D., Lauriault, V., & McGirr, L. G. (1988). The toxicity of disulphides to isolated hepatocytes and mitochondria. *Drug metabolism and drug interactions*, 6(3-4), 395-412.
- Jessl, L., Scheider, J., y Oehlmann, J. (2018). The domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryo as an alternative for mammalian experiments—Validation of a test method for the detection of endocrine disrupting chemicals. *Chemosphere*, 196, 502-513.
- Jha, V. (2010). Herbal medicines and chronic kidney disease. *Nephrology*, 15, 10-17.
- Juárez-Segovia, K. G., Díaz-Darcía, E. J., Méndez-López, M. D., Pina-Canseco, M. S., Pérez-Santiago, A. D., & Sánchez-Medina, M. A. (2019). Efecto de extractos crudos de ajo (*Allium sativum*) sobre el desarrollo in vitro de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*. *Polibotánica*, (47), 99-111.
- Kamal, Z., Al-Amgad, Z., Zigo, F., Farkašová, Z., Zigová, M., Ahmad, A. M., ... & Rehan, I. F. (2023). Heavy consumption of garlic (*Allium sativum*) exert nephro-and pulmonary toxicity at maternal and embryonic level in the Albino rats. *Journal of Applied Animal Research*, 51(1), 776-788.
- Kamel, A., & Saleh, M. (2000). Recent studies on the chemistry and biological activities of the organosulfur compounds of garlic (*Allium sativum*). *Studies in natural products chemistry*, 23, 455-485.

- Kamenetsky, R., Khassanov, F., Rabinowitch, H. D., Auger, J., & Kik, C. (2007). Garlic biodiversity and genetic resources. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 1-5.
- Karmaus, A. L., Mansouri, K., To, K. T., Blake, B., Fitzpatrick, J., Strickland, J., ... & Kleinstreuer, N. (2022). Evaluation of variability across rat acute oral systemic toxicity studies. *Toxicological Sciences*, 188(1), 34-47.
- Khan, R. M., Hassan, U., Shafiq, R., Nayab, T. (2018). An updated review on biological half-life & volumen of distribution. *Global Pharmaceutic*. 3(1), 19-26.
[http://dx.doi.org/10.31703/gpsr.2018\(III-I\).03](http://dx.doi.org/10.31703/gpsr.2018(III-I).03)
- Khoo, K. H., Verma, C. S., & Lane, D. P. (2014). Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nature reviews Drug discovery*, 13(3), 217-236.
- Kiecker, C. (2016). The chick embryo as a model for the effects or prenatal exposure to alcohol on craniofacial development. *Developmental Biology*, 415(2), 314-325.
- Kirchheiner, J., Tsahuridu, M., Jabrane, W., Roots, I., & Brockmüller, J. (2004). The CYP2C9 polymorphism: from enzyme kinetics to clinical dose recommendations. *Personalized Medicine*, 1(1), 63-84.
- Kumar, M. M., Swathi, B. R., Gorityala, S., & Sree, G. P. (2018). ADMET predictors are the tools for the enhancement of drug design and development: A systematic review. *International Journal of Advances in Pharmacy and Biotechnology*, 4(4), 6-13.

- Lagorce, D., Sperandio, O., Galons, H., Miteva, M. A., & Villoutreix, B. O. (2008). FAF-Drugs2: free ADME/tox filtering tool to assist drug discovery and chemical biology projects. *BMC bioinformatics*, 9, 1-9.
- Lanzavechia, S. (2009). Contribucion al conocimiento para la produccion de ajo elefante (*Allium ampeloprasum complex*), en Mendoza, Argentina. *Horticultura Argentina*, 28, 63-86.
- Lasalvia, A., Cairone, F., Cesa, S., Maccelli, A., Crestoni, M. E., Menghini, L., ... & Patruno, A. (2022). Characterization and valorization of 'sulmona red garlic' peels and small bulbs. *Antioxidants*, 11(11), 2088.
- Lawson, L. D. (1998). Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. *Blood*, 179, 62.
- Lee, K. W., Yamato, O., Tajima, M., Kuraoka, M., Omae, S., & Maede, Y. (2000). Hematologic changes associated with the appearance of eccentrocytes after intragastric administration of garlic extract to dogs. *American journal of veterinary research*, 61(11), 1446-1450.
- Lei, J., Li, G., Yu, H., & An, T. (2022). Potent necrosis effect of methanethiol mediated by METTL7B enzyme bioactivation mechanism in 16HBE cell. *Ecotoxicology and environmental safety*, 236, 113486.

