



---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**Evaluación de la Toxicidad Aguda y Subcrónica del Extracto Acuoso de  
*Chiranthodendron pentadactylon* Larreat (Flor de Manita)**

**T E S I S**

Qué Para obtener el Título de  
Químico Farmacéutico Biólogo

**P r e s e n t a**

Víctor Hugo Reyna Torres

Director Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez

Asesor Dr. Rubén Marroquín Segura

**México DF**

**2012**



**-Una mente que se abre a una idea nunca regresa a su tamaño original  
Albert Einstein-**

**-La experiencia es el nombre que le damos a nuestros errores  
Oscar Wilde-**

## **AGRADECIMIENTOS**

- Quiero agradecer Principalmente a Dios por todas las bendiciones y enseñanzas, por las cuales he llegado a esta meta.
- Agradecer también a mi familia, en especial a mi Madre, ya que sin su apoyo, tolerancia y comprensión esto no sería realidad.
- También agradecer al Profesor y Amigo Q. Carlos Salvador Valadez Sánchez al mismo tiempo que al M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez por su sabiduría, enseñanzas y paciencia, al Dr. Rubén Marroquín y a todo su equipo de trabajo por todas sus enseñanzas para poder desarrollar este proyecto.
- Agradecer a cada uno de mis amigos, por su apoyo, ayuda en los momentos difíciles, por todos aquellos que han formado parte de mi vida, por los que ya no están por los que siguen, es difícil nombrar a todos, pero agradezco especialmente a Marisol, Brenda, Jenny, Vicky y Claudia, amigas de siempre que sin su apoyo y comprensión no hubiese llegado a esta meta, gracias por sus palabras de aliento, por todo lo que vivimos a lo largo de esta carrera lo cual nos hace inseparables. Sin dejar aun lado a Pepe y Lore. A todos aquellos que se fueron sumando a este circulo, como el buen Erick, Alejandro y Andrés. Adair, Paty, Imelda, Karla...
- Bueno a todos aquellos que han sido parte fundamental de mi vida, una disculpa a todos los que no nombre pero no alcanzan las Palabras para agradecer a cada uno, pero saben que han sido un pilar y comparto con ustedes este logro.
- Un agradecimiento especial a esa persona que es parte importante en este momento y tiene una parte de mi corazón, a mi novia, amiga incondicional e inseparable Magali Castellanos, gracias por el apoyo a lo largo de estos años que llevamos juntos y conociéndonos.
- A todos aquellos que ayudaron a mi formación Personal y Profesional simplemente...

**¡¡GRACIAS!!**

## CONTENIDO

<b>1. RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1 La Medicina Tradicional Mexicana</b> .....	<b>3</b>
<b>3.2 La Flor de Manita, Distribución en el Valle de México y Descripción Botánica</b> .....	<b>4</b>
<b>3.3. Usos Medicinales de la Flor de Manita (<i>C. pentadactylon</i>)</b> .....	<b>7</b>
<b>3.3.1 Estudios Realizados Sobre la Flor</b> .....	<b>8</b>
<b>3.4 Farmacología y Toxicología</b> .....	<b>9</b>
<b>3.5 Estudios de Toxicidad</b> .....	<b>10</b>
<b>3.6 Reacciones Antígeno-Anticuerpo</b> .....	<b>16</b>
<b>3.6.1 Técnicas Utilizadas en la Determinaciones Antígeno-Anticuerpo</b> .....	<b>22</b>
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>29</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>30</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
<b>7. MÉTODO</b> .....	<b>32</b>
<b>7.1 Procedimiento</b> .....	<b>32</b>
<b>7.2 Determinación en Sueros</b> .....	<b>34</b>
<b>A) DETERMINACIÓN DE CERULOPLASMINA POR INMUNODIFUSIÓN RADIAL</b> .....	<b>34</b>
<b>B) DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR METODO DE GRIESS</b> .....	<b>35</b>
<b>C) DETERMINACIÓN POR ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA</b> .....	<b>37</b>
<b>7.3 Diagrama de Flujo</b> .....	<b>40</b>
<b>8. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
<b>9. ANÁLISIS DE RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b> .....	<b>49</b>
<b>11. SUGERENCIAS</b> .....	<b>50</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>51</b>

## 1. RESUMEN

En este trabajo se realizó la evaluación de la toxicidad del extracto acuoso de la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*). Para lo cual se utilizaron ratones CD 1. Divididos en dos grupos, uno control y otro de prueba. Obteniendo resultados positivos, los cuales se encuentran en el apartado de Resultados al final de este escrito. La flor de manita presento una alta toxicidad, lo cual llama la atención debido a que esta planta es muy utilizada empíricamente en la medicina tradicional mexicana.

## 2. INTRODUCCIÓN

En la antigüedad, los pueblos prehispánicos de nuestro país debido a su amplio contacto con la naturaleza y con base en su experiencia con las enfermedades frecuentes que les afectaban, adquirieron grandes conocimientos sobre las propiedades curativas de las plantas, sabiéndolas aprovechar al máximo. En la actualidad, la ciencia química y médica se han enfocado a comprobar los efectos y las propiedades de algunas plantas que el mundo prehispánico descubrió. Por lo que, es importante continuar ampliando los conocimientos sobre las plantas medicinales; en particular de la flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).

Se ha investigado poco sobre las propiedades toxicológicas de la flor de manita, Se afirma que uno de sus componentes de color rojo es un glucósido cardíaco, pero no se tiene certeza de su actividad biológica.

Los estudios de toxicidad constituyen hoy día una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco y se extienden prácticamente a lo largo de todo el proceso. El objetivo es evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas.

Y no se limitan sólo a los fármacos sino que la mayor parte de las sustancias químicas (pesticidas, agroquímicos, cosméticos, plásticos) y plantas medicinales como es en este caso. Son objeto de estudios de toxicidad iguales o más complejos que los realizados con los nuevos fármacos.

Por otro lado, no se han reportado datos recientes acerca de la actividad biológica de la flor de manita, ni de la evaluación de su efecto terapéutico o sobre su toxicidad, por esta razón la presente investigación se centra en contribuir con más datos sobre esta flor, que es usada desde tiempos ancestrales y que sirve para satisfacer las necesidades de la población que la utiliza como medicina alternativa, en los problemas cardíacos o como tranquilizante (ansiolítico), proporcionando así nueva información en los estudios sobre la medicina tradicional mexicana.<sup>1-3,6</sup>

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 La Medicina Tradicional Mexicana

Entre los elementos que conforman una cultura, la medicina (la explicación de la enfermedad y la curación, los materiales curativos, los sistemas de diagnóstico, los de transmisión de conocimiento y mucho otros) no es sino una parte del todo. Lo anterior implica también la necesidad de insistir en que las plantas deben analizarse en sí, separarse con propósitos metodológicos, pero no descontextualizarse del sistema de salud en el que están inmersas. No son entonces, exclusivamente fuentes de materia prima o de principios activos, tampoco exclusivamente mercancías, son eso y más. Conviene tenerlo presente si queremos sumar esfuerzos para la profundización de estos saberes y la persistencia de este sistema médico.<sup>5</sup>

La medicina tradicional es uno de esos ámbitos donde los médicos indígenas manejan sus elementos culturales (cosmovisión, ideas de salud y enfermedad, recursos diagnósticos y terapéuticos, entre otros.), y son capaces de reproducirlos además de que implica una toma de decisiones entre médicos y pacientes, quienes ejercen un notable control cultural sobre el proceso de reestablecimiento de la salud. Por otra parte, la información del siglo XVI, provenientes de voces indígenas, se asemeja a las actuales voces indígenas, lo que nos muestra la persistencia y fortaleza de esta medicina.<sup>5</sup>

La terapéutica manejada de esta medicina se basa principalmente en la preparación de infusiones en forma de té, para su administración oral; dependiendo del tipo de planta utilizada, se acompaña un ritual según el médico que recomiende. Estos rituales se adaptan a la región donde se utiliza la medicina tradicional y según en cada caso, la preparación se administra con otros componentes como lo son, sangre de conejo o codorniz, piel de víbora etc. Ya que son conocimientos ancestrales y potenciadores de la preparación.<sup>5</sup>

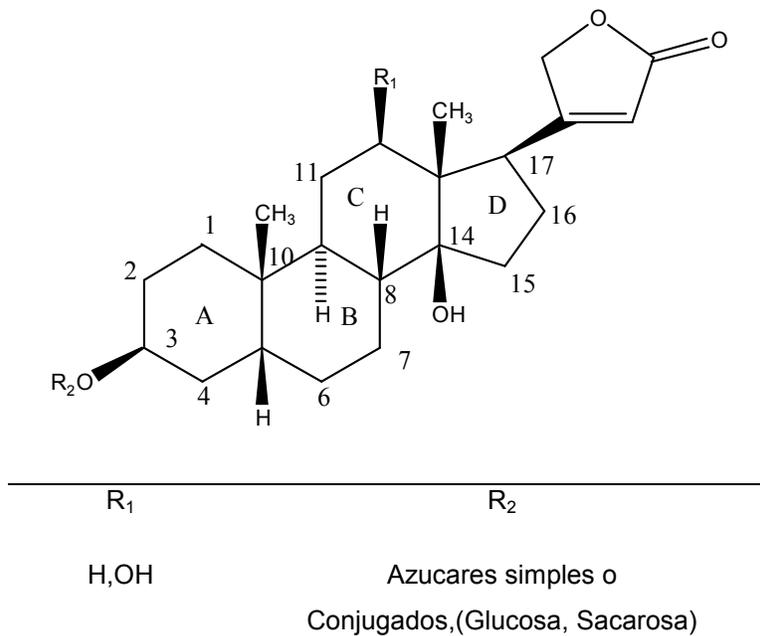
En México existen aproximadamente 30000 especies vegetales<sup>4</sup>; agrupadas en 220 familias y 2410 géneros. El 50 por ciento de las especies son utilizadas para satisfacer necesidades humanas con potencial medicinal, tan solo las plantas medicinales son 3500 especies y ocupan el principal porcentaje. De este total, aproximadamente el 11 por ciento (400 especies) se comercializan en mercados de la Ciudad de México. Entre las especies que se comercializan esta la flor de manita ***Chiranthodendron pentadactylon* (C. pentadactylon)**.<sup>4,5</sup>

La flor de manita (***C. pentadactylon***) es una especie que se ha utilizado en México desde tiempos prehispánicos<sup>4</sup>. Para las culturas antiguas era considerada una especie especial, sumamente importante y se creó que tenía un gran valor ritual. En la actualidad se sigue utilizando para combatir enfermedades cardíacas y del sistema nervioso;<sup>7</sup> Las plantas medicinales en México deben someterse a una investigación a fondo en el ámbito agronómico, físico, químico, farmacológico y/o biomédico.<sup>6,7</sup>

### **3.2 La Flor de Manita, Distribución en el Valle de México y Descripción Botánica**

Se han realizado estudios químicos y biológicos sobre los compuestos de la flor de manita, a pesar de que se dice que posee glucósido cardíaco, no se tiene certeza de la presencia de éste ni de su actividad cardíaca o de su efecto tóxico.<sup>8</sup>

Los glucósidos cardíacos son compuestos esteroideos que tienen efecto sobre el funcionamiento eléctrico y mecánico del corazón, siendo su principal efecto terapéutico la capacidad de aumentar la contractilidad cardíaca (inotropismo positivo) para la insuficiencia cardíaca congestiva, los esteroides contienen un anillo lactónico<sup>9</sup> poseen esencialmente la actividad cardiotónica. Como se observa en la figura 1.



**Figura 1. Ejemplo de la estructura general de un cardiotónico**

En la población y distribución de Chapingo se encuentran cinco árboles de flor de manita que fueron donados por Miguel Ángel de Quevedo y trasplantados por Baltasar Cuevas Alemán por los años 40's, donde se observa muy poca floración del fruto en el árbol, tal vez por falta de polinizadores.

En San Miguel Tlaixpan, otro poblado de Texcoco, se pueden encontrar 30 árboles cuya producción de la flor para su venta en los mercados para uso medicinal exclusivamente. Éstos árboles son ejemplares traídos desde Oaxaca probablemente hace 200 años. También se encuentran árboles en el parque Golden Gate de San Francisco en Estados Unidos.<sup>4-9</sup>

La altura promedio que alcanzan éstos árboles es de 15 metros; sin embargo, se han encontrado ejemplares desde los 10 hasta los 30 metros de altura. Las ramas, especialmente cerca de las hojas están revestidas de tomento (capa de pelos de recubrimiento en las ramas) compuesto de pelos estrellados y en conjunto tienen un color ferruginoso; su madera es frágil, la corteza del tronco es lisa y de color café como se observa en la figura 2.

