



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación del efecto tóxico producido por la
planta del burro “PUCA” en un modelo de ratón.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

RAZO GONZÁLEZ ANGÉLICA AYERIM

Director: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor: Ing. Eduardo Loyo Arnaud



MÉXICO, D.F.

2010

Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIME PE 200310



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres, Guillermina González García y Ángel Razo Aguilera por haberme dado la vida, por todas las noches en vela que pasaron cuidándome, por la gran paciencia que me han tenido siempre, por el esfuerzo que han hecho para sacarme adelante, por el inmenso amor que siempre me demuestran y porque siempre he tenido su apoyo incondicional.

A mi hermano, Olat' Misael Razo González por todos los momentos que hemos disfrutado juntos, por el gran cariño que me demuestra cada día, porque siempre me ha brindado su apoyo y porque sin él mi vida no hubiera sido tan alegre.

A mi tío, Miguel Razo Aguilera porque durante todo mi trayecto académico siempre me ha apoyado en todo lo posible, me ha aconsejado y compartido sus experiencias conmigo.

A mi novio, Miguel Martínez Mendoza por todo el apoyo que siempre me ha brindado incondicionalmente, por el gran amor que me demuestra día a día, por la gran paciencia que me tiene y porque sé que siempre va a estar para mí.

A mi director de tesis, Dr. Rubén Marroquín Segura por ser parte de mi formación académica, por guiarme durante este trabajo, por los conocimientos que me ha compartido y en especial porque es una excelente persona y tiene un gran humor.

A mi asesor, Ing. Eduardo Loyo Arnaud por ayudarme y brindarme su tiempo para realizar este proyecto.

A mis sinodales MTRA. Yolanda Flores Cabrera, M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara y DRA. Ma. Isabel Soto Cruz por el valioso tiempo que me brindaron para revisar y corregir este trabajo.

A los profesores MC. Maurilio Flores Pimentel y MTRO. Luis A. Mora Guevara por la ayuda que me brindaron durante este proyecto y por la disposición que siempre han tenido para brindarnos su apoyo.

A mis compañeros y amigos: Tatís, Wuicha, Itzel, Jaz, Roger, Adame, Ferny y Amigon por el apoyo, por todas las risas, enojos y preocupaciones que pasamos juntos y porque con ellos mi estancia en la facultad fue una muy buena experiencia.

Índice	Pág.
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Marco teórico	5
3.1. Definición de ansiedad	5
3.2. Tratamiento farmacológico	6
3.2.1. Historia del uso de ansiolíticos	6
3.2.2. Ansiolíticos	7
3.3. Tratamiento alternativo: Ansiolíticos naturales	9
3.4. Determinaciones que se realizarán para medir el grado de toxicidad provocado por la planta "PUCA"	13
3.4.1. Ceruloplasmina	13
3.4.2. Radicales libres	14
3.4.3. Peroxidación lipídica	15
3.4.4. Óxido nítrico	17
IV. Planteamiento del problema	20
V. Objetivos	22
VI. Hipótesis	23
VII. Diseño experimental	24
VIII. Diagrama de flujo	25
IX. Material, equipo y reactivos	29
X. Parte experimental	31
10.1. Determinación de ceruloplasmina	32

10.2. Determinación de peroxidación lipídica	33
10.3. Determinación de nitritos	34
XI. Resultados	37
XII. Discusión de resultados	48
XIII. Conclusión	51
XIV. Propuestas y/o recomendaciones	52
XV. Anexos	53
XVI. Referencias	64

I. RESUMEN

Los tratamientos farmacológicos para la ansiedad provocan efectos tóxicos, por lo que se utilizan plantas medicinales como alternativa para su tratamiento. Por tal motivo el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto ansiolítico y los efectos tóxicos producidos por la **planta del burro "PUCA" administrada en una población de ratones sanos de cepa CD1**. Para este fin se realizó un ensayo agudo (con un grupo control y un grupo tratado de 10 ratones cada uno) y un ensayo crónico (con un grupo control y un grupo tratado de 20 ratones cada uno) y después de llevar a cabo la intoxicación con el extracto en el grupo tratado, los animales fueron sacrificados al igual que el grupo control. Posteriormente se obtuvo el suero, el hígado, el riñón y el bazo para realizar las determinaciones bioquímicas para evaluar el daño oxidativo y los marcadores enzimáticos de hígado y riñón.

Los resultados mostraron que después de la administración del extracto, los ratones se encontraron en un estado de postración, en comparación con el grupo control que estaba muy inquieto. Las determinaciones bioquímicas mostraron en el ensayo agudo una elevación en los valores de ceruloplasmina, de los índices renal y hepático; en el ensayo crónico hubo una alteración de la creatinina y la peroxidación lipídica drásticamente.