- Li, Y., Chen, Y., Chen, J., & Shen, C. (2023). Flavonoid metabolites in tea plant (*Camellia sinensis*) stress response: Insights from bibliometric analysis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107934.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 3- 26
DOI:[10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- LoPachin, R. M., Gavin, T., & Barber, D. S. (2008). Type-2 alkenes mediate synaptotoxicity in neurodegenerative diseases. *Neurotoxicology*, 29(5), 871-882.
- Lu, J., Shang, X., Zhong, W., Xu, Y., Shi, R., & Wang, X. (2020). New insights of CYP1A in endogenous metabolism: a focus on single nucleotide polymorphisms and diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10(1), 91-104.
- Luja-Mondragón, M., Gómez-Oliván, L. M., SanJuan-Reyes, N., Islas-Flores, H., Orozco-Hernández, J. M., Heredia-García, G., y Dublán-García, O. (2019). Alterations to embryonic development and teratogenic effects induced by a hospital effluent on *Cyprinus carpio* oocytes. *Science of The Total Environment*, 660, 751-764.
- Madariaga, V., Serrano, A., Ramirez, I., Molina, A., & Freire, M. (2020). Compuestos bioactivos en ajo. *Boletín INIA-Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, 424.
- Majewski, M. (2014). *A. sativum*: facts and myths regarding human health. *Roczniki Państwowego Zakładu Higieny*, 65(1).

- Mameri, A., Bournine, L., Mouni, L., Bensalem, S., & Iguer-Ouada, M. (2021). Oxidative stress as an underlying mechanism of anticancer drugs cytotoxicity on human red blood cells' membrane. *Toxicology in Vitro*, 72, 105106.
- Maza, M. G., Ibañez, G. G., Hernández, J. C. M., & Dopico, A. C. (2017). Revisión bibliográfica sobre el uso terapéutico del ajo. *Revista cubana de medicina física y rehabilitación*, 6(1).
- Mishra, M., Nichols, L., Dave, A. A., Pittman, E. H., Cheek, J. P., Caroland, A. J., y Bridges, C. C. (2022). Molecular mechanisms of cellular injury and role of toxic heavy metals in chronic kidney disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(19), 11105.
- Mora, J., Ciocon, J., & Galindo, D. (2014). Extreme complementary alternative medicine: A case of over-the-counter polypharmacy. *Consultant*, 53, 349-353.
- Moreno-Altamirano, A., López-Moreno, S., & Corcho-Berdugo, A. (2000). Principales medidas en epidemiología. *Salud pública de México*, 42, 337-348.
- Munday, R., Munday, J. S., & Munday, C. M. (2003). Comparative effects of mono-, di-, tri-, and tetrasulfides derived from plants of the Allium family: redox cycling in vitro and hemolytic activity and Phase 2 enzyme induction in vivo. *Free Radical Biology and Medicine*, 34(9), 1200-1211.
- Musk, S. R. R., Clapham, P., & Johnson, I. T. (1997). Cytotoxicity and genotoxicity of diallyl sulfide and diallyl disulfide towards chinese hamster ovary cells. *Food and Chemical Toxicology*, 35(3-4), 379–385. doi:10.1016/s0278-6915(97)00120-8