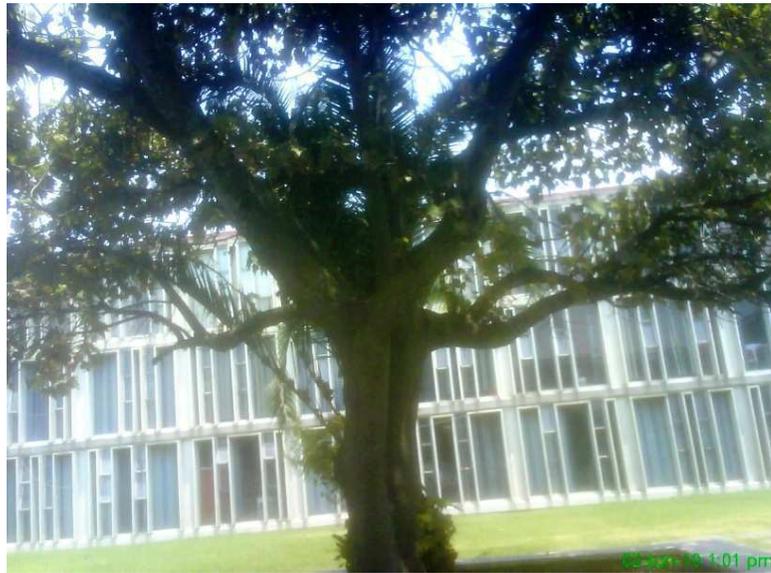


Figura 2. Árbol de manita, uno de los ejemplares jóvenes de la Universidad Autónoma Chapingo

Se caracteriza por tener hojas simples, vellosa ferruginosa. La flor se distingue por ser solitaria, de cáliz acampanado (dividido en cinco partes), rojo verdoso de 3.5 a 4.5 cm de largo, estambres, filamentos unidos en una columna, las anteras (dos por estambre) se extiende hacia fuera dando el aspecto de dedos de una mano como se observa en la figura 3.

Los estambres unidos por su base que forman un tubo cilíndrico ensanchado en la parte inferior por donde se une el perianto son de color rojo brillante y más que el aspecto de una mano asemejan una garra de ave.



Figura 3. Morfología de la flor de manita en su rama y con hojas.<sup>24</sup>

### 3.3. Usos Medicinales de la Flor de Manita (*C. pentadactylon*)

Desde tiempos ancestrales se tiene evidencia del uso de esta planta para diferentes malestares y enfermedades.<sup>4</sup>

Se dice que: “Cuando hay dolor se unge con el líquido preparado de corteza y hojas de árbol flor de manita, zarzal, hierbas de toluhuaxihuitl y xiutonli, navaja de indias, pedernal, un fruto de tetzapotl y piedra texoxocotli, todo ésto molido en sangre caliente de golondrina, lagartija y ratón”. Esta receta se encuentra en el manuscrito azteca de 1552 de Martín de la Cruz, según su traducción latina de Juan Badiano y publicado por el Instituto Mexicano del Seguro Social en 1964. Estos manuscritos son la base de la terapéutica que hoy en día se lleva a cabo en la medicina tradicional mexicana, ya que no hay estudios fehacientes que demuestren el efecto real de la flor de manita.

En el mercado de Sonora se recomienda su uso para los nervios y el corazón, combinada con el yoloxóchitl (*Talauma mexicana*), magnolia (*Magnolia sp*), los tres toronjiles, el blanco y el morado (*Agastache mexicana*) y el azul, azahar (*Citrus spp*), tomada en té cuando sea necesario. Para calmar los nervios se recomienda preparar un té con hinojo, flor de manita, tila azahar de naranja o de limón, toronjil rojo y blanco, toronjil azul y menta (*Menta piperita*).<sup>4,5,10</sup>

No hay un estudio definido de la terapéutica de la flor de manita, pero en el departamento de Fitotécnia de la Universidad Autónoma de Chapingo en su séptimo taller de plantas medicinales de 1994, publicando su trabajo hasta 1996, dan un tratamiento un poco más específico del uso de la flor de manita. El cual es el siguiente: Para trastornos nerviosos hervir una cucharadita de flores fragmentadas y cápsulas sin semilla en medio litro de agua, durante 10 minutos. Tomar endulzada al gusto una o dos tazas media hora antes de acostarse, una semana continua, alternar posteriormente cada tercer día y después una o dos veces por semana.<sup>4, 5,10</sup>

Existe un ensayo biodirigido en el 2009 sobre dos compuestos aislados de la flor, la catequina y epicatequina con actividad anti-secretora de la toxina de *Vibro cholerae*, pero no se reportan datos sobre su toxicidad o efecto terapéutico relacionado al uso empírico en la medicina tradicional mexicana de la flor de manita.<sup>31</sup>

### 3.3.1 Estudios Realizados Sobre la Flor

Lara y Márquez en 1996 citan los compuestos obtenidos de la flor de manita por Domínguez y Gutiérrez<sup>3</sup> en 1972, estos se presentan a continuación en el cuadro 1.

**Cuadro 1. Compuestos aislados de la flor de manita**

<b>Nombre</b>	<b>Tipo de compuesto</b>
<b>Octaseno</b>	Alqueno
<b>Éster alifático</b>	Éster
<b>Glucosa</b>	Carbohidrato
<b>β-sitosterol</b>	Esterol, flavonoide rojo
<b>Dacosanol β-1</b>	Alcohol
<b>3-glucósido de cianidina</b>	Glucósido
<b>Leucocianida</b>	Flavonoide
<b>7-glucosido de luteolina</b>	Glucósido
<b>3-glucósido de quercetina</b>	Glucósido
<b>Gosipetina</b>	Glucorónido
<b>3-glucorónido de gosipetina</b>	Glucorónido
<b>Ácido gálico</b>	Ácido
<b>Triglucósido de apigenidina</b>	Glucósido, antocianina
<b>Sacarosa</b>	Carbohidrato

Existen pocas referencias sobre el estudio de los componentes químicos de la flor de manita, Sodi y Martínez<sup>11</sup> en 1948 realizaron un estudio nombrado “Estructura de pigmento *Macpaloxóchitl*” quienes concluyeron que el pigmento de la flor de manita está compuesto de una aglicona, más tres moléculas de glucosa y tres de ácido gálico. En este trabajo al analizar el pigmento rojo se identificó el componente, cuya fórmula fue  $C_{54}H_{53}O_{31}Cl$ , del cual, el producto de la hidrólisis indicó tres moléculas de glucosa y una aglicona conocida como cloruro de epigenina ( $C_{15}H_{11}O_4Cl$ ) así como tres moléculas de ácido gálico, por lo que se dice que el pigmento rojo es un glucósido cardíaco.<sup>4,10</sup>

En otros análisis químicos de las flores de los árboles de la manita, realizados por Domínguez y Gutiérrez<sup>3</sup> en 1972, tomando como referencia su trabajo de 1962, mencionan que a las flores secas, les realizaron extracciones sucesivas con éter de petróleo y etanol. De los cuales, los extractos los aplicaron en silica gel, dónde obtuvieron los compuestos de octaseno, octaseno, sitosterol.

Actualmente no hay suficientes reportes del estudio sobre la flor de manita (***C. pentadactylon***), ni de su actividad farmacológica o toxicológica.

### 3.4 Farmacología y Toxicología

La **farmacología** se define como el estudio de sustancias o fármacos que interactúan con sistemas vivientes por medio de procesos químicos, en especial cuando se unen con moléculas reguladoras, y activan o inhiben procesos corporales normales. Estas sustancias se administran para alcanzar un efecto terapéutico benéfico sobre algún proceso en el paciente; o por sus efectos tóxicos en procesos regulatorios en parásitos que infectan al mismo. Estas aplicaciones terapéuticas deliberadas pueden considerarse como la función de la farmacología médica, que a menudo se define como la ciencia de las sustancias empleadas para prevenir, diagnosticar y tratar enfermedades. Mientras que la **toxicología** es la rama de la farmacología que estudia los efectos indeseables de las sustancias químicas en los sistemas vivos, desde las células individuales hasta los ecosistemas complejos.<sup>6</sup>

La toxicología es una ciencia que identifica, estudia y describe, la dosis, la naturaleza, la incidencia, la severidad, la reversibilidad y generalmente, los mecanismos de los efectos tóxicos que producen los xenobióticos (o sustancias ajenas al cuerpo). La toxicología también estudia los efectos nocivos de los agentes químicos, biológicos y físicos en los sistemas biológicos y que establece, además, la magnitud del daño en función de la exposición de los organismos vivos a dichos agentes.<sup>12</sup>

La toxicología moderna va más allá de los estudios de los efectos adversos de los agentes exógenos al cuerpo hasta la biología molecular, utilizando como herramienta sustancias tóxicas. Históricamente la toxicología fue la base de la terapéutica y la medicina experimental. La Toxicología continúa desarrollando y ampliando (desde 1900 hasta la actualidad) mediante la asimilación de conocimientos y técnicas de la mayoría de las ramas de la Biología, Química, las Matemáticas y la Física. Una adición reciente al campo de la toxicología es la aplicación de esta disciplina para la evaluación de seguridad y riesgos de sustancias utilizadas comúnmente.<sup>13, 14</sup>

Las contribuciones y actividades son muy diversas y extendidas. En el área biomédica, a los toxicólogos les corresponden evaluar los mecanismos de acción por la exposición a productos químicos como causa de enfermedades agudas y crónicas. Los estudios toxicológicos contribuyen a la fisiología y farmacología mediante el uso de productos

tóxicos para entender los fenómenos, los factores fisiológicos que están involucrados en el reconocimiento, identificación y cuantificación de los riesgos derivados de la exposición laboral a productos químicos, en los aspectos de salud pública de los productos químicos del aire, el agua, plantas y hierbas comestibles y medicinales así como medicamentos y diversos alimentos.

Tradicionalmente los toxicólogos han estado íntimamente involucrados en el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos, aditivos alimenticios, productos naturales y pesticidas. Los toxicólogos también participan en la elaboración de normas y regulaciones diseñadas para proteger la salud humana y el medio ambiente de los efectos adversos de las sustancias.<sup>13-17</sup>

### **3.5 Estudios de Toxicidad**

Como ya se mencionó la toxicología es una rama de la farmacología que identifica, estudia y describe, la dosis, la naturaleza, la incidencia, la severidad, la reversibilidad y generalmente, los mecanismos de los efectos tóxicos que producen los xenobióticos (o sustancias ajenas al cuerpo). En este trabajo se abordaran temas relacionados al estudio de dichas sustancias y modelos animales para evaluar el efecto de las sustancias sobre el cuerpo y su posible daño al organismo.<sup>6</sup>

#### **Las vías de ingreso al organismo de estas sustancias xenobióticas son:**

Respiratoria: Es la más común y la mayor vía para el ingreso de contaminantes o xenotóxicos, los contaminantes llegan rápidamente al organismo a través de los pulmones y luego al resto del cuerpo por medio del torrente sanguíneo. Debemos tener presente que no solo una sustancia en estado gaseoso puede ser inhalada, también pueden ser líquidos (aerosoles) y sólidos (polvo en suspensión), para evitar el ingreso de este agente al organismo se deben utilizar protectores respiratorios con un filtro adecuado al agente contaminante.

Oral o Enteral (Digestiva): Podemos ser afectados no solo por ingerir directamente el producto sino por otros elementos contaminados los cuales llevamos a la boca y nariz.

Cutánea: Se produce en el momento que ingresan los contaminantes por los poros y estos a su vez llegan al torrente sanguíneo. Los efectos no necesariamente se

presentarán de forma inmediata (Estado de Latencia), se debe tener especial cuidado cuando se produce una lesión con algún elemento contaminado ya que de esta forma el agente tiene acceso directo a nuestro organismo, la piel deja de ser nuestra capa protectora.<sup>15-17</sup>

Los estudios de toxicidad constituyen hoy día una parte muy importante dentro del desarrollo de un nuevo fármaco y se extienden prácticamente a lo largo de todo el mismo. El objetivo de los mismos es evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas o crónicas.

Y no se limitan sólo a los fármacos sino que la mayor parte de las sustancias químicas industriales (pesticidas, agroquímicos, cosméticos, plásticos, etc.) son objeto de estudios de toxicidad iguales o más complejos que los realizados con los nuevos fármacos.

En este sentido, muchas veces es difícil separar efecto tóxico del efecto farmacológico. Ya en el siglo XVI, Paracelso afirmaba que "todas las sustancias son tóxicas y ninguna sustancia es tóxica. Sólo la dosis determina la toxicidad". Cuando se representa gráficamente, la curva dosis respuesta para un efecto en particular (efecto hepatotóxico, nefrotóxico, mutagénico, embrio-tóxico, etc.) presenta una forma sigmoideal, siendo de particular interés examinar

-La forma de la curva dosis respuesta

-Las respuestas a dosis bajas del agente

-La naturaleza de las respuestas a dosis altas

-La pendiente de la parte recta de la curva acentuada = alta toxicidad (A); reducida = baja toxicidad (B);<sup>13-15</sup> como se observa en la figura 4

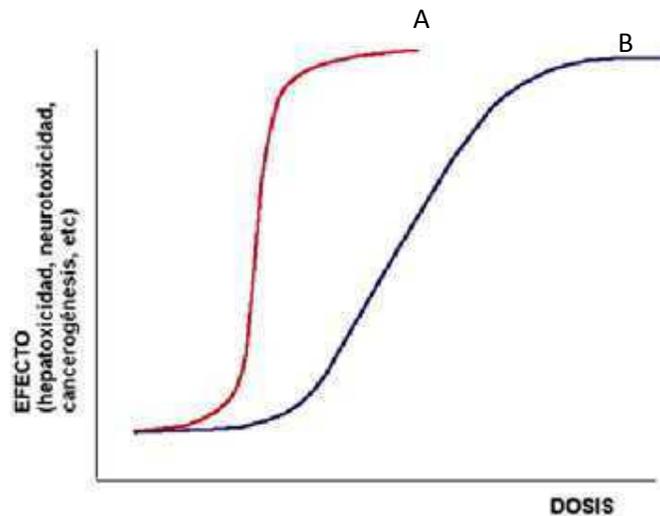


Figura 4. Curvas dosis-respuesta<sup>14</sup>

Independientemente de las directrices de los organismos o dependencias de salud para proteger al ser humano, se dispone de dos vías para evaluar la posible toxicidad o efectos adversos de un fármaco.