En este trabajo se llegó a la conclusión que la planta del burro **denominada "PUCA" efectivamente tiene efecto ansiolítico pero también es muy tóxica ya que puede provocar daño hepático, daño renal y un aumento del estrés oxidativo.**

II. INTRODUCCIÓN

La ansiedad es una experiencia que prácticamente todos conocemos y que parece estar cada vez más presente entre las numerosas causas de estrés y la complejidad de la vida moderna.

La ansiedad es una reacción física, de conducta y psicológica. A nivel físico, la ansiedad puede incluir reacciones corporales como taquicardia, tensión muscular, náuseas, boca seca o sudoración. A nivel de conducta, puede paralizar nuestra capacidad de actuación, de expresarnos o de afrontar ciertas situaciones diarias. Psicológicamente, la ansiedad es un estado subjetivo de aprehensión e incomodidad. En su forma más extrema, puede llegar a producir un distanciamiento de la propia persona e incluso el temor a la muerte o a volverse loco. La ansiedad aparece de distintas formas y con distintos niveles de intensidad.

En los tratamientos farmacológicos se incluyen los grupos de: Benzodiacepinas las cuales tienen un efecto hipnótico, ansiolítico y sedante, sin embargo puede producir dependencia física, síntomas de abstinencia y efectos secundarios importantes como la ataxia y déficit de memoria. Meprobamato produce un efecto tranquilizante, ansiolítico, facilita y promueve el sueño y es útil en el tratamiento de insomnio, producido por ansiedad, no obstante a dosis elevadas puede producir somnolencia aún durante el día y depresión de la capacidad intelectual. Las azapironas tienen un efecto ansiolítico aunque de menor capacidad que las benzodiacepinas. Los efectos secundarios más frecuentes son cefalea, náuseas, mareo, nerviosismo, insomnio y cansancio.

Debido a que los tratamientos farmacológicos provocan dichos efectos tóxicos, el empleo de plantas medicinales con fines terapéuticos posee especial importancia ya que se ha retomado como forma alternativa para el tratamiento de diversas enfermedades.

En nuestro país ha tenido mayor auge debido a la crisis económica en la que nos encontramos, por tal motivo se ha dado mayor importancia al estudio de los recursos vegetales con que contamos, sin embargo, existen plantas que no han sido estudiadas y algunas veces resultan ser tóxicas o provocan reacciones adversas.

Dentro de las plantas medicinales que se utilizan empíricamente para el tratamiento de ansiedad se encuentran la valeriana, la verbena y la planta del burro, entre otras.

En este caso se trabajó con la planta del burro, de la cual se tienen testimonios que en la región de Michoacán es utilizada empíricamente como ansiolítico. Por esta razón y para fines prácticos se decidió **asignarle como clave las siglas "PUCA" (Planta Usada Como Ansiolítico)**, esto se debe a que esta planta se encuentra en proceso de clasificación y autenticación por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

En este estudio se evaluó la actividad tóxica que causa el uso de esta planta. Para ello se realizó primero un ensayo agudo para observar el efecto ansiolítico, en el cual se administró una dosis única de 100 mg/kg de peso en ratones y se observaron durante 7 días, y un ensayo crónico para observar el efecto tóxico, para este se administró el extracto en una dosis de 50 mg/Kg de peso durante un mes. Se utilizó una población de ratones blancos de un mes de edad con un peso que no excedió los 30 g. Existen estudios realizados con diferentes extractos en los cuales se utilizan dosis **entre 20 y 150** mg/kg de peso por 7 días, por lo cual, se propuso realizar el ensayo con estas dosis y durante ese tiempo.

Se utilizaron las determinaciones de ceruloplasmina como indicadores de inflamación aguda, el nivel de nitritos como indicador de Óxido nítrico (NO), y la peroxidación lipídica para medir las concentraciones de malonildialdehído (MDA). También se determinaron las enzimas hepáticas: aspartato aminotransferasa (TGO), alanino-aminotransferasa (TGP) y lactato deshidrogenasa (LDH) y enzimas renales: creatinina, urea y Nitrógeno Ureico en Sangre (BUN).

III. MARCO TEÓRICO

El uso de las plantas medicinales con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia.

Tres mil años antes de Cristo se escribió el libro más antiguo de plantas medicinales en China; los sumerios, 2,500 años A.C. usaban las plantas con fines curativos; en la Grecia antigua se usaban, entre otras, la canela, el ruibardo, la genciana y la mostaza.