- Nicolas, J. M., & de Lange, E. C. (2019). Mind the gaps: ontogeny of human brain P-gp and its impact on drug toxicity. *The AAPS Journal*, 21(4), 67.
- Nuñez, B. (2011). Estudio de factibilidad para la creación de una microempresa dedicada a la producción y comercialización de ajo macho ubicada en la parroquia de Pilahuin, en la Provincia de Tungurahua, con destino al mercado de Quito. (Ingeniero Comercial Tesis), Escuela Politécnica Salesiana Sede Quito, Quito, Ecuador. Retrieved from <https://dspace.ups.edu.ec/bitstream/123456789/4983/1/UPS-QT00089.pdf>
- Oboh, G. (2004). Prevention of garlic-induced hemolytic anemia using some tropical green leafy vegetables. *Journal of medicinal food*, 7(4), 498-501.
- Ohki, S., Ogawa, S., Takano, H., Shimazaki, H., Fukae, M., Furihata, T., ... & Yokokawa, A. (2023). Calculation of Human Melatonin Partial Metabolic Clearance in Healthy Adult Volunteers for Investigation of a Novel in Vivo CYP1A2 Phenotyping Method: A Pilot Study. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 46(5), 736-740.
- Okoro, B. C., Dokunmu, T. M., Okafor, E., Sokoya, I. A., Israel, E. N., Olusegun, D. O., ... & Iweala, E. E. J. (2023). The ethnobotanical, bioactive compounds, pharmacological activities and toxicological evaluation of garlic (*Allium sativum*): A review. *Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine*, 8, 100273.
- Orellana, M., y Guajardo, V. (2004). Actividad del citocromo P450 y su alteración en diversas patologías. *Revista médica de Chile*, 132(1), 85-94.

Organización de Naciones Unidas. Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado Productos Químicos. Parte 3: Efectos sobre la Salud (ONU-SGA, 2011)
Disponible: http://www.unece.org/es/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/04files_s.html

Ortiz de Montellano, P. R. (2013). Cytochrome P450-activated prodrugs. *Future medicinal chemistry*, 5(2), 213-228.

Ouedraogo, M., Baudoux, T., Stévigny, C., Nortier, J., Colet, J. M., Efferth, T., ... & Duez, P. (2012). Review of current and “omics” methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. *Journal of ethnopharmacology*, 140(3), 492-512.

Pagano, M., & Faggio, C. (2015). The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. *Cell biochemistry and function*, 33(6), 351-355.

Parasuraman S. Prediction of activity spectra for substances. *J Pharmacol Pharmacother*. 2011 Jan;2(1):52-3. doi: 10.4103/0976-500X.77119. PMID: 21701651; PMCID: PMC3117574.

Peacock, B., Suárez, M. F., Berenguer, C. A., y Pérez Jackson, L. (2009). Intoxicaciones por plantas tóxicas atendidas desde un servicio de información toxicológica. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2), 0-0.

Peña Hernández, M. A. (2008). Evaluación del efecto de la temperatura en la teratogenicidad del mercurio en embriones del pez cebra, método (DarTa).

- Pérez-Torres, I., Guarner-Lans, V., & Rubio-Ruiz, M. E. (2017). Reductive stress in inflammation-associated diseases and the pro-oxidant effect of antioxidant agents. *International journal of molecular sciences*, 18(10), 2098.
- Petropoulos, S., Di Gioia, F., & Ntatsi, G. (2017). Vegetable organosulfur compounds and their health promoting effects. *Current pharmaceutical design*, 23(19), 2850-2875.
- Piersma, A. H. (2013). Innovations in testing strategies in reproductive toxicology. *Teratogenicity Testing: Methods and Protocols*, 327-341.
- Pillco, A., y de la Peña, E. (2014). Ames test (bacterial reverse mutation test): Why, when, and how to use. *Genotoxicity and DNA Repair: A Practical Approach*, 3-22.
- Prieto-Martínez, F. D., Arciniega, M., & Medina-Franco, J. L. (2019). Acoplamiento molecular: avances recientes y retos. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 21(S1), 65-87.
- Qiu, F., Dziegielewska, K. M., Huang, Y., Habgood, M. D., Fitzpatrick, G., & Saunders, N. R. (2023). Developmental changes in the extent of drug binding to rat plasma proteins. *Scientific Reports*, 13(1), 1266.
- Quesada, J. A. A. (1997). El riñón y la cinética de los fármacos. *Acta Médica Costarricense*, 39(2), 21-27.
- Quintanar, A. V., Mancera, M. F. D., Osorio, K. D., Chong, D. M., & Mejía, M. A. L. (2024). El Diseño y evaluación in silico de ligandos del receptor GLP-1 para el tratamiento de la

resistencia a la insulina derivada del síndrome de ovario poliquístico. Memorias del Concurso Lasallista de Investigación, Desarrollo e innovación, 11(1), 72-78.