- La primera de ellas se refiere al uso de animales de especies adecuadas para determinar los efectos adversos en condiciones controladas. Las desventajas de estos estudios son dobles:
  - A veces es difícil extrapolar de los animales al hombre (recuérdese el caso de la talidomida no presenta efectos dismorfogénicos en la rata, aunque sí en el ratón, el conejo y el mono).
  - Es difícil extrapolar resultados a partir de las altas dosis en los animales para obtener algún efecto en comparación con las dosis mucho más bajas utilizadas en el hombre.
- La segunda vía se refiere a estudios epidemiológicos retrospectivos, que también tienen desventajas, sobre todo porque el efecto adverso ha tenido que ocurrir como consecuencia de la exposición, porque tiene que ser significativo para poder ser detectado en un número limitado de individuos y porque puede ser difícil establecer una clara prueba de causalidad.<sup>14</sup>

En general, para un fármaco a administrar de forma crónica y por vía oral (por ejemplo un antidiabético oral o un antihipertensivo) son obligatorias las pruebas siguientes:<sup>17,18</sup>

- Toxicidad aguda (por dos vías de administración y al menos en dos especies animales con una muestra mínima de 6-12 elementos para obtener datos estadísticos en todas las pruebas)
- Toxicidad subaguda (dos especies animales, vía de administración considerada en humanos, 2 a 4 semanas)
- Toxicidad subcrónica (dos especies animales, vía de administración considerada en humanos, 13 semanas, 1 semana de recuperación)
- Toxicocinética (una o dos especies, 2 a 4 semanas)
- Toxicidad crónica (dos especies animales, vía de administración considerada en humanos, entre 6 meses y 1 año, 4 semanas de recuperación)
- Carcinogénesis (dos especies animales rata y ratón, vía de administración oral, entre 18 meses y 2 años)
- Teratogenia (dos especies animales rata y conejo, vía de administración considerada en humanos, administración del fármaco durante la gestación)
- Fertilidad (una especie animal rata, machos y hembras, administración antes y después del apareamiento)
- Toxicidad peri y post-natal
- Mutagenesis: análisis de sistemas bacterianos con o sin activación microsomal

Hay que añadir los estudios previos para determinar las dosis, en particular al inicio de los estudios de toxicidad subaguda, cuando se añade el fármaco a la dieta, estudios de teratogenia, fertilidad, además de algunas pruebas de mutagénesis.

Adicionalmente, según el tipo de fármaco, pueden ser necesarios algunos análisis adicionales como son:

- Toxicidad por inhalación (p. Ejemplo para un fármaco a administrar vía aerosol)
- Irritación ocular
- Irritación dérmica
- Irritación intravenosa, intraarterial o perivenosa
- Fototoxicidad.<sup>15-17</sup>

## Toxicidad Aguda

La toxicidad aguda tiene por objetivo determinar los efectos de una dosis única y muy elevada de una sustancia. Usualmente, el punto final del estudio es la muerte del animal se expresa por la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) que viene a representar más o menos la dosis de la sustancia que produce la muerte en el 50% de los animales.

La observación de los animales se lleva a cabo después de la administración de la sustancia y dura hasta 14 días, después de los cuales los animales son sacrificados y autopsiados. En general, el estudio se realiza con 5 grupos de 10 animales de cada sexo, aunque existen algunos métodos abreviados que intentan reducir el número de animales a sacrificar.

La determinación de la DL<sub>50</sub> suele llevarse a cabo en rata y ratón por al menos dos vías de administración entre las cinco posibles: intravenosa (IV), Intramuscular (IM), intraperitoneal (IP), subcutánea (SC) „y ora (VO)l. En el perro y otros animales de tamaño parecido, el punto final del estudio no suele ser la muerte del animal, sino la determinación de la dosis que produce severos efectos.<sup>6,13,14,18</sup>

Para la fase rápida en la determinación de toxicidad aguda sin determinar DL<sub>50</sub> se determinan de acuerdo a su peso, animal de experimentación y tóxico de prueba en rangos de 5-50mg/Kg; 50-500mg/Kg sin exceder los 2g/Kg en dosis única a administrar.<sup>13,16-18</sup>

Para este estudio se utilizan las normas que marca en los Estados Unidos la FDA Administración de Fármacos y Alimentos para estudios de toxicidad aguda. Los cuales son similares a los anteriormente descritos.

Para ello se requiere un estudio con 10 animales durante 7 días en fase rápida sobre ratones, de 25-30g de peso, sin importar sexo separados por dos grupos, control y prueba a 100mg/kg de peso administrando en una sola dosis, observando cambios de comportamiento mortandad de los mismos, reportando cada anomalía en los animales de experimentación.<sup>16-18</sup>

## **Toxicidad Subaguda**

En estas pruebas, la administración del fármaco se lleva a cabo diariamente durante periodos que oscilan entre 15 días y 4 semanas. Los principales organismos de salud requieren, antes de autorizar la administración de una dosis única de la sustancia al ser humano, que se hayan realizado estudios de toxicidad subaguda en dos especies animales, una de las cuales deberá ser no roedora. En ambas especies, se suelen utilizar entre 4 y 5 dosis de sustancia (vehículo, dosis baja, media - dosis alta o vehículo - dosis baja -dosis media baja - dosis media alta - dosis alta).

En la rata se requieren al menos 10 animales de cada sexo para cada dosis y en el perro, al menos 4 animales de cada sexo. Muy frecuentemente, se añaden dos grupos satélite de animales (uno tratado con vehículo y otro con la dosis más alta) que no son sacrificados al final del estudio, sino que se les deja una o dos semanas para recuperarse de las posibles lesiones inducidas por el producto.

Durante el estudio se controlan diariamente un buen número de parámetros (aspecto, comportamiento, peso, consumo de agua y alimento, (Electro Cardio Grama (ECG), examen oftalmoscópico, etc) y al final los animales son sacrificados y autopsiados. Al inicio del estudio y antes de la autopsia, se toman muestras de sangre y orina para ser analizadas. La autopsia consiste en el examen macroscópico de las vísceras y tejidos y en la toma de especímenes para su examen anatomopatológico.

## **Estudios de Toxicidad Subcrónica y Crónica**

Básicamente, estos estudios tienen características similares a los anteriores en cuanto al número de animales, número de dosis, observaciones, entre otros. Los estudios de toxicidad subcrónica suelen durar 3 meses, mientras que los de toxicidad crónica suelen durar 6 meses o un año, según el uso terapéutico que vaya a tener la sustancia.

Es importante decidir la forma de administrar la sustancia a los animales durante estos períodos tan largos. Si la administración con una sonda gástrica no suele ocasionar problemas en tratamientos cortos, el estrés o la posibilidad de accidentes con el sondaje deben ser considerados frente a la mayor imprecisión y otros problemas que conlleva el administrar el fármaco mezclado con el alimento (rechazo del alimento, dilución de la dosis en el tiempo, absorción diferente)

Para este estudio se utilizan las normas que marca la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos) para estudios de toxicidad crónica y subcrónica. Los cuales son similares a los anteriormente descritos.

Para ello se requiere un estudio con 20 animales durante 28 días si es subcrónica y 90 días si es crónica en fase rápida sobre ratones, de 25-30g de peso, sin importar sexo separados por dos grupos, control y prueba a 50mg/kg de peso administrando diariamente, observando cambios de comportamiento mortandad de los mismos, reportando cada anomalía en los animales de experimentación.<sup>16-18</sup>

### 3.6 Reacciones Antígeno-Anticuerpo

La inmunología es la ciencia que estudia los procesos moleculares y celulares implicados en la defensa de la integridad biológica del organismo a través de la identificación de sustancias propias, detección de las sustancias extrañas y de su destrucción. En cada organismo, los mecanismos de defensa son muy diversos y heterogéneos, aunque siempre existe una actuación integrada de todos ellos. Los mecanismos de defensa pueden ser de dos tipos: específico e inespecífico. Los mecanismos inespecíficos están constituidos por las barreras naturales, los mecanismos específicos son por barreras celulares internas de cada organismo.<sup>19-22</sup>

Como observamos en la figura 5.

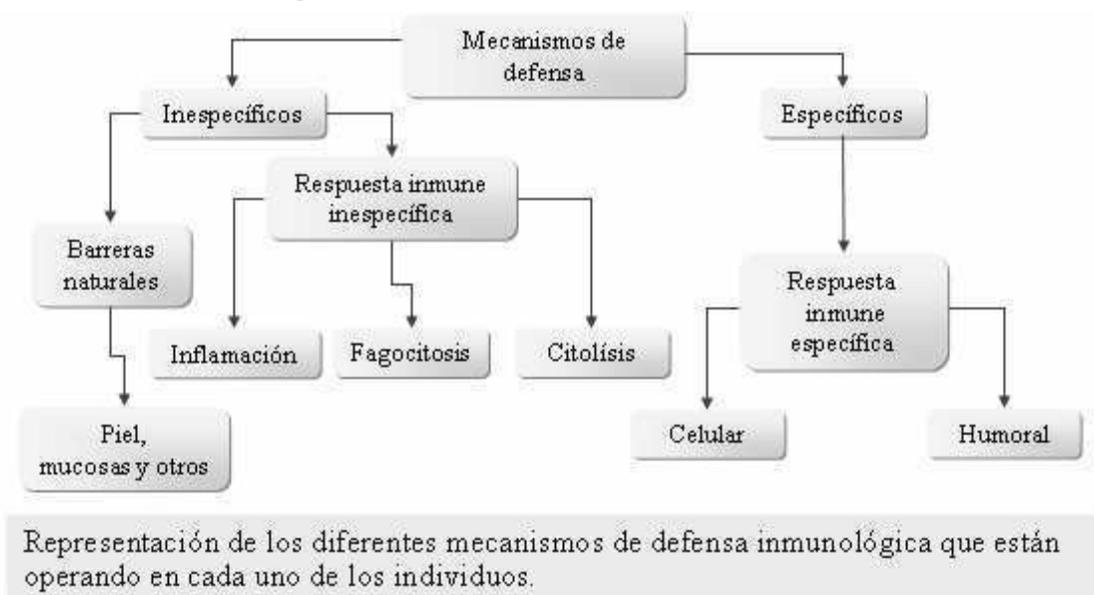


Figura 5. Esquema de los mecanismos de defensa

Entendemos por respuesta inmune a todos aquellos eventos desarrollados por el sistema inmune (mecanismos de defensa) a la acción de defender la integridad biológica del individuo frente a cualquier agresión (estímulo antigénico).<sup>21</sup>

A todas las sustancias que tienen la capacidad de estimular al sistema inmune, se conocen como antígenos. Generalmente el sistema inmune responde de forma unitaria, por lo que la división en respuesta específica e inespecífica es más teórica que real. Lo que si ocurre es que, dependiendo de las circunstancias, en unos casos predomina una u otra de estas modalidades de respuesta inmune.

Esta respuesta es activada también cuando hay algún daño tisular, daño en órganos o alguna alteración de la función celular normal. Muchos de estos daños inician con la inflamación y la activación del sistema inmune, por lo que es conveniente explicar el funcionamiento del mismo. La inflamación es la encargada de focalizar los mecanismos inmunológicos protectores en una región localizada dentro del tejido.<sup>21,22</sup>

La inflamación genera una respuesta de los vasos sanguíneos y de las células endoteliales que los delimitan; sirve como función protectora importante pues activa los procesos de defensa, sanación y reparación, ésta puede desencadenarse no sólo en presencia de infección microbiana, sino también de trauma contuso (golpes), quemaduras por agentes físicos o químicos, laceraciones, trauma por radiación, obstrucción vascular, entre otros.<sup>23</sup>

La inflamación se caracteriza por la presencia de calor, rubor, edema, dolor y en algunos casos pérdida de la función celular; en la inflamación aguda, los vasos sanguíneos se dilatan, razón por la cual se presenta calor y rubor en el área; el edema se produce por el escape de fluidos y células al tejido extravascular. El dolor y la pérdida de función que acompañan a la inflamación se deben a la presión ejercida en las terminales nerviosas por la acumulación de líquido extravascular y a la liberación de mediadores químicos.<sup>23</sup>

El proceso inflamatorio se caracteriza por las siguientes fases:

- Fase silenciosa; las células residentes del tejido dañado liberan los primeros mediadores inflamatorios.