Hoy la medicina se vale de fármacos sintéticos para aliviar las enfermedades. Muchos de estos fármacos son benéficos, pero también muchos, por mal uso o abuso, han perdido su eficacia y han llegado a provocar efectos secundarios nocivos, sin embargo, la medicina herbaria a nivel casero no elimina la necesidad de consultar al médico cuando aparece una enfermedad o padecimiento como en el caso de la ansiedad.¹

3.1 DEFINICIÓN DE ANSIEDAD

La ansiedad se puede definir como un estado emocional no placentero, caracterizado por intranquilidad, inquietud, expectación aprensiva y aumento en la vigilia, en la que se desencadena una serie de reacciones autónomas como sudoración, taquicardia, tensión muscular, insomnio, temblor, dificultad para concentrarse, desinterés sexual y cansancio, etc. El estado de ansiedad se presenta cuando un individuo presiente un

peligro, por tanto, la ansiedad no es una enfermedad ni exclusivamente un síntoma de algún padecimiento sino, más bien, una respuesta instintiva y fundamental que proporciona al organismo un mecanismo de adecuación para responder a un peligro inminente. Es una situación que se presenta en respuesta a estímulos, ya sean internos o externos, y que muy frecuentemente se corrigen al cesar estos estímulos. Se puede considerar que el estado subjetivo de la ansiedad es similar al temor, algunos psiquiatras consideran necesario hacer una distinción entre ambos, aunque ciertamente los dos estados preparan al organismo para situaciones de peligro. Sin embargo, en el temor el peligro es reconocible, mientras que en la ansiedad no es discernible.^{2,3}

La ansiedad puede ser de dos clases:

Depresiva, cuando va asociada a cansancio, desinterés, ganas de llorar sin motivo aparente.

Hiperactiva, cuando está acompañada de agitación y actividad frenética.⁴

3.2 TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

3.2.1 HISTORIA DEL USO DE ANSIOLÍTICOS

En un intento de minimizar los efectos del estrés y de cambios en el estado de ánimo asociados con la ansiedad, el hombre ha buscado alivio a través de diferentes agentes químicos, de entre ellos el más antiguo y el más comúnmente utilizado es el alcohol. A principios del siglo XIX, las sales de bromuro se usaron al igual que otros compuestos con

propiedades hipnóticas y sedantes como son los derivados del opio (opioides). A principios del siglo XX se introdujeron los barbitúricos y por mucho tiempo fueron los fármacos de elección en el tratamiento de la ansiedad; sin embargo, los efectos de tolerancia y posibles sobredosis provocaron que se buscaran otros fármacos ansiolíticos. A principios de 1950 los carbamatos de propaneídol (p. ej., el meprobamato) se hicieron populares como ansiolíticos, hasta que fue evidente que estos compuestos también poseían características indeseables como la depresión de la capacidad intelectual.

Desde los años sesentas numerosos compuestos se han utilizado con diferentes grados de éxito en el tratamiento de la ansiedad. El éxito más grande ha sido alcanzado por las benzodiazepinas (diazepam, bromazepam, lorazepam, etc.). Sin embargo, se ha encontrado que estos últimos están lejos de ser los ansiolíticos ideales ya que también se observan efectos de tolerancia y dependencia. Por lo cual se ha desarrollado una nueva generación de ansiolíticos que actúan a través del sistema serotoninérgico (p. ej., buspirona).^{5,2}

3.2.2 ANSIOLÍTICOS

Los ansiolíticos son fármacos que se caracterizan por su acción sedante, anticonvulsionante, relajante muscular y reductora de la ansiedad. El hidrato de cloral, los barbitúricos y el meprobamato se emplearon como ansiolítico hasta los años sesenta, cuando se descubrieron las primeras benzodiazepinas. El clordiazepóxido y el diazepam introdujeron una auténtica revolución en el tratamiento de la ansiedad y del insomnio ya que son fármacos fáciles de manejar y con escasos efectos secundarios. Sin embargo, el descubrimiento de la buspirona marcó una nueva etapa en la investigación farmacológica de los trastornos de ansiedad.

Las benzodiazepinas se caracterizan porque a dosis bajas tienen una acción depresora del sistema nervioso central, con efectos ansiolíticos, y a dosis altas tienen una acción sedante e inductora del sueño.