Quiñones, L., Rosero, M., Roco, Á., Moreno, I., Sasso, J., Varela, N., ... & Saavedra, I. (2008). Papel de las enzimas citocromo p450 en el metabolismo de fármacos antineoplásicos: Situación actual y perspectivas terapéuticas. *Revista médica de Chile*, 136(10), 1327-1335.

Raanan, R., Gunier, R. B., Balmes, J. R., Beltran, A. J., Harley, K. G., Bradman, A., & Eskenazi, B. (2017). Elemental sulfur use and associations with pediatric lung function and respiratory symptoms in an agricultural community (California, USA). *Environmental health perspectives*, 125(8), 087007.

Ramírez-Concepción, H. R., Castro-Velasco, L. N., & Martínez-Santiago, E. (2016). Efectos terapéuticos del ajo (*Allium sativum*). *Revista Salud y Administración*, 3(8), 39-47.

Renaud, H. J., Cui, J. Y., Khan, M., & Klaassen, C. D. (2011). Tissue distribution and gender-divergent expression of 78 cytochrome P450 mRNAs in mice. *Toxicological sciences*, 124(2), 261-277.

Rettie, A. E., & Jones, J. P. (2005). Clinical and toxicological relevance of CYP2C9: drug-drug interactions and pharmacogenetics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45(1), 477-494.

Roberts, G. K., Gardner, D., Foster, P. M., Howard, P. C., Lui, E., Walker, L., ... & Rider, C. (2019). Finding the bad actor: Challenges in identifying toxic constituents in botanical dietary supplements. *Food and chemical toxicology*, 124, 431-438.

- Rohwedel, J., Guan, K., Hegert, C., & Wobus, A. M. (2001). Embryonic stem cells as an in vitro model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects. *Toxicology in vitro*, 15(6), 741-753.
- Sæbø, I. P., Bjørås, M., Franzyk, H., Helgesen, E., & Booth, J. A. (2023). Optimization of the hemolysis assay for the assessment of cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2914.
- Sánchez, J. M., Villalba, A. R., Acuña, A., Penner, L., Penner, D., Giménez, M., y Sanabria, M. (2019). Intoxicaciones por plantas en el Centro Nacional de Toxicología durante el periodo 2011-2017. Asunción, Paraguay. *Revista Virtual de la Sociedad Paraguaya de Medicina Interna*, 6(2), 11-20. <https://doi.org/10.18004/rvspmi/2312-3893/2019.06.02.11-020>
- Sánchez-Argüello, P., Aparicio, N., & Fernández, C. (2012). Linking embryo toxicity with genotoxic responses in the freshwater snail *Physa acuta*: Single exposure to benzo (a) pyrene, fluoxetine, bisphenol A, vinclozolin and exposure to binary mixtures with benzo (a) pyrene. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 80, 152-160.
- Sass, N. (2000). Humane endpoints and acute toxicity testing. *ILAR journal*, 41(2), 114-123.
- Satsantitham, K., Sritangos, P., Wet-Osot, S., Chudapongse, N., & Weeranantanapan, O. (2024). Cellular uptake of allicin in the hCMEC/D3 human brain endothelial cells: exploring blood-brain barrier penetration in an in vitro model. *PeerJ*, 12, e17742.

Selderslaghs, I. W., Van Rompay, A. R., De Coen, W., & Witters, H. E. (2009). Development of a screening assay to identify teratogenic and embryotoxic chemicals using the zebrafish embryo. *Reproductive toxicology*, 28(3), 308-320.