- Fase vascular; en la que existe vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular.
- Fase celular; comienza cuando del sistema inmune se dispara y hay infiltración de leucocitos al tejido dañado.
- Fase de regulación; ocurre cuando el fenómeno inflamatorio integra una serie de mecanismos inhibidores tendientes a finalizar o equilibrar el proceso.
- Fase de reparación; ésta se inicia cuando la células viables del sitio de inflamación o cercanas al mismo comienzan a proliferar para retornar la estructura y la función normal del tejido, formación de cicatriz y función tisular alterada, formación de abscesos o bien persistencia del proceso inflamatorio crónico.<sup>23</sup>

Cuando un agente inflamatorio persiste, ya sea por suresistencia a la degradación metabólica o por la incapacidad de un sistema inmune de eliminar un microorganismo infeccioso, hay un predominio de monocitos, linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, que comienzan la inflamación crónica. La función que cumplen los monocitos y macrófagos es doble: por un lado, la de fagocitar, ingerir o degradar microorganismos, desechos celulares y neutrófilos degenerados y, por el otro lado, la de modular la respuesta inmune y la función de las células T a través de la presentación de antígenos y la secreción de citocinas específicas. Posteriormente, los monocitos y macrófagos tienen la función de modular la etapa de cicatrización y reparación secundaria a la secreción de citocinas (proteínas reguladoras de funciones celulares para generar otras células, su principal función es la regulación de las mismas en el proceso inflamatorio) que afectan a las células parenquimales (tisulares).<sup>22,23,24</sup>

De acuerdo al grado de daño, el tejido afectado puede recuperar su estructura y función normal o pasar a una reparación en la cual se realiza un proceso de fibrosis obteniendo una estructura y función alterada. Si el daño persiste, los macrófagos pueden cambiar la respuesta por una reacción de hipersensibilidad retardada, en la cual la morfología de los macrófagos es variable, ya que muchos poseen un aspecto de activados, algunos forman colecciones (células epitelioides) y otros se fusionan para formar células

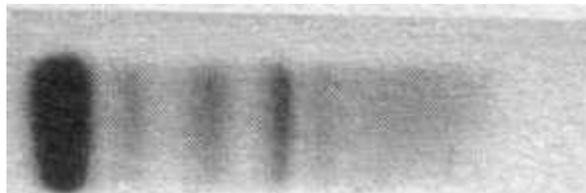
gigantes. Si interviene una respuesta inmune adaptativa, también puede haber linfocitos con diversos aspectos<sup>19-24</sup>

Los anticuerpos son un conjunto heterogéneo de proteínas que se producen por la estimulación antigénica del sistema inmunológico y que tienen la propiedad de reaccionar, específicamente, con el antígeno inductor de su producción. Todos los anticuerpos incluyen en su molécula una cierta cantidad de carbohidratos, así que estrictamente hablando se trata de una glicoproteína, aunque la porción del carbohidrato no participa en su actividad de anticuerpo. Algunas de las cadenas de glicoproteínas que actúan como anticuerpos son las Inmunoglobulinas (Igs).<sup>24,25</sup>

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que actúan como anticuerpos. Pueden encontrarse circulando en sangre, en las secreciones o unidas a la superficie de las membranas de los linfocitos B.<sup>25</sup>

Las inmunoglobulinas se producen como respuesta a la detección de moléculas extrañas en nuestro cuerpo. Estas moléculas extrañas que desencadenan la producción de anticuerpos se denominan antígenos.

Las inmunoglobulinas circulantes aparecen en una electroforesis del plasma formando parte de la fracción de las proteínas plasmáticas de las gamma globulinas.<sup>25</sup> Como se observa en la imagen 6.

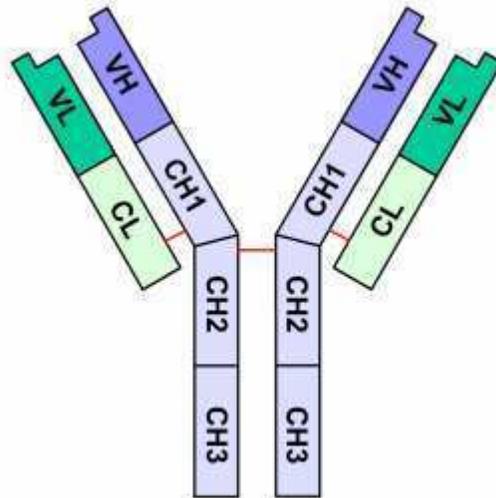


**Imagen 6. Electroforesis de las inmunoglobulinas; proteinograma<sup>25</sup>**

Se distinguen diversos tipos de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Desde el punto de vista estructural, todas ellas tienen en común que su unidad básica está formada por dos pares de cadenas peptídicas: un par de cadenas ligeras (cadenas L) con unos 220 aminoácidos cada una, y un par de cadenas pesadas (cadenas H) formadas por unos 440 aminoácidos cada una.<sup>21,22</sup>

Estas cuatro cadenas están ligadas por enlaces bisulfuro entre residuos de cisteínas que forman parte de las cadenas peptídicas. Cada cadena L está enlazada por este tipo de enlaces a una cadena H y cada cadena H está ligada por ellos a una cadena L y a la otra cadena H.

En la figura 7 se muestra a las cadenas H en azul, a las cadenas L en verde y a los enlaces bisulfuro entre las cadenas como líneas rojas (no se representan en el gráfico otros enlaces bisulfuro intracatenarios)<sup>21,22,25</sup>



**Figura 7. Conformación estructural de las cadenas de un anticuerpo**

Pueden distinguirse dos regiones o dominios diferentes en las cadenas L: VL y CL, mientras en las cadenas H pueden encontrarse 4 regiones: VH, CH1, CH2 y CH3. Cada una de esas regiones está compuesta por 70 a 110 aminoácidos.

Las regiones o dominios V se denominan Variables: la secuencia de aminoácidos en esas regiones (las porciones amino terminales de las cadenas L y H) es altamente variable, y dentro de ellas, tanto en la cadena L como en la H, hay regiones hipervariables, las RDCs o regiones determinantes de complementariedad que forman los sitios de enlace con el antígeno que son complementarios a la topología del antígeno específico.<sup>21-25</sup>

La unión antígeno-anticuerpo se realiza a través de interacciones no covalentes (fuerzas de Van der Waals, puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas) y produce cambios conformacionales similares a los observados en el mecanismo de

ajuste inducido en la interacción enzima-sustrato. Ese efecto alostérico expone, en las regiones constantes de la cadena pesadas, sitios relacionados con la unión y activación de proteínas del sistema del complemento.

El sistema del complemento esta formado por al menos 11 proteínas diferentes que son activadas secuencialmente para asociarse a la membrana de la célula invasora y causar su lisis y muerte.<sup>19,20</sup>

Otra función importante del sistema del complemento es el de generar opsoninas, proteínas que estimulan la fagocitosis de la célula o bacteria invasora por neutrofilos y macrófagos.<sup>21</sup>

Hay cuatro clases de cadenas pesadas: gamma, alfa, delta, epsilon y mu.

Estas cadenas difieren en el tipo de regiones constantes que cada una tiene; por ejemplo, las cadenas gamma son similares en sus regiones constantes, pero estas son diferentes a las regiones constantes de las otras clases de cadenas pesadas.

Las inmunoglobulinas que contienen cadenas gamma se denominan **IgG**. Las Inmunoglobulinas G son las mas abundantes en el suero (600-1800 mg/dL). Estas inmunoglobulinas promueven la fagocitosis en el plasma y activan al sistema del complemento. Las IgG son el único tipo de anticuerpos que puede cruzar la placenta.<sup>25</sup>

Las inmunoglobulinas que contienen cadenas alfa se denominan **IgA**. Las IgA se encuentran principalmente en las secreciones mucosas, en las lágrimas, saliva, el calostro y la leche materna. Estas inmunoglobulinas son la defensa inicial de las mucosas contra los agentes patógenos.<sup>24,25</sup>

Las **IgM** contienen cadenas pesadas mu. Los anticuerpos tipo IgM se expresan en la superficie de los linfocitos B y se encuentran fundamentalmente en el plasma. Estos son los primeros anticuerpos producidos en cantidades significativas contra un antígeno. Las IgM promueven la fagocitosis y activan al sistema del complemento

Las **IgE** contienen cadenas pesadas tipo epsilon. juega un importante papel en las reacciones alérgicas y posiblemente en la defensa contra infestaciones por algunos parásitos intestinales, ya que se encuentra aumentada en esas situaciones.

El papel fisiológico de las **IgD** (inmunoglobulinas con cadena pesada) se desconoce. Reconoce a los antígenos en los linfocitos B que no han sido expuestos.

En resumen, las inmunoglobulinas son proteínas que actúan como anticuerpos. Ambos términos se usan indistintamente: inmunoglobulinas para expresar estructura y anticuerpos para expresar función. La estructura básica de las inmunoglobulinas es una unidad formada por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Estas unidades contienen dominios variables y dominios constantes.<sup>21,22,24,25</sup>

### **3.6.1 Técnicas Utilizadas en la Determinaciones Antígeno-Anticuerpo**

La introducción de los procedimientos basados en las reacciones inmunológicas han representado un importante avance en el análisis de sustancias de interés para el ser humano. Dentro de estos procedimientos inmunológicos, los más utilizados y prácticos son los que se basan en la especificidad de la unión Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac). La propiedad que tienen las inmunoglobulinas (Igs) de unirse a un antígeno; la especificidad de esta unión y el hecho de que pueda ser visualizado por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radiosótopos o con enzimas) hacen que estos métodos se empleen ampliamente.

Existen diversas técnicas basadas principalmente en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac.<sup>25-29</sup>

De las principales técnicas analíticas basadas en la unión Ag-Ac se encuentran: la formación de complejos por inmunoprecipitación (p.ej. difusión radial de Mancini), de aglutinado (Hemoaglutinación directa e indirecta, con látex, entre otras); técnicas inmunofluorométricas e inmunoenzimáticas, por mencionar algunas.<sup>25</sup>

Como ya se mencionó la respuesta inmune es activada también cuando hay algún daño tisular, daño en órganos o alguna alteración de la función celular normal. Muchos de estos daños inician con la inflamación y la activación del sistema inmune, por lo que es conveniente explicar el funcionamiento del mismo. La inflamación es la encargada de focalizar los mecanismos inmunológicos protectores en una región localizada dentro del tejido. Las técnicas que se describen a continuación son las utilizadas para determinar el grado de afectación de órganos a través de procesos inflamatorios.<sup>23</sup>

La ceruloplasmina es una  $\alpha_2$  globulina con una movilidad electroforética de 4.6, tiene un peso molecular de 132 kDa y un punto isoeléctrico de 4.4; su tasa normal es de 30 mg/100 mL. Esta proteína es la principal transportadora de cobre en la circulación, se sintetiza principalmente en los hepatocitos como una cadena polipeptídica simple y se secreta como una glicoproteína; pero también se encuentra en monocitos, astrocitos y células de Sertoli; se caracteriza desde el punto de vista estructural por presentar tres tipos de unión para el cobre con características espectroscópicas diferentes y desde el punto de vista funcional por catalizar la reducción de una molécula de oxígeno con formación de una de agua, sin la liberación de intermediarios potencialmente tóxicos ( $O^{2-}$ ,  $H_2O_2$ ).<sup>26,27</sup>

Algunas de sus funciones son:

- Transporte de cobre.
- Mantener la homeostasis del hierro como ferroxidasa, catalizando la conversión de  $Fe^{2+}$  en  $Fe^{3+}$
- Presenta propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica y oxidante frente a varias aminos.
- Angiogénesis
- Coagulación

### **Difusión radial (Técnica de Mancini)**

Cuando un antígeno es colocado en un orificio circular practicado en una placa de agar, al cual se adicionó anticuerpo monoespecífico, difunde en forma radial y, de acuerdo con los principios básicos de la difusión, el diámetro del halo de precipitación está en relación directa con su concentración. Si a esta operación se efectúa colocando en varios orificios de la placa cantidades variables conocidas del antígeno específico para el antisuero mezclado con el agar y se le deja a temperatura ambiente hasta que el halo de precipitación no se modifique, con los resultados obtenidos se puede confeccionar una curva relacionando el diámetro de los halos de precipitación con las

correspondientes concentraciones antigénicas. Esta curva permite calcular la concentración de ese mismo antígeno en cualquier muestra desconocida.<sup>26</sup>

La difusión radial se utiliza en la cuantificación de proteínas que se encuentran presentes en mezclas complejas como lo son los componentes del suero humano. Es indispensable disponer para ello de antisueros monoespecíficos destinados a los antígenos que se quieren valorar.<sup>26-29</sup>

### **Oxido Nítrico**

El Oxido Nítrico (NO de su nombre en inglés), es un gas incoloro, muy difusible, lábil y apolar, esta molécula se sintetiza enzimáticamente a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOs) y como agente oxidante, el oxígeno, mediante un proceso de óxido-reducción en el que el átomo de nitrógeno del grupo guanidinio de la arginina se oxida de 3 a +2, convirtiéndose en el intermediario N-hidroxi-L-arginina, posteriormente por una donación electrónica del NADPH (dinucleótido de nicotinamida y adenina fostafo), el intermediario se oxida posteriormente a ON y Citrulina.<sup>30</sup>

En las células humanas se identificaron tres isoformas de la NOs, dos de ellas, la endotelial y la neuronal están presentes en las células en todo momento y por ello se denominan formas constitutivas (cNOS), catalizan la formación de NO en bajas cantidades durante periodos cortos y pueden ser activadas rápidamente por el incremento de la concentración citoplasmática de iones calcio en presencia de calmodulina. La tercera se encuentra en los macrófagos y es inducible (iNOS), se expresa en presencia de citocinas; actúa durante periodos más largos y sintetiza cantidades mayores de NO, el cual tiene funciones importantes en el organismo como son: reducir la agregación y adhesión plaquetaria; en el sistema vascular actúa como regulador de la presión sanguínea, el NO se sintetiza en las células del endotelio en la capa de células que forma el interior de los vasos sanguíneos y actúa como vasodilatador de las arterias de mayor musculatura, así mismo impide que las células vecinas se relajen y ensanchen para poder controlar la presión sanguínea.