Las ventajas respecto de los antiguos ansiolíticos son evidentes:

- a) El margen entre la dosis que produce ansiólisis y la que produce sedación es mucho mayor con las benzodiazepinas.
- b) Los síntomas de tolerancia y dependencia son mucho menos frecuentes.
- c) El riesgo de abuso es menor.
- d) El índice terapéutico (dosis letal media/dosis efectiva) es mucho más elevado, de tal forma que es muy rara la muerte por sobredosis sólo con benzodiazepinas.

La buspirona es un ansiolítico puro que no se relaciona químicamente con las benzodiazepinas y tiene la característica de que su acción ansiolítica no se acompaña con efectos hipnóticos, relajantes musculares ni anticonvulsionantes. Tampoco produce dependencia.

Tiene un efecto ansiolítico progresivo, lo cual representa a la vez su principal inconveniente, pues tiene un periodo de latencia efectivo de unas dos o tres semanas, y su más destacada ventaja puesto que imposibilita la automedicación por no ser percibida la asociación del efecto con el medicamento.

Los antihistamínicos se han empleado tradicionalmente como inductores del sueño en los niños y en menos ocasiones como ansiolíticos. ^{6,7}

3.3 TRATAMIENTO ALTERNATIVO: ANSIOLÍTICOS NATURALES

Las plantas medicinales se han convertido en una alternativa cada vez más socorrida para el tratamiento de numerosas patologías y su empleo goza de gran aceptación entre el público en general, incluso la Organización Mundial de la Salud reconoce el valor terapéutico de las plantas y las acepta como una elección de gran utilidad, ante la carencia de una cobertura mayor en salud; de hecho el 30% de los fármacos se obtienen directa o indirectamente de las plantas y el 80% de la población mundial accede a los tratamientos herbales como recurso principal de atención. ⁸

Cuando se consumen plantas para el tratamiento de enfermedades, la toxicidad potencial depende de varios factores:

1. ***La dosis y duración del uso, que determinan el grado de exposición:*** Una de las principales diferencias entre el empleo de medicamentos "naturales" y farmacéuticos es la amplia variación en cuanto a potencia, dosis efectiva, rango terapéutico e indicaciones. Mientras que las propiedades y aplicaciones de los fármacos se han documentado mediante estudios clínicos controlados, con dosis exactas y condiciones definidas, la gran mayoría de los medicamentos "naturales" se basan en evidencia empírica, dosis aproximadas y en general, multiplicidad de aplicaciones terapéuticas.
2. ***La susceptibilidad individual en cuanto a los efectos tóxicos:*** Resulta de la expresión genética que determina variaciones en la farmacocinética de los compuestos de la planta (absorción, distribución, metabolismo y eliminación), las reacciones de

hipersensibilidad y la existencia de enfermedades de base, en especial de tipo hepático o renal.

3. **Estados concomitantes:** Algunos estados pueden favorecer la toxicidad por plantas, que bajo otras condiciones resultarían seguras. Durante el embarazo por ejemplo, el feto puede ser dañado por la ingestión de apio en gran cantidad o de su compuesto, el apiol, dado que afectan el ciclo menstrual y aumentan las contracciones uterinas pudiendo llegar a ser abortivo.
4. **Reacciones de hipersensibilidad:** La sensibilidad de la piel, el tracto gastrointestinal y el genitourinario debido a la presencia de condiciones o enfermedades pre-existentes, hacen más vulnerable estos tejidos a los compuestos vegetales irritantes que entran en contacto con ellos o modifican sus acciones.
5. **Alteraciones en la absorción de medicamentos:** Pueden ocurrir debido al elevado contenido de fibra hidrocoloidal de ciertos vegetales, o de alcaloides y minerales, así, la concentración pico y el grado de absorción de las tabletas de digoxina se disminuye entre un 15% y un 32% con una dieta elevada en fibra.
6. **Interacciones:** El consumo concomitante de preparados naturales con propiedades psicoactivas como la valeriana y la pasiflora (belladona) con medicamentos psiquiátricos, sedantes, hipnóticos o antihistamínicos, puede generar efectos aditivos afectando el juicio y la capacidad de reacción.

A continuación se hace una breve referencia al uso de algunas plantas medicinales, disponibles en nuestro medio, relacionando con el tratamiento de ansiedad.

VALERIANA (*Valeriana Officinalis*)

La valeriana está disponible bajo las presentaciones de té, cápsulas, tabletas, gotas y puede estar en combinación con otros productos vegetales tales como la pasiflora y fármacos antihistamínicos como la ciproheptadina.

La valeriana se emplea como sedante, hipnótico y anticonvulsivante entre otros. Popularmente se usa como antisudoral, carminativo y **ansiolítico**.