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), Sistema de información Agroalimentaria de Consulta (SIACON), (2019). Consultado en: <https://www.gob.mx/siap/documentos/siacon-ng-161430>

Shaikh, S. A., Tischer, S., Choi, E. K., & Fontana, R. J. (2017). Good for the lung but bad for the liver? Garlic-induced hepatotoxicity following liver transplantation. *Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics*, 42(5).

Sharma, M., Stucki, A. O., Verstraelen, S., Stedeford, T. J., Jacobs, A., Maes, F., ... & Clippinger, A. J. (2023). Human cell-based in vitro systems to assess respiratory toxicity: a case study using silanes. *Toxicological Sciences*, 195(2), 213-230.

Shepard, T. H. (1994). "Proof" of human teratogenicity. *Teratology*, 50(2), 97-98.

Shukla, S. J., Huang, R., Simmons, S. O., Tice, R. R., Witt, K. L., VanLeer, D., ... & Xia, M. (2012). Profiling environmental chemicals for activity in the antioxidant response element signaling pathway using a high throughput screening approach. *Environmental health perspectives*, 120(8), 1150-1156.

Shults, W. T., Fountain, E. N., & Lynch, E. C. (1970). Methanethiol poisoning: irreversible coma and hemolytic anemia following inhalation. *JAMA*, 211(13), 2153-2154.

- Silbergeld E, Watanabe P. (1998). Toxicología. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo, 1, 33-58.
- Singh, P. K., Negi, A., Gupta, P. K., Chauhan, M., & Kumar, R. (2016). Toxicophore exploration as a screening technology for drug design and discovery: techniques, scope and limitations. *Archives of toxicology*, 90, 1785-1802.
- Smith, D. A., Beaumont, K., Maurer, T. S., & Di, L. (2017). Relevance of half-life in drug design: Miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 61(10), 4273-4282.
- Smith, M., Hunter, R., Stellenboom, N., Kusza, D. A., Parker, M. I., Hammouda, A. N., ... & Kaschula, C. H. (2016). The cytotoxicity of garlic-related disulphides and thiosulfonates in WHCO1 oesophageal cancer cells is dependent on S-thiolation and not production of ROS. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1860(7), 1439-1449.
- Sogbanmu, T. O., Nagy, E., Phillips, D. H., Arlt, V. M., Otitoloju, A. A., & Bury, N. R. (2016). Lagos lagoon sediment organic extracts and polycyclic aromatic hydrocarbons induce embryotoxic, teratogenic and genotoxic effects in *Danio rerio* (zebrafish) embryos. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 14489-14501.
- Speranza, N., y Tamosiunas, G. (2016). Uso de medicamentos fuera de prospecto, uso off label de medicamentos: ¿ un mal necesario?. *Boletín Farmacológico*, 2016, vol. 7, nro. 2.
- Stingl, J. C., Scholl, C., Bosch, J. E., & Viviani, R. (2021). Genetic polymorphism of CYP2C19 and subcortical variability in the human adult brain. *Translational Psychiatry*, 11(1), 467.

- Surma, S., & Oparil, S. (2021). El café y la hipertensión arterial. *Informes actuales sobre hipertensión*, 23(7), 38.
- Tarasevičienė, Ž., Vitkauskaitė, M., Paulauskienė, A., & Černiauskienė, J. (2023). Wild stinging nettle (*Urtica dioica* L.) leaves and roots chemical composition and phenols extraction. *Plants*, 12(2), 309.
- Tasnif, Y., Morado, J., & Hebert, M. F. (2016). Pregnancy-related pharmacokinetic changes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 100(1), 53-62.
- Tesfaye, A. (2021). Revealing the therapeutic uses of garlic (*A. sativum*) and its potential for drug discovery. *The Scientific World Journal*, 2021(1), 8817288.
<https://doi.org/10.1155/2021/8817288>
- Thomas, W. C., Seckar, J. A., Johnson, J. T., Ulrich, C. E., Klonne, D. R., Schardein, J. L., & Kirwin, C. J. (1987). Inhalation teratology studies of n-butyl mercaptan in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, 8(2), 170-178.
- Tian, H., Ketkar, R., & Tao, P. (2022). ADMETboost: a web server for accurate ADMET prediction. *Journal of molecular modeling*, 28(12), 408.
- Trumble, J. T. (2002). Caveat emptor: safety considerations for natural products used in arthropod control. *American entomologist*, 48(1), 7-13.
- Unfried, E. (2007). Categorización del riesgo del uso de medicamentos en el embarazo según FDA. *Fármacos*, 7-181