El exceso en la producción de NO puede provocar la relajación de las arterias y la disminución de la presión sanguínea de manera alarmante.<sup>30,31,32</sup>

Los efectos tóxicos del óxido nítrico se puede producir por la acción directa del NO sobre proteína y ADN, o bien por la combinación del NO con otros radicales como el anión superóxido, formando peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) y un radical hidroxilo, que inicia procesos oxidativos en cadena que lleva a la muerte celular.<sup>30-32</sup>

### **Enzimas TGO y TGP**

La aspartato aminotransferasa (AST) también conocida como transaminasa glutámicooxalacética (TGO) se encuentra presente en corazón, hígado y tejido muscular, esta enzima cataliza la reacción de transferencia de un grupo amino desde el L-aspartato al 2-oxoglutarato formándose L-glutamato y oxaloacetato, utiliza el piridoxal 5'-fosfato como cofactor, además puede actuar sobre la L-tirosina, L-fenilalanina y L-triptófano, encontrándose en cantidades elevadas en casos de infarto agudo de miocardio, hepatopatía aguda, miopatías, por el empleo de determinados fármacos y en cualquier enfermedad o trastorno en el cual resulten seriamente dañadas las células.<sup>33,34</sup>

La alanino aminotransferasa (ALT) se conoce también con el nombre de transaminasa Glutámico pirúvica (TGP), las aminotransferasas catalizan la formación de ácido glutámico a partir de 2-oxoglutarato mediante la transferencia de grupos amino; la ALT se encuentra en diferentes tejidos aunque sus mayores concentraciones se hallan en hígado y riñón. Se observan concentraciones séricas elevadas de ALT en hepatitis y otras enfermedades hepáticas asociadas con necrosis: mononucleosis infecciosa, colestasis, cirrosis, carcinoma metastásico del hígado, delirium tremens, así como después de la administración de algunos medicamentos como opiáceos, salicilatos o ampicilina; también pueden encontrarse concentraciones séricas elevadas de ALT en enfermedades del músculo esquelético o cardíaco.<sup>33,34</sup>

### **Electroforesis en Acetato de Celulosa**

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas por la carga eléctrica. Se basa en el movimiento de las moléculas cargadas en un campo eléctrico. Esta técnica se aplica especialmente para la caracterización y análisis de polímeros biológicos cargados, como los ácidos nucleicos y las proteínas.<sup>25</sup>

La migración de las moléculas cargadas en un campo eléctrico depende del tamaño, forma, y carga neta de la molécula.

Una molécula proteica en solución, a un pH distinto al de su punto isoeléctrico, presenta carga neta, y como consecuencia, se mueve bajo la aplicación de un campo eléctrico.

Los distintos métodos de electroforesis se diferencian fundamentalmente en el tipo de soporte que se utiliza. La separación electroforética de las proteínas séricas es un tipo de determinación que se efectúa rutinariamente en clínica para detectar determinados estados patológicos caracterizados por la alteración en la cantidad total de proteínas séricas o en alguna de sus fracciones.<sup>25,28</sup>

En resumen, puede decirse que cuando una molécula con carga se coloca en un campo eléctrico se desplazará hacia uno u otro electrodo dependiendo de: 1) su carga eléctrica, 2) su tamaño, 3) la intensidad del campo eléctrico y 4) la temperatura del medio.

La electroforesis se aplica en el campo de la Bioquímica a la separación de compuestos que poseen grupos ionizables (aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos) teniendo en cuenta que la carga neta de estas sustancias depende del pH del medio en que se encuentren. Si la molécula tiene carga positiva migrará hacia el cátodo y si tiene carga negativa, hacia el ánodo. La fuerza iónica de la solución tampón tiene una importancia fundamental en la electroforesis, puesto que cuando es baja, permite velocidades de migración de los solutos más rápido y con menor desprendimiento de calor.<sup>25,28</sup>

Las proteínas están compuestas de aminoácidos que poseen grupos ionizables (principalmente  $-\text{COO}^-$  y  $-\text{NH}_4^+$ ) pueden encontrarse cargadas positiva o negativamente, o bien permanecer eléctricamente neutras según la proporción de los diversos grupos ionizados a un determinado pH. En su punto isoeléctrico ( $pI$  ó  $pH_i$ ), la proteína tiene carga neta cero. Por debajo de  $pI$  las proteínas estarán cargadas positivamente y por encima del  $pI$  negativamente.<sup>25</sup>

Se usa para la separación y caracterización de proteínas y otras moléculas. El soporte consiste en tiras delgadas de acetato de celulosa, con propiedades de adsorción

mínimas, por lo que se evita la formación de colas y los solutos pueden ser separados en bandas bien definidas. Otras ventajas son:

- 1) La separación es muy rápida
- 2) Se pueden analizar cantidades de muestra pequeñas
- 3) Las tiras pueden hacerse transparentes
- 4) La tira se puede disolver, recuperando los componentes separados
- 5) Presentan un fondo bajo cuando se separan compuestos radiactivos.<sup>20,25,28</sup>

Entre sus desventajas figuran que captan poca agua y son más susceptibles a la evaporación en el papel. Son también más susceptibles al flujo electro-endosmótico.

Las proteínas de suero se pueden separar mediante esta técnica. Sus puntos isoeléctricos están entre 4,9 (Albúmina) y 7,4 (Gamma-globulinas). Al realizar la electroforesis con un buffer de pH = 8,6, todas las proteínas del suero tendrán carga negativa. La albúmina, al tener el punto isoeléctrico más alejado del pH, tiene más carga negativa y avanza más rápido, quedando más cerca del polo positivo que las gamma-globulinas, que migran muy poco por ser el pH próximo a su pl. Las restantes proteínas séricas quedan situadas entre estas dos.

En suero humano la composición normal es:

Albúmina ..... 54 - 62%

$\alpha$ -globulinas ..... 9 - 15%

$\beta$ -globulinas ..... 8 - 13%

$\gamma$ -globulinas ..... 14 - 19%

En el plasma de rata y la distribución de bandas es diferente, separándose sólo las  $\beta$ -globulinas y  $\gamma$ -globulinas, la albúmina y una banda proteica de mayor movilidad electroforética que la albúmina, denominada prealbúmina. En el plasma de ratón no se generan las bandas  $\alpha_2$  de las proteínas en electroforesis, ya que esta se expresan en la banda  $\alpha_1$  y  $\beta$ .<sup>25,28</sup>

Para la interpretación del proteinograma en la electroforesis debemos tener en cuenta el siguiente cuadro

**Cuadro 2. Principales componentes de suero patrón en la electroforesis<sup>25</sup>**

<b>Albúmina</b>	<b><math>\alpha_1</math> Globulina</b>	<b><math>\alpha_2</math> Globulinas</b>	<b><math>\beta</math> Globulinas</b>	<b><math>\beta</math> y <math>\gamma</math> Globulinas</b>	<b><math>\chi</math> Globulinas</b>
Albúmina	$\alpha_1$ Antitripsina	$\alpha_2$ Macroglobulinas	$\beta$ Lipoproteína	Fibrinogeno	IgG
	$\alpha_1$ Lipoproteína	$\alpha_2$ Lipoproteínas	Transferrina		IgA
	$\alpha_1$ Glicoproteína ácida	Haptoglobulina	Plasminogeno		IgM
		Ceruloplasmina	Complemento		IgD
		Eritropoyetina	Hemopexina		IgE

De acuerdo con la migración de cada proteína y por el engrosamiento o disminución de las bandas del proteinograma se puede asociar una patología, como por ejemplo el engrosamiento de las bandas gama indica una expresión de las Igs en procesos inflamatorios la IgE aumenta, pero aumenta en mayor medida los factores alfa 1 y 2. y estas combinaciones mas algunas pruebas adicionales se puede desarrollar un diagnostico adecuado.<sup>25,28</sup>

#### 4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La medicina tradicional mexicana (llamada ahora medicina alternativa) sigue siendo utilizada en nuestros días, el uso empírico de flores, plantas o hierbas nativas de nuestro país, que tienen efecto terapéutico carecen, en su mayoría, de estudios botánicos, físicos, químicos y biomédicos. Por esta razón no se ha podido llegar a una certeza médica sobre el uso de estas alternativas y sobre todo no se puede tener la seguridad y eficacia de las mismas, ya que se pueden presentar efectos tóxicos o adversos; además de que muchas personas las utilizan a la par con sus medicamentos de prescripción. De acuerdo con esto, es necesario desarrollar el estudio toxicológico de estas alternativas, ya que, si bien no pueden sustituir al medicamento de prescripción u otras plantas medicinales, pueden representar una disminución en el consumo, con el uso adecuado y certero de plantas medicinales; como lo es la flor de manita (*C. pentadactylon*), para evitar riesgos de toxicidad, ya que este tipo de productos no tienen sustento científico acerca de la seguridad y eficacia en la administración.

## 5. HIPÓTESIS

Considerando los antecedentes empíricos de la Flor de Manita (*C. pentadactylon*) a la cual también se le atribuyen propiedades cardiotónicas, entre otras. Se espera que el extracto acuoso muestre alguna respuesta positiva, como toxicidad o daño en los órganos de los ratones CD1 en el estudio del modelo agudo y subcrónico.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 General

Obtener y evaluar el efecto toxicológico del extracto acuoso de la Flor de Manita (***C. pentadactylon***) administrada por vía oral a un lote de ratones CD 1 determinando el daño en órganos afectados

### 6.2 Particulares

- Clasificar la muestra recolectada en la Universidad de Chapingo del Municipio de Texcoco en el Estado de México,, en el Herbario Nacional del Centro Médico Nacional Siglo XXI
- Obtener el extracto acuoso de la flor de manita
- Evaluar el extracto acuoso de la flor de manita mediante un modelo de toxicidad aguda y subcrónica en ratón. CD 1
- Determinar el grado de daño hepático y órganos afectados empleando técnicas inmunológicas.

## 7. MATERIAL Y MÉTODO

**Tipo de estudio:** Experimental, observacional

**Variables de control:** Extracto acuoso, ensayo biológico

**Variables de respuesta:** Efecto en el material biológico.

**Criterios de inclusión:** Ratones de 25-30g CD1, sin alguna enfermedad y biológicamente sanos

**Criterios de exclusión:** Cualquier otra especie, peso no obtenido, ratones con alguna enfermedad

**Criterios de eliminación:** Muerte durante el estudio no provocado por el compuesto prueba, escape de algún animal.

**Método estadístico.** Comparación de medias por prueba t de Student, en pesos Relativos y determinaciones serológicas

### 7.1 Procedimiento

- Revisión bibliográfica
- Recolección de la flor de manita de los árboles de la Universidad Autónoma Chapingo
- Secar las flores recolectadas a temperatura ambiente durante una semana
- Pesar las flores y moler
- Colectar las flores molidas y pesar nuevamente para obtener peso real considerando las pérdidas en la molienda
- Separar y pesar en dos partes iguales las flores molidas para colocarlas en dos tipos diferentes de extracción
- Colocar la mitad del peso de las flores molidas a extracción a reflujo durante 1 hora en 500mL de agua destilada, enfriar y filtrar por gravedad
- Al extracto obtenido a reflujo se lleva a sequedad con destilación a presión reducida
- La segunda fracción del peso de las flores molidas se coloca en 500mL de agua destilada y dejar en reposo durante una semana, en oscuridad a temperatura ambiente

- El extracto obtenido a temperatura ambiente se filtra por gravedad y se lleva a sequedad con destilación a presión reducida
- Evaluar el extracto acuso obtenido a reflujo de la flor de manita mediante un modelo de intoxicación aguda y subcrónica en ratón.
- Para el modelo de toxicidad aguda, se pesan 20 ratones CD1 y se separan en dos grupos, marcándolos de las colas, uno será el grupo control y otro el de prueba.
- Para el grupo a tratar se administró por sonda de alimentación gástrica una dosis de 100mg/Kg<sup>16-18</sup> de peso del extracto acuoso a 10 ratones, en una sola administración
- Se observa el comportamiento de los ratones inmediatamente después de la administración y durante una semana para identificar un efecto tóxico como prurito, diarrea, irritabilidad (manifestado como agresividad, hiperreflexia, cambio de comportamiento), pérdida de peso, ataxia, sedación y/o anestesia
- Pasado el tiempo a los ratones (anestesiados previamente) se sangran por corte axilar se recoleta en un tubo Eppendorf la sangre, centrifugar y separar el suero. congelar hasta su uso a -20°C y se sacrifican.
- Para el grupo control los ratones pesados, separados y marcados, se les administra una dosis única de 0.2mL de solución salina isotónica, posteriormente se procede como el grupo prueba.
- Para el modelo de intoxicación subcrónica se pesan, marcan y separan 20 ratones CD1 al igual que para el modelo de intoxicación aguda, y se separan en dos grupos
- Para el grupo control se administrarán 0.2mL vía gástrica de solución salina isotónica diaria durante 30 días.
- Para el grupo a tratar se administra por vía gástrica una dosis de 50mg/Kg de peso de cada ratón durante 17 días hasta que comenzaron a morir. Pasado el tiempo a los ratones (anestesiados previamente) se sangran por corte axilar se recoleta en un tubo Eppendorf la sangre, se congela hasta su uso a -20°C y se sacrifican se obtienen órganos hígado, corazón, riñón, bazo.