La valeriana no debe ser empleada durante periodos superiores a tres semanas, ya que sus principios activos (valepotriatos), causan dependencia y la suspensión abrupta de su consumo después de periodos prolongados, se ha asociado a la aparición de arritmias cardíacas y delirio, que mejoran con la administración de benzodiazepinas, de hecho la Valeriana prolonga el efecto sedante de las benzodiazepinas, afectando el estado de alerta de quienes las consumen. ⁸

TILA (*Tilia platyphyllos*)

La infusión de tila se utiliza tradicionalmente en el tratamiento de nerviosismo, de la **ansiedad**, del insomnio, de las dispepsias, de los espasmos abdominales y de la retención urinaria. Popularmente se le atribuye actividad hipnótica y sedante, ya que produce depresión del SNC y disminuye el periodo de inducción del sueño.

Debido a su efecto sedante ligero, podría potenciar la sedación producida por fármacos sedantes. Algunos efectos adversos son reacciones hepáticas y cirrosis hepática.

VERBENA (*Verbena officinalis*)

La verbena, conocida también como hierba santa, tradicionalmente se ha utilizado en el tratamiento del nerviosismo, del insomnio, de la **ansiedad** y del agotamiento físico y mental. La verbena produce una ligera depresión del SNC.

Podría potenciar el efecto sedante producido por fármacos. Debido a que un extracto de la planta provoca, en animales de experimentación, contracción de la musculatura lisa del útero, está contraindicada en el embarazo.⁹

PLANTA DEL BURRO denominada "PUCA" (Planta Usada Como Ansiolítico)

Debido a que esta planta aún está en vías de clasificación y autenticación no se conoce el nombre científico, por lo cual aún no se tienen sus antecedentes, lo que se sabe de ella es que en la región de Michoacán es utilizada para el tratamiento de la ansiedad, preparada en té y tiene un sabor muy amargo.

Debido a que esta planta es utilizada empíricamente sin contar con algún reporte científico, se evaluaron algunos marcadores para medir su toxicidad, como la ceruloplasmina, peroxidación lipídica, nitritos, perfil renal y hepático.

3.4 Determinaciones para evaluar el grado de toxicidad provocado por la planta del burro, denominada "PUCA"

3.4.1 Ceruloplasmina

La relación molecular entre el Hierro (Fe) y Cobre (Cu) en el metabolismo ha sido identificada como la proteína de suero **ceruloplasmina (CP)**. CP es una α -2-glicoproteína abundante que contiene más del 95% del cobre que se encuentra en el plasma de todas las especies de vertebrados. Tiene 8 sitios de unión para cobre, uno tanto Cu^+ como Cu^{2+} .

La proteína es sintetizada principalmente en el hígado como una cadena polipeptídica única de 1046 aminoácidos y es secretada en el plasma con seis a siete átomos de Cu envueltos por molécula. La CP ha sido implicada en el metabolismo de Fe en su mayoría debido a su oxidación catalítica de Fe (II) a Fe (III) (actividad ferroxidasa), con su posterior incorporación en apotransferrina o en la proteína de almacenamiento de Fe, ferritina (Ft). Sin embargo, el papel fisiológico de la CP no está bien definido pero puede incluir la actividad antioxidante extracelular mediante la promoción de la movilización de Fe y evitar así que el metal sea catalizado por radicales libres en los tejidos.

Alternativamente, varios estudios sugieren que la CP también puede presentar actividad pro-oxidante potente. A pesar de la función desconocida de la actividad de CP como pro-oxidante, es probable que la proteína está implicada en la defensa del huésped y los procesos de reparación mediada por el sistema inmunológico, es decir, durante la inflamación y la hiperoxia.

De hecho, la CP es un indicador de fase aguda y su concentración sérica se incrementa durante el embarazo, las lesiones, infección de los tejidos, y algunas enfermedades malignas.^{10,11}

3.4.2 Radicales libres

Las células generan energía reduciendo el oxígeno molecular para formar agua. Durante este proceso se producen pequeñas cantidades de formas reactivas de oxígeno parcialmente reducidas como un subproducto inevitable de la respiración mitocondrial, algunas de estas formas son radicales libres que pueden dañar lípidos, proteínas y ácidos nucleicos y son referidos como especies reactivas de oxígeno. Las células tienen sistemas de defensa para prevenir daños causados por estos productos, sin embargo, un desequilibrio entre los sistemas generadores y limpiadores de radicales libres da lugar a estrés oxidativo, una situación que se ha asociado con la lesión celular observada en muchas afecciones patológicas.