- Unnikrishnan, P. (2010). Role of Traditional Medicine in Primary Health Care: An Overview of Perspectives and Challenging. 横浜国際社会科学研究, 14(6), 57-77.
- Uslu, M., Canbar, R., Arslan, M., & Kızılay, H. (2024). Determination of the embryotoxic effect of Metronidazole using an in ovo model Determinación del efecto embriotóxico del Metronidazol mediante un modelo in ovo. Revista Científica de la Facultad de Veterinaria, 34(1).
- Usmani, K. A., Cho, T. M., Rose, R. L., & Hodgson, E. (2006). Inhibition of the human liver microsomal and human cytochrome P450 1A2 and 3A4 metabolism of estradiol by deployment-related and other chemicals. Drug Metabolism and Disposition, 34(9), 1606-1614.
- Valbuena, D. S., Meléndez-Flórez, M. P., Villegas, V. E., Sánchez, M. C., & Rondón-Lagos, M. (2020). Daño celular y genético como determinantes de la toxicidad de los plaguicidas. Ciencia en Desarrollo, 11(2), 25-42.
- Valdés Silva, Y., Sánchez Ramírez, E., & Fuentes Arencibia, S. (2018). Malformaciones congénitas relacionadas con los agentes teratógenos. Correo científico médico, 22(4), 652-666.
- Valenzuela, R., Morales, G., González, M., Morales, J., Sanhueza, J., & Valenzuela, A. (2014). Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ω -3 y enfermedad cardiovascular. Revista chilena de nutrición, 41(3), 319-327.

- Vedani, A., & Smiesko, M. (2009). In silico toxicology in drug discovery—concepts based on three-dimensional models. *Alternatives to Laboratory Animals*, 37(5), 477-496.
- Venkatesan, N., y Ramanathan, M. (2017). Preclinical toxicity studies-tool of drug discovery. *PVPE*, 1, 1-7.
- Viruete, S. (2015). *Manual de conocimientos básicos de Farmacología*. Universidad de Guadalajara. México.
- Wang, B., Wu, L., Chen, J., Dong, L., Chen, C., Wen, Z., y Wang, D. W. (2021). Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. *Signal transduction and targeted therapy*, 6(1), 94.
- Wang, K., Wang, Y., Qi, Q., Zhang, F., Zhang, Y., Zhu, X., y Li, S. (2016). Inhibitory effects of S-allylmercaptocysteine against benzo (a) pyrene-induced precancerous carcinogenesis in human lung cells. *International Immunopharmacology*, 34, 37-43.
- Wangchuk, P. (2018). Therapeutic applications of natural products in herbal medicines, biodiscovery programs, and biomedicine. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 8(1), 1-20. <https://doi.org/10.1080/22311866.2018.1426495>
- Weigt, S., Huebler, N., Strecker, R., Braunbeck, T., & Broschard, T. H. (2011). Zebrafish (*Danio rerio*) embryos as a model for testing proteratogens. *Toxicology*, 281(1-3), 25-36.
- Willems, M. E. T., & Foster, C. T. (2024). Effects of Matcha green tea on heart rate variability and physiological and metabolic responses in young adult females. *Dietary Supplements and Nutraceuticals*, 3(1), 1-12.