- De los órganos disecados calcular los índices mediante la siguiente fórmula

$$\text{Índice} = \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso del ratón}} * 100$$

- Comparar estadísticamente mediante t de Student los pesos relativos de cada órgano
- La comparación de las pruebas serológicas es mediante un ANDEVA

## 7.2 Determinación en Sueros

### A) DETERMINACIÓN DE CERULOPLASMINA POR INMUNODIFUSIÓN RADIAL

#### TÉCNICA DE MANCINI

Método:

Preparación de las placas:

- 1.- Pesar 0.3g de agarosa
- 2.- Colocar la agarosa en un matraz de 250mL y agregar 30mL de agua
- 3.- Esterilizar en autoclave a una temperatura de 120°C a 15 lb de presión, 15 minutos
- 4.- Se deja enfriar y se agrega una pizca de azida de sodio.
- 5.- Se colocan 2mL de agarosa con una pipeta graduada en 13 tubos de ensaye etiquetados.
- 6.- Se colocan en baño María a 45°C durante 10 minutos.
- 7.- A cada tubo se le agregan 200µL de suero de conejo anticerculoplasmina y se agita.
- 8.- Cada uno de los tubos se vacía en un pozo de las placas de Falcon, evitando la presencia de burbujas.
- 9.- Las placas se dejan reposar hasta alcanzar la solidificación.
- 10.- Se realizan 4 perforaciones de 3mm de diámetro y profundidad en cada contenedor con agarosa y se utilizan el mismo día de la elaboración.

## PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

- 1.- Se colocan 5 $\mu$ L de suero problema en el orificio de los pozos de las placas.
- 2.- Estos se identifican de acuerdo a la numeración de cada muestra.
- 3.- Se colocan 5 $\mu$ L del estándar de ceruloplasmina de ratón.
- 4.- Las placas se refrigeran durante 48 horas.
- 5.- A las 48 horas se mide el halo de inhibición con una regla milimétrica.
- 6.- Se colocan las placas a dializar con solución salina por 24 horas.
- 7.- Se colocan a dializar las mismas placas en agua destilada por 24 horas.
- 8.- Se tiñen los agares de la placa falcón adicionando colorante Azul de Commassie por 1 hora.
- 9.- Trascurrido el tiempo, se procedió a desteñir la muestra con ácido acético al 5% con tres cambios de este mismo decolorante por dos días
- 10.-Ya desteñidos se miden los halos de inhibición con una regla milimétrica y consecutivamente se miden los diámetros de los halos del estándar y se realizan los cálculos.
- 11.- Se utilizan los valores de referencia de ratón.

## **B) DETERMINACIÓN DE NITRITOS POR METODO DE GRIESS**

Método:

Plateado del Cadmio

- 1.- En tubos de 13x100 colocar 0.5g de cadmio metálico, el cadmio se platea agregando 2ml solución acuosa de sulfato de cobre al 5% y agitar por 10 minutos. En una plataforma de agitación (rocker platform).
- 2.- Lavar 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre, centrifugando a 3500 rpm por 5 minutos.
- 3.- Hacer un último lavado con HCl 0.1N para remover el hidróxido de cadmio, aproximadamente a 2 volúmenes con el tubo lleno centrifugando a 3500 por 3 minutos.

4.- Lavar el cadmio con cloruro de amonio al 5% a un pH de 9, acompañado con borato de sodio.

#### Preparación de la muestra

1.- Se adicionan 300µL de agua destilada a 100µL de suero (obteniendo una dilución 1:4), y se agregan 20µL de la solución de ZnSO<sub>4</sub>, se agitan (esta solución forma un precipitado de proteínas) y centrifugan a 10 000 rpm por 5 minutos.

2.- A los tubos con cadmio activado (provenientes del paso 4 del plateado del Cadmio) tirar el NH<sub>4</sub>Cl y se adiciona el sobrenadante de la centrifugación del paso 1.

3.- Se tapa con parafilm y se coloca en una plancha de agitación horizontal por 15 minutos.

4.- Se centrifugan los tubos a 3500 rpm por 5 minutos. Se toman 200µL del sobrenadante para el ensayo de la muestra siguiente.

5.- Realizar la curva de calibración con el patrón como se muestra en el Cuadro de Curva Patrón

6.- Cuadro 3 de Curva patrón, concentración estándar de 200µg /mL de nitrito de sodio

7.- Determinar la concentración de nitritos en suero problema y reportar los resultados con la utilización de la curva patrón de nitrito de sodio.

**Cuadro 3 de curva patrón para determinación de Nitritos por técnica de Griess**

TUBO	ESTÁNDAR $\mu\text{L}$	AGUA DESTILADA $\mu\text{L}$
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
MUESTRAS	200 $\mu\text{L}$ del sobrenadante	700
Se adicionan 50 $\mu\text{L}$ de sulfanilamida.	Se incuba por 10min.	A temperatura ambiente
Se adicionan 50 $\mu\text{L}$ del reactivo de NED.	Se mezclan e incuban por 30 minutos. Se leen a 540nm	A temperatura ambiente

Reactivo de sulfanilamida

Disolver 0.5g de sulfanilamida en 150mL de ácido acético al 15%. Etiquetarlo y guardarlo en un frasco protegido de la luz.

Reactivo de NED

Disolver 0.2g de diclorhidrato N-(1-naftil )-etilendiamina en 150mL de ácido acético al 15%. Etiquetarlo y guardarlo en un frasco protegido de la luz.

Sulfato de zinc

ZnSO<sub>4</sub> 300g/L o 30g/dL

### **C) DETERMINACIÓN POR ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA**

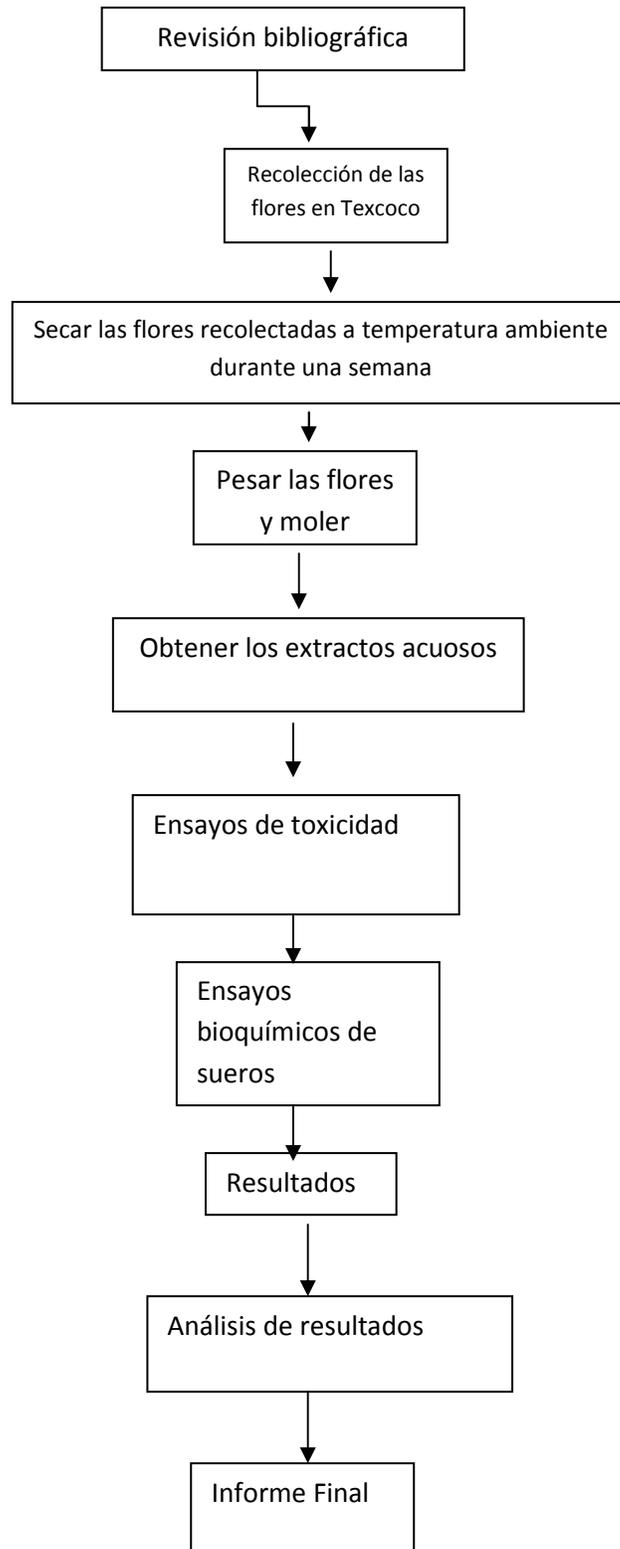
1. Preparar el buffer de resolución pesando 18g de trisbarbital sódico en agua desionizada.
2. Colocar una membrana de acetato de celulosa de 57x144mm en el buffer de resolución preparado anteriormente y dejar reposar la membrana dentro del buffer.
3. Pasado el tiempo se quita el exceso de buffer de la membrana sobre un papel filtro.

4. El buffer de resolución se coloca en la cuba de la cámara de electroforesis Sepatrek® con aplicador de 8 muestras, Ann Aibar M 48106 GelmanSciences® y se tapa hasta su uso
5. Al aplicador Sepatrek® se le colocan las muestras de suero de ratón utilizando un capilar para cada uno y colocándola de acuerdo al orden determinado de muestra.
6. Colocar la membrana seca debajo del aplicador y aplicar las muestras
7. A la membrana con las muestras se coloca en el separador electroforetico de la cámara previamente llenado con el buffer de resolución y se induce una corriente de 200 volts durante 20 min.
8. Pasado el tiempo se retira la membrana y se coloca en una solución acuosa al 5% de colorante de Ponceau en ácido tricloro acético al 7.5% durante 10 min.
9. Una vez pasado este tiempo se coloca la membrana en aclarante Sepaclear® que contiene N,N-metilpirrolidona durante 5 min.
10. Inmediatamente se retira del aclarante y se coloca en una solución acuosa al 5% de ácido acético durante 5 minutos. Se retira y se coloca sobre una superficie lisa, preferentemente vidrio sin grasa y se seca con calor directo de un secador de cabello.

**Cuadro 4. Material, equipo y reactivos utilizados**

<b>Material</b>	<b>Equipo</b>	<b>Reactivos Grado Analítico</b>
Agitadores magnéticos	Equipo de destilación a vacío	Cadmio metálico
Cajas petri	Bomba de vacío	Acido ortofosfórico
Celdas de plástico	Trampa para vacío	Agua bidestilada
Matraces bola	Pinzas de tres dedos	Alcohol etílico
Vasos de precipitados	Soporte universal	Éter
Papel parafilm	Micro Balanza Ohaus Explorer pro	Cloruro de amonio
Papel filtro	Centrifuga	Sulfato de zinc
Pipetas graduadas	Espectrofotómetro UV/Vis Jenway 6305	Sulfanilamida
Pipetas volumétricas	Cámara de Electroforesis Sepatrek®	Diclorhidrato N-(1-naftil )-etilendiamina (NED)
Micropipetas	Aplicador de muestras para electroforesis GelmanSciences®	Sulfato de cobre
Tubos de ensaye		Nitrito de sodio
Tubos Eppendorf		Trisbarbital sódico
Mangueras para agua y vacío		Aclarante Sepaclear®
Gradillas		N,N-metilpirrolidona Acido Tricloroacetico

### 7.3 Diagrama de Flujo



## 8. RESULTADOS

Después del tratamiento de la muestras de suero, a los datos obtenidos se les realizo un análisis estadístico con el programa SPSS v15.0; para comparar ambos grupos, control y prueba.

Al diseccionar los órganos del grupo control y del grupo de prueba del modelo de toxicidad aguda se encuentran aumentados de tamaño y de peso el hígado, bazo y riñones del grupo de prueba lo cual comprobamos con los datos del cuadro 3, los cuales nos indican los pesos de los órganos y sus respectivos índices y en el cuadro 4, la comparación estadística.