Los radicales libres son especies químicas que tienen un único electrón sin su par en una órbita externa. La energía creada por esta configuración inestable se libera a través de reacciones con moléculas adyacentes, tales como productos químicos inorgánicos u orgánicos – proteínas, lípidos, hidratos de carbono- particularmente con moléculas clave en las membranas y ácidos nucleicos.¹²

La mayoría de los radicales libres de interés biológico suele corresponder a especies extremadamente reactivas e inestables, por lo que su periodo de vida media es muy corto, así como su radio de acción. No obstante, cuando un radical libre reacciona con un compuesto no radical, se puede

formar un nuevo radical libre que podrá reaccionar, a su vez, con otro compuesto no radical y así sucesivamente. De esta manera, es posible que se creen reacciones en cadena que darán lugar a efectos biológicos lejos del lugar donde se originó el primer radical. ¹³

Los radicales libres pueden iniciarse dentro de las células de diversas maneras:

- Absorción de la energía radiante
- Metabolismo enzimático de agentes químicos o fármacos exógenos
- Las reacciones de reducción-oxidación que ocurren durante los procesos metabólicos normales
- El óxido nítrico ¹²

3.4.3 Peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien conocido de daño celular en animales, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo. Tras la descomposición de los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA por sus siglas en inglés) de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxi-alqueno (4-HNE), como productos finales de reacción. Gracias a su determinación se puede cuantificar la peroxidación lipídica y, por tanto, el estrés oxidativo en los organismos (Fig. 1).

Los ácidos grasos poli-insaturados (PUFA) son fundamentales para la célula, ya que forman parte de los fosfolípidos, constituyentes principales de la bicapa lipídica de las membranas y son los responsables, en buena medida, de la fluidez de ésta. La función de estos lípidos localizados en las membranas biológicas es mantener la integridad de la célula.

Entre los lugares en los que se pueden encontrar los PUFA destacan la membrana plasmática, la membrana del retículo endoplasmático y la membrana de la mitocondria.

Los PUFA son las moléculas biológicas más susceptibles al estrés oxidativo y su degradación se denomina peroxidación lipídica. Esta peroxidación es el efecto más importante de los radicales libres sobre la célula, ya que la destrucción de los PUFA de la membrana junto con la formación de puentes disulfuro en las cadenas proteicas y la ruptura de éstas, provoca un desmoronamiento de la estructura de membrana que conduce a una pérdida de la permeabilidad y, posteriormente, a la muerte celular. ¹⁴

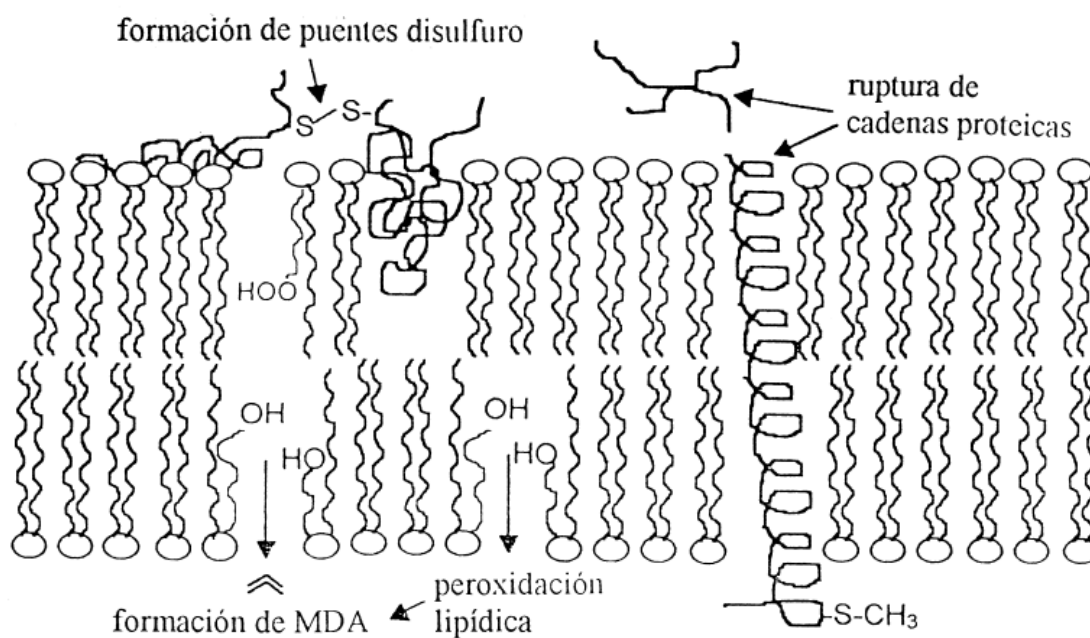


Fig 1. Resultados del daño oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobre las membranas.