- Willis, S. L., Moawad, F. J., Hartzel, J. D., Iglesias, M., & Jackson, W. L. (2006). Hypertensive retinopathy associated with use of the ephedra-free weight-loss herbal supplement Hydroxycut. *Medscape General Medicine*, 8(3), 82.
- Worth, A., Barroso, J., Bremer, S., Burton, J., Casati, S., Coecke, S., ... & Zuang, V. (2014). Alternative methods for regulatory toxicology—a state-of-the-art review. *JRC Sci Policy Rep EUR*, 26797, 1-475.
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., ... y Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic acids research*, 49(W1), W5-W14.
- Xu, X., Zhu, R., Ying, J., Zhao, M., Wu, X., Cao, G., & Wang, K. (2020). Nephrotoxicity of herbal medicine and its prevention. *Frontiers in pharmacology*, 11, 569551.
- Yang, W., Gadgil, P., Krishnamurthy, V. R., Landis, M., Mallick, P., Patel, D., y Sanchez-Felix, M. (2020). The evolving druggability and developability space: chemically modified new modalities and emerging small molecules. *The AAPS journal*, 22, 1-14.
- Yin, X., Zhang, R., Feng, C., Zhang, J., Liu, D., Xu, K., ... & Ma, H. (2014). Diallyl disulfide induces G2/M arrest and promotes apoptosis through the p53/p21 and MEK-ERK pathways in human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncology reports*, 32(4), 1748-1756.

- Zhang, X. Y., & Elfarra, A. A. (2017). Potential roles of myeloperoxidase and hypochlorous acid in metabolism and toxicity of alkene hydrocarbons and drug molecules containing olefinic moieties. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 13(5), 513-524.
- Zhou, S.-F., Wang, B., Yang, L.-P., & Liu, J.-P. (2009). Structure, function, regulation and polymorphism and the clinical significance of human cytochrome P450 1A2. *Drug Metabolism Reviews*, 42(2), 268–354. doi:10.3109/03602530903286476
- Zulkifli, M. H., Abdullah, Z. L., Yusof, N. I. S. M., & Fauzi, F. M. (2023). In silico toxicity studies of traditional Chinese herbal medicine: a mini review. *Current Opinion in Structural Biology*, 80, 102588.

XIV. ANEXOS

Anexo.1 Características sistemáticas asociadas a embriotoxicidad. A. Producto de gestación con desarrollo normal, B. Embrión con ausencia de latido, C. Licuefacción de proteínas.

A. Producto de gestación con desarrollo normal en el punto 1 de control (día 7 de incubación)



B. Embrión con ausencia de latido



C. Licuefacción de proteínas



Anexo 2. Características sistemáticas asociadas a teratogénesis. A. Producto de gestación con desarrollo normal, B. Embrión con malformaciones en cuerpo (cara, pico y extremidades), C. Gastrosquisis, D. Cianosis.

A. Producto de gestación con desarrollo normal en el punto 2 de control (15 días de incubación)



B. Embrión con malformaciones en cuerpo (cara, pico y extremidades)



C. Gastrosquiosis



D. Cianosis



XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

ADME	Absorción, distribución, metabolismo y excreción
ADMET	Absorción, distribución, metabolismo y eliminación y toxicidad
AGI	Absorción gastrointestinal
BHE	Barrera hematoencefálica
BPL	Buenas prácticas de Laboratorio
CG	Carcinogenicidad
Cg Gt	Carcinogenicidad genotóxica
Cg no Gt	Carcinogenicidad no genotóxica
CYP1A2	Citocromo P450 1A2
CYP2C9	Citocromo P450 2C9
CYP2D6	Citocromo P450 2D6
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DR	Depuración renal
EDTA	Anticoagulante ácido etilendiaminotetraacético
ERA	Elemento de respuesta antioxidante

FCT	Factor del choque térmico
FDA	Food and Drug administration
HT	Hepatotoxicidad
p53	Supresor tumoral p53
PCT	Proteínas de choque térmico
PPAR	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas
PPAR-gamma	Receptor activado por proliferador de peroxisoma
T_{1/2}	Tiempo de vida media
TAmes	Toxicidad Ames por mutagenicidad
TOAR	Toxicidad oral aguda en ratas
TR	Toxicidad respiratoria
UPP	Unión a proteínas plasmáticas