**Cuadro 5. Peso de órganos por ratón/modelo de intoxicación.**

Tratados Tx aguda		Pesos g				Índices				
Ratón	Peso g	Hígado	Riñón	Corazón	Bazo	Hepático	Renal	Cardiaco	Esplénico	
1	40	2.325	0.5432	0.1932	0.3272	5.8125	1.3580	0.4830	0.8180	
2	30	1.5363	0.4167	0.1545	0.1383	5.1210	1.3890	0.5150	0.4610	
3	39	2.248	0.5573	0.1796	0.155	5.7641	1.4290	0.4605	0.3974	
4	37	2.2108	0.4793	0.1677	0.1833	5.9751	1.2954	0.4532	0.4954	
5	33	1.6299	0.4625	0.1671	0.1286	4.9391	1.4015	0.5064	0.3897	
6	37	1.9394	0.5163	0.1713	0.2214	5.2416	1.3954	0.4630	0.5984	
7	39	2.121	0.5391	0.1705	0.3246	5.4385	1.3823	0.4372	0.8323	
8	41	2.5461	0.6092	0.1714	0.4193	6.2100	1.4859	0.4180	1.0227	
9	43	2.3042	0.6322	0.2115	0.1415	5.3586	1.4702	0.4919	0.3291	
*10	40	2.536	0.6066	0.1704	0.4166	6.3400	1.5165	0.4260	1.0415	

presenta quiste hidatídico\*

Testigos		Pesos g				Índices				
Ratón	Peso g	Hígado	Riñón	Corazón	Bazo	Hepático	Renal	Cardiaco	Esplénico	
1	43	2.6097	0.6573	0.1674	0.1228	6.0691	1.5286	0.3893	0.2856	
2	37	2.1141	0.4339	0.1303	0.1126	5.7138	1.1727	0.3522	0.3043	
3	37	1.9635	0.5095	0.1746	0.1295	5.3068	1.3770	0.4719	0.3500	
4	28	1.4486	0.3637	0.1214	0.1685	5.1736	1.2989	0.4336	0.6018	
5	37	1.9995	0.51	0.2042	0.1348	5.4041	1.3784	0.5519	0.3643	
6	35	1.911	0.5001	0.1456	0.1314	5.4600	1.4289	0.4160	0.3754	
7	35	2.0966	0.4933	0.1774	0.1026	5.9903	1.4094	0.5069	0.2931	
8	25	1.3906	0.2997	0.1406	0.1422	5.5624	1.1988	0.5624	0.5688	
9	38	2.1356	0.4953	0.2174	0.1568	5.6200	1.3034	0.5721	0.4126	
10	36	2.0132	0.434	0.1628	0.1352	5.5922	1.2056	0.4522	0.3756	

Tratados		Tx subcrónica							
		Pesos g			Índices				
Ratón	Peso g	Hígado	Riñón	Corazón	Bazo	Hepático	Renal	Cardiaco	Esplénico
1	26	1.6513	0.2749	0.1294	0.1109	6.3512	1.0573	0.4977	0.4265
2	21	1.3402	0.2151	0.1093	0.1033	6.3819	1.0243	0.5205	0.4919
4	15	0.7665	0.1858	0.1426	0.0961	5.1100	1.2387	0.9507	0.6407
5	22	1.2127	0.2199	0.0967	0.0981	5.5123	0.9995	0.4395	0.4459
6	18	1.0779	0.2015	0.1029	0.1789	5.9883	1.1194	0.5717	0.9939
7	21	1.2886	0.218	0.0924	0.0799	6.1362	1.0381	0.4400	0.3805
8	20	1.328	0.2721	0.1054	0.1186	6.6400	1.3605	0.5270	0.5930
10	25	1.3924	0.2598	0.1206	0.1319	5.5696	1.0392	0.4824	0.5276
*3	23	1.3455	0.3008	0.1309	0.219	5.8500	1.3078	0.5691	0.9522

\* presenta absceso bacteriano

Testigos		Índices							
Ratón	Peso g	Hígado	Riñón	Corazón	Bazo	Hepático	Renal	Cardiaco	Esplénico
1	25	1.3087	0.2202	0.083	0.1081	5.2348	0.8808	0.3320	0.4324
2	28	1.3446	0.2931	0.1546	0.1131	4.8021	1.0468	0.5521	0.4039
3	25	1.4283	0.266	0.0934	0.1703	5.7132	1.0640	0.3736	0.6812
4	25	1.5748	0.2715	0.1332	0.1248	6.2992	1.0860	0.5328	0.4992
5	27	1.5764	0.2896	0.1192	0.1397	5.8385	1.0726	0.4415	0.5174
6	34	2.1343	0.1469	0.3582	0.1775	6.2774	0.4321	1.0535	0.5221
7	22	1.2303	0.2252	0.0803	0.0834	5.5923	1.0236	0.3650	0.3791
8	17	0.6408	0.1675	0.0798	0.075	3.7694	0.9853	0.4694	0.4412
9	30	1.528	0.2885	0.1296	0.1146	5.0933	0.9617	0.4320	0.3820
10	27	1.5876	0.2824	0.1213	0.114	5.8800	1.0459	0.4493	0.4222

**Cuadro 6. Comparaciones por t de student de los índices de órganos por modelo de Intoxicación.**

HSD de Tukey

Variable dependiente	Ratón	Ratón	Diferencia de medias	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite superior	Límite inferior
Índice Esplénico (Bazo)	Testigos	Tx-aguda	-.24539(*)	.09431	.039	-.4797	-.0110
		Subcrónica	-.21264	.09689	.091	-.4534	.0281
	Tx-aguda	Testigos	.24539(*)	.09431	.039	.0110	.4797
	Subcrónica	Testigos	.21264	.09689	.091	-.0281	.4534

Variable dependiente	Ratón	Ratón	Diferencia de medias	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite superior	Límite inferior
Índice Hepático (Hígado)	testigos	Tx-aguda	-.03084	.18874	.985	-.4998	.4382
		Subcrónica	-.35961	.19391	.172	-.8415	.1222
	TX-aguda	Testigos	.03084	.18874	.985	-.4382	.4998
	Subcrónica	Testigos	.35961	.19391	.172	-.1222	.8415

Variable dependiente	Ratón	Ratón	Diferencia de medias	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite superior	Límite inferior
Índice Renal (Riñón)	Testigos	TX-aguda	-.08215	.04839	.225	-.2024	.0381
		Subcrónica	.19852(*)	.04971	.001	.0750	.3220
	Tx-aguda	Testigos	.08215	.04839	.225	-.0381	.2024
	Subcrónica	Testigos	-.19852(*)	.04971	.001	-.3220	-.0750

\* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Para la determinación de ceruloplasmina en suero, se realizó por la Técnica de Mancini y se encontraron las siguientes diferencias.

**Cuadro 7. Datos de los halo de inhibición y comparación de ceruloplasmina**

TX aguda			std mg/dl	Halo	TX subcronica			std mg/dl	Halo
Ratón		21.6	4 mm		Ratón		21.6	4 mm	
Ceruloplasmina	Diámetro	Conc. mg/dL			Ceruloplasmina	Diámetro	Conc. mg/dL		
*1	5	27		*Tratados	*1	12	64.8		Testigos
*2	8	43.2		Testigos	*2	5	27		
*3	5	27			*3	12	64.8		
*4	9	48.6			*4	12	64.8		
*5	7	37.8			*5	11	59.4		
*6	10	54			*6	9	48.6		
*7	4	21.6			*7	9	48.6		
*8	4	21.6			*8	8	43.2		
*9	7	37.8			9	11	59.4		
*10	6	32.4			10	9	48.6		
11	4	21.6			11	5	27		
12	4	21.6			12	10	54		
13	4	21.6			13	9	48.6		
14	4	21.6			14	10	54		
15	6	32.4			15	7	37.8		
16	5	27			16	8	43.2		
17	4	21.6			17	12	64.8		
18	4	21.6			18	11	59.4		
19	5	27							
20	5	27							

**Cuadro 8. Comparaciones por ANDEVA de ceruloplasmina por grupo del modelo de Intoxicación.**

HSD de Tukey

raton	raton	Diferencia de medias	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Testigos	Tox-aguda	10.80000	4.49207	.060	-3.890	21.9890
	Subcrónica	-17.55000(*)	4.76456	.003	-29.4177	-5.6823
Tx-aguda	Testigos	-10.80000	4.49207	.060	-21.9890	.3890
	Subcrónica	-28.35000(*)	4.76456	.000	-40.2177	-16.4823
Subcrónica	Testigos	17.55000(*)	4.76456	.003	5.6823	29.4177
	Tox-aguda	28.35000(*)	4.76456	.0001	16.4823	40.2177

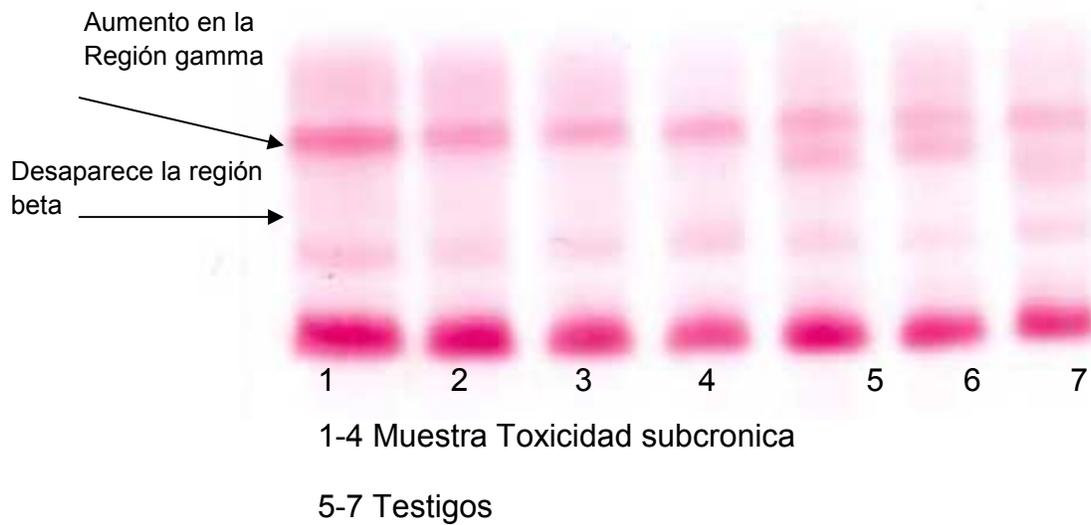
\* La diferencia de medias es significativa al nivel .05.

Para la prueba de determinación de Nitritos por la Técnica de Griess no se encontraron, diferencias significativas en ambos modelos.

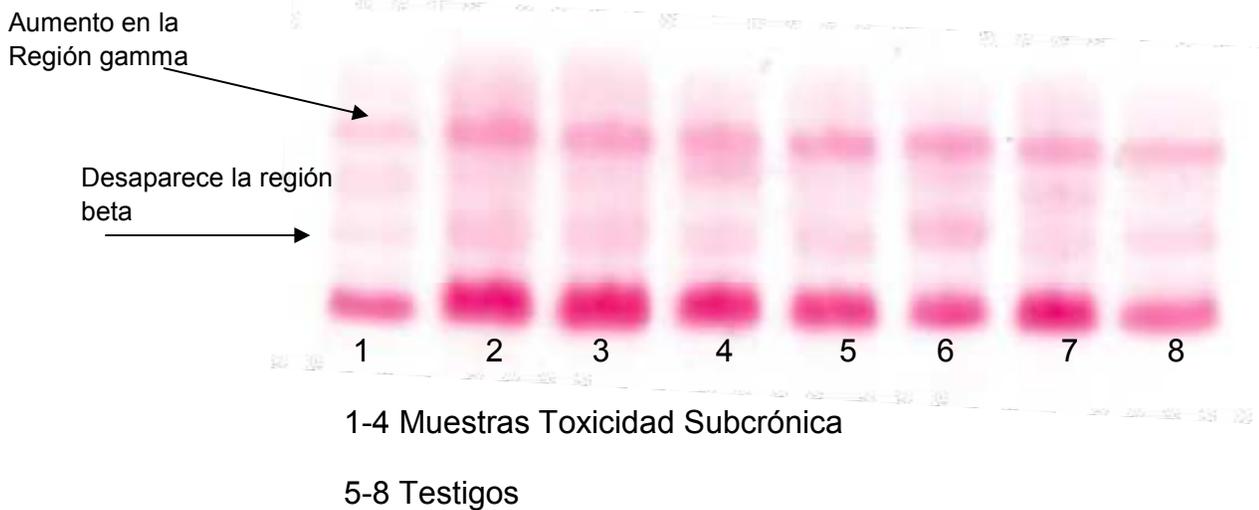
Para la prueba en la determinación de enzimas TGO y TGP no se encontraron diferencias significativas en el estudio estadístico para el modelo de toxicidad aguda. Para el modelo de toxicidad subcrónica no se determinaron estas enzimas ya que la muestra sérica no fue suficiente para esta determinación.

Con la muestra sobrante se decidió utilizarla en una determinación mediante una electroforesis en acetato de celulosa.