3.4.4 Óxido nítrico (NO)

Actualmente se sabe que el NO se produce en el cuerpo humano en una gran variedad de tipos celulares como las células endoteliales, macrófagos y neuronas cerebrales específicas. Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular y Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato (NADPH), por acción de la enzima sintetasa del óxido nítrico (NOS).

Participa en procesos que permiten la supervivencia de los organismos, tal como la regulación de la presión sanguínea, el desarrollo del sistema nervioso central, facilitar la transmisión nerviosa en los procesos de aprendizaje y memoria, y la activación de la respuesta inmune. El NO participa en la reproducción sexual, ya que funciona como señal en las primeras etapas del desarrollo embrionario, en otros organismos, como las plantas, el NO también interviene en procesos importantes, como son el metabolismo, el desarrollo y la defensa. Sin embargo, el NO también puede resultar muy dañino, ya que la pérdida de control en sus niveles tiene consecuencias graves que ponen en peligro la supervivencia del organismo.

El mal funcionamiento en la producción o disponibilidad del NO se asocia con enfermedades como la hipertensión, la disfunción eréctil, procesos neurodegenerativos, como la enfermedad de Alzheimer y el mal de Parkinson, y con disfunciones del sistema inmune, como el choque séptico, lo que puede resultar en la muerte del paciente.

La respuesta de defensa de los animales y las plantas incluye la producción de NO que, debido a su poder bactericida, elimina a los patógenos, en suma, el NO, es una molécula poderosa que regula funciones vitales y que, sin embargo, resulta fatal si está fuera de control.

El NO es una molécula formada por dos átomos, un átomo de oxígeno (O) y otro de nitrógeno (N). El número de partículas subatómicas que forman un átomo es específico de cada elemento, y esta característica determina las propiedades de los elementos. El oxígeno tiene 8 electrones y el nitrógeno tiene 7 electrones; por lo tanto, cuando estos dos átomos se encuentran, sus electrones se aparean para formar una molécula de NO, que contiene un electrón desapareado (Fig 2). La presencia del electrón desapareado permite al NO interactuar rápidamente con otros átomos que son abundantes en los sistemas biológicos, tal como el N y el azufre (S) que forman parte de las proteínas. La unión del NO a las proteínas, u otras moléculas, se llama nitrosación, y este proceso es la base química que permite al NO ejercer diversas funciones en los organismos (Fig 2). El NO también interactúa con átomos metálicos, como el Hierro (Fe), el cual forma parte de proteínas que se conocen como ferroproteínas o hemoproteínas. Estas proteínas son fundamentales en la regulación de un gran número de funciones biológicas, como la producción de energía, el transporte y almacenamiento del oxígeno y la transducción de señales, es decir, el proceso que coordina la respuesta en el interior de la célula a las señales externas.

Por otro lado, el NO reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O_2) y con diferentes formas del O_2 que son altamente reactivas, como los radicales superóxido (O_2^-) e hidroxilo (OH), los cuales son sumamente tóxicos. La interacción del NO con el O_2^- genera peroxinitrito y otras formas reactivas del N que también son tóxicas, por lo tanto, la combinación del NO con las formas reactivas del O_2 constituye el principal mecanismo mediante el cual el NO daña a las células. **13,15**

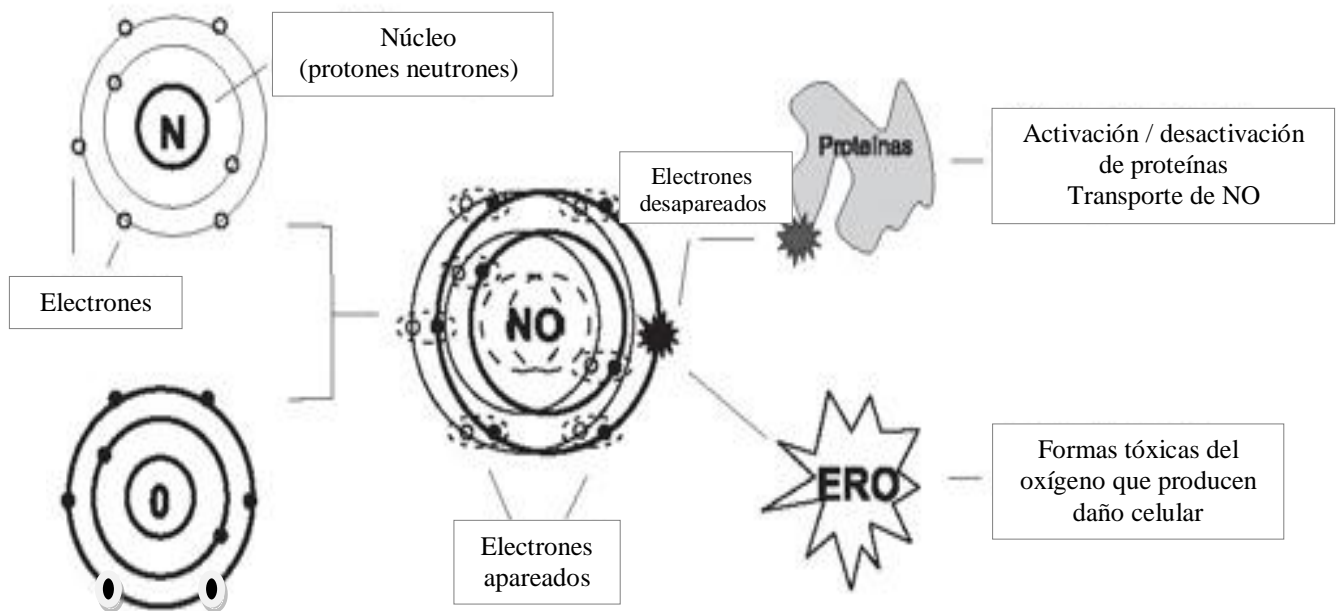


Fig 2. Formación del óxido nítrico. Una molécula de óxido nítrico (NO) se forma por la combinación de un átomo de nitrógeno (N) y uno de oxígeno (O). La molécula de NO posee un electrón desapareado, el cual interactúa rápidamente con otras moléculas que también tienen electrones desapareados, tales como las proteínas o las especies reactivas del oxígeno (ERO).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Nuestro país es reconocido por tener una amplia variedad de flora que se ha utilizado para el tratamiento de diversos padecimientos, la mayoría de estas plantas son conocidas con diferentes nombres y dependiendo de la región, suelen ser utilizadas para diferentes padecimientos. Sin embargo, la gente está acostumbrada a la automedicación y a seguir las recetas caseras recomendadas por otras personas, esto debido a la crisis económica en la que nos encontramos actualmente, por lo cual se les hace más fácil y práctico consumir remedios o extractos naturales.

Esto es más común actualmente debido a la gran popularidad que ha alcanzado la prescripción de extractos vegetales y la fitoterapia, ya que se tiene la creencia que los **productos herbales son necesariamente "seguros" por ser de origen "natural", por ende no presentan interacciones con los medicamentos** y a diferencia de éstos últimos, su consumo no entraña riesgo alguno para la salud ya que están desprovistos de toda toxicidad. Desafortunadamente esta creencia es completamente infundada y la **excesiva confianza en la inocuidad de los remedios "naturales" por parte de un gran sector de la población**, puede resultar peligrosa.

Tal es el caso de la planta del burro **denominada "PUCA", que se llega a utilizar como ansiolítico**. En la actualidad no existe reporte científico alguno que respalde el uso de esta planta, por eso es muy importante realizar un estudio sistémico que demuestre su efecto tóxico, para que la población tenga un antecedente confiable y pueda decidir si es seguro utilizarla como tratamiento de la ansiedad.

Debido a esto, el presente trabajo consistió en evaluar la actividad tóxica que pueda producir la planta "**PUCA**" tras su consumo constante, empleando para esto una población de ratones CD1 y determinando los niveles de ceruloplasmina, nitritos, peroxidación lipídica, enzimas hepáticas y renales.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar los efectos tóxicos producidos por la planta denominada "PUCA" al administrar su extracto en una población de ratones, observando su comportamiento durante el ensayo y determinando ceruloplasmina, peroxidación lipídica, nitritos, perfil hepático y perfil renal.

Objetivos específicos

- Realizar un ensayo de toxicidad agudo (100 mg/kg de peso) en dosis única y observar el comportamiento de los animales durante 7 días.
- Determinar:
 - Perfil renal.
 - Perfil hepático.
 - Índice esplénico, hepático y renal.
 - Determinar ceruloplasmina.
- Realizar un ensayo de toxicidad crónico (50 mg/kg de peso) y observar el comportamiento de los animales durante 30 días.
- Realizar las siguientes determinaciones al final del ensayo:
 - Perfil renal y hepático.
 - Índice esplénico, índice hepático e índice renal.
 - Los niveles de ceruloplasmina.
 - Concentración de malondialdehído (MDA) mediante el método de ácido tiobarbitúrico (TBA).