## Electroforesis



**Figura 8. Proteinograma de electroforesis de los sueros de ratón del modelo de intoxicación subcrónica**



**Figura 9. Proteinograma de electroforesis de los sueros de ratón del modelo de intoxicación subcrónica**

## 9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se observa en el desarrollo de esta evaluación que la mayoría de los ratones de experimentación no presentó cambio de comportamiento que nos evidenciaran el efecto tóxico del extracto, sin embargo, éste se observó al realizar la disección de los órganos ya que se mostraban algunos órganos mas alterados los del grupos de prueba, en comparación con el grupo control, lo cual se comprobó con el análisis estadístico (Cuadro 6 Pág. 43), en el cual hay diferencias significativas en riñones (índice renal), bazo (índice esplénico) e hígado (índice hepático). Para comprobar esta alteración se realizó un análisis de ceruloplasmina, ya que esta proteína es una proteína de fase aguda que nos determina el grado de alteración del hígado aunque su principal función es el transporte de hierro, se puede utilizar como marcador de daño hepático debido a que se sintetiza principalmente ahí. Se utilizó la Técnica de Mancini por la reacción de antígeno-anticuerpo que se nota por precipitación y se tiene un estándar preparado para comparar los halos de precipitación y de acuerdo al diámetro se compara con el grupo control, esto nos beneficia para hacer el tratamiento estadístico de los datos obtenidos y evaluar el daño al hígado, ya que se ha encontrado que esta proteína al igual que la Proteína C Reactiva (PCR) se elevan en procesos inflamatorios agudos, lo cual nos demuestra el daño hepático que genera la administración del extracto en los modelos de intoxicación aguda y subcrónica; en el Cuadro 6 (Pág. 44) se muestra la diferencia entre grupos control y de prueba de cada modelo.

Para la determinación de Nitritos por técnica de Griess no se encontraron datos relevantes, ni diferencias significativas entre grupos, estos datos se pueden asociar a que el Oxido Nítrico (NO) se degrada por las enzimas que intervienen en la regulación del tono muscular, por la acción de sustancias constrictoras y relajantes sobre el músculo liso vascular. Al haberse expresado las diferencias, se observaría un aumento del NO, debido a que, indica la acción reguladora de los efectos inflamatorios y antiinflamatorios principalmente en el tono muscular cardiaco, también el aumento del NO se debe a diferente procesos inmunológicos, como en la sepsis bacteriana, estos procesos inflamatorios aumentan la concentración de NO sanguíneo lo cual genera radicales libres y expresa citotoxicidad, lo cual hubiera alterado los resultados de toxicidad por la administración del extracto

La separación electroforética de las proteínas séricas es un tipo de determinación que se efectúa rutinariamente en clínica, para detectar determinados estados patológicos caracterizados por la alteración en la cantidad total de proteínas séricas o en alguna de sus fracciones, en este caso podemos observar en las figuras 8 y 9 que hay una desaparición de la fracción beta de las proteínas plasmáticas, en la determinación del modelo de intoxicación subcrónica, en la otra podemos observar el engrosamiento de la fracción gamma, lo cual nos indica una inflamación aguda y tal vez crónica, este aumento de las fracciones gamma de las proteínas se le conoce como hipergamaglobulemia en la cual podemos distinguir un proceso inflamatorio agudo de hígado y de bazo, recordando que las fracciones alfa 1 y 2 se reparten con las beta ya que el suero de ratón no expresa líneas alfa 2, sin llegar a síndrome nefrótico o enfermedades autoinmunes como generalmente se asocia este tipo de resultados. Más bien nos referimos a una comprobación de las pruebas anteriores como la ceruloplasmina y los índices de pesos relativos de los órganos, pero solo para el modelo de toxicidad subcrónica. Además es evidente el daño hepático y esplénico ya que, en las fracciones alfa y beta de ratón se encuentran marcadores utilizados como lo es la ceruloplasmina que se muestra aumentada, y algunos factores de complemento; en las regiones gama aumentadas se pueden destacar fácilmente las inmunoglobulinas IgE e IgM que son las responsables de estas respuestas inmunes.

Además, durante la realización del estudio se evaluó también el efecto terapéutico, el cual es, según la medicina tradicional ansiolítico y cardiotónico, comparando el extracto de la flor de manita contra solución salina y un extracto de yoyote el cual es positivo como ansiolítico, demostrándose así, que el extracto de la flor de manita no tiene dicho efecto, el cual esta documentado en un video.

## 10. CONCLUSIONES

1. Los resultados muestran que el extracto acuso de la Flor de Manita (**C. *Pentadactylon***) es tóxico al dañar órganos (hígado, bazo, riñón) de los ratones (CD1) utilizados en la prueba biológica de toxicidad agua y subcrónica, pero se denota más aumentada en la subcrónica.
2. Al comprobar estos daños con las pruebas serológicas, se puede inferir que la administración continua de este extracto puede llegar a ser muy dañino e inclusive mortal para un humano si extrapolamos las dosis y el tiempo de administración.
3. Es importante reportar estos resultados ya que esta planta se sigue comercializando y utilizando indiscriminadamente entre la población que utiliza la medicina tradicional mexicana como método alternativo de tratamiento en sus padecimientos como lo son ansiolítico y en cardiopatías.
4. La importancia de los resultados de este tipo de estudios es de gran magnitud, ya que, esclarece el uso de las plantas medicinales y se comprueba en cierta medida parte de la seguridad y eficacia de las mismas.

## 11. SUGERENCIAS

1. Realizar una curva dosis respuesta de DL<sub>50</sub> ya que este proyecto se encamino a la realización de pruebas de toxicidad en fase rápida según la FDA.
2. Evaluar el efecto terapéutico de la planta en ratones inducidos con padecimientos cardiacos para determinar el efecto cardiotónico de acuerdo a la viabilidad de las especies.
3. Realizar una prueba toxicológica con una extracto diferente al acuoso como puede ser un etanolico, ya que este proyecto se baso en el acuoso debido a que el uso convencional de la planta es en forma de té.
4. Aislar e Identificar componentes activos de la planta.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chafón K. Flor de la manita: Una “manita” para el corazón y los nervios. *Conabio Diversitas*. **México 2007**;(74):13-15.
2. Dasgupta A. Davis B. Wells A. Effect of a plantain on therapeutic drug monitoring of digoxin and thirteen other common drugs. *Annal of Bio. Chem.* **2006**;(43):223-226.
3. Dominguez X, Gutierrez A. Extractives from the flowers of ***Chiranthodendron pentadactylon*** .*Phytochem.* **1972**;(11):2895.
4. Estrada L. El fruto macpalxochicuahuatl (*Chiranthodnedron pentadactylon*): tamaño, semillas, plagas y polinización manual, plantas medicinales de México introducción a su uso. 4<sup>ta</sup> ed. México: Universidad Autónoma Chapingo; **1996**
5. Ikeda Y, Fujii Y. Quantitative determination of cardiac glycosides in ***Digitalis lanata*** leaves by reversed-phase thin-layer chromatography. *J. Chrom.* **1996**;(746):.255-260.
6. Katzung B. Farmacología básica y clínica 5<sup>ta</sup> ed. México: El manual moderno; **1992**.
7. Rang H P Dale M M Farmacología 6<sup>ta</sup> ed. Madrid Elsevier; **2008**.
8. Linares M, Flores P, Bye R. Selección de plantas medicinales de México. Limusa México; **1988**.
9. Mendoza C. El cultivo de las plantas medicinales en México, un compromiso. México: Universidad Nacional Autónoma Chapingo, Departamento de Fitotecnia: Programa Universitario de Medicina Tradicional y Terapéutica Naturista **2005**.
10. Vázquez G. El árbol de las manitas. 2<sup>da</sup> ed. México: Universidad Autónoma del Estado de México **1998**.
11. Martínez M. Las plantas medicinales de México 6<sup>ta</sup> ed. Botas; México **1990**
12. Becker D. Cardiotonics, diuretics and vasodilators. *A. progress.* **2007**; 4 (54):178-86.

13. Fransworth N., Akerele O. Medicinal Plants in Therapy *Bull. Of World Health Organization* **1985**; 4 (63):.968-81.
14. Cassaret & Doull Toxicology the basic science of poisons 7<sup>th</sup> edn. New York McGraw-Hill; **2008**.
15. Battaler S R. Toxicología clínica 2<sup>da</sup> ed. Madrid PUV; **2004**.
16. Repetto J M. Toxicología fundamental 4<sup>ta</sup> ed. Diaz de Santos editores; México **2009**
17. FDA Guideline for the testing chemicals: test guideline 452 chronic and subchronic toxicity studies. United States; **2008**.
18. FDA Single-dose acute toxicity testing for pharmaceuticals United States; **1996**.
19. ICH Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and nonrodent) Toxicity Testing European Union; **1999**.
20. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. 5<sup>ta</sup> ed. México: Mac Graw Hill; **2004**.
21. Regeiro GJR, López LC, González RS, Martínez NE. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. 3<sup>ra</sup> ed. Madrid: Editorial panamericana; **2003**:
22. Rojas-Espinosa O. Inmunología (de memoria) 3<sup>a</sup> ed. México Editorial panamericana. **2006**.
23. Bellanti J. A Inmunología 3<sup>a</sup> Ed. México Interamericana **1994**.
24. Proceso inflamatorio [serial online] [publicado en 2006, consultado junio 2011] disponible en:  
<http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>
25. Roitt IM, Delves PJ. Inmunología. Fundamentos. 10<sup>a</sup> ed. Buenos Aires Panamericana; **2003**.
26. Rose N, Hamilton R Manual of clinical laboratory immunology 6<sup>a</sup> ed. Washington ASM Press. **2001**.

27. Martínez S, Tecles F, M. Parra d, Cerón JJ. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. *Ann Vet.* **2001**; (17): 97-114.
28. Yapur M, Bustos MF, González AS Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa A. *Bioquím.* **2007** (41)3; 347-351.
29. Lomomnte V Técnicas de laboratorio en Inmunología Clínica 3º ed. Universidad de Costa Rica. **2009**.
30. Bautista J. Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo. *Gac Méd Méx.* **2004**; (140): 28-30.
31. Torres N y Col. Inducible nitric oxide (NO) synthase role in the NO release in a rat sepsis model. Guanylate-cyclase pathway role *Rev Mex. de Cien. Farm.* **2009** (40)4; 12-21.
32. Centelles JJ, Esteban C, Imperial S. Óxido nítrico, un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *OFFARM.* **2004**, (23).11.
33. Suarez MPJ. Liberación de óxido nítrico inducida por el flujo sanguíneo. *Arch Inst. Cardiol. Mex.* **2000**, (70): 197-202.
34. Robbins S, Vinoy K, Ramzi S. Patología estructural y funcional. México: Interamericana- Mc Graw- Hill; **2000**.
35. Bucala R, Cerama A. Advanced glycosylation: chemistry. Biology and implication for diabetes and aging, *Adv pharm.* **1992**:231- 34.
36. Mbaka G, Adeyemi O, Oremosu A. Acute and sub-chronic toxicity studies of the ethanol extract of the leaves of *Sphenocentrum jollyanum* (Menispermaceae) *Agric. Biol. J. N. Am.* **2010**; 3 (1): .265-272.
37. Farzamfar B, Abdollahi M, Ka'abinejadian S, Heshmat R, Shahhosseiny MH, Novitsky Y.A, Farhadi M *Sub-chronic toxicity study of a novel herbal-based formulation (Semelil) on dogs J. Pharm. Sciences.* **2008**; 1 (16):15-19.
38. Panunto W, Jaijoy K, Lerdvuthisopon N, Lertprasertsuke N, Jiruntanat N, Soonthornchareonnon N, Sireeratawong S *Acute and chronic toxicity studies of*

- the water extract from dried fruits of Terminalia chebula* Rezt. in rats  
*International J. App. Res. in Nat. Prod.* **2010**; 4(3):36-43.
39. Maita K, Enomoto A, Nakashima N Chronic toxicity studies with Ziram F344 rats and Beagle dogs *J. Pesticides. Sci.* **1997** (22):193-207.
40. Saidu Y, Bibis L, S Lawal M, Isezuo S A *Acute and sub-chronic toxicity studies of crude aqueous extract of Albizzia chevalieri Harms (Leguminosae)* *A. J. of Biochem.,* **2007** 2(4): 224-236.
41. Long F, Subramaniam S Biochemical analyses of Phalaenopsis violace Orchids *A. J. of Biochem,* **2007** 2(4): 237-246.
42. Herbolarios anónimos, información sobre plantas, usos y aplicaciones [imagen de internet] [publicado en 2009, abril 13; consultado 2011 junio 1]. Disponible en: <http://herbolariosanonimos.blogspot.com/2009/04/flor-de-manita.html>
43. Cardiotónicos, fármacos, Inótrópos adrenérgicos. [imagen de internet] [publicado en 2005 abril 13, consultado 2011 junio 1]. Disponible en: <http://html.rincondelvago.com/cardiotonicos.html>
44. Hillman J R. Isolation of Plant Growth Substances, Cambridge. University Press, **1978**.
45. Velázquez C y Col. Antisecretory activity from the flowers of *Chiranthodendron pentadactylon* and its flavonoids on intestinal fluid accumulation induced by *Vibrio cholerae* toxin in rats *J. of Ethnopharm.* **2009**. (126)3, 455-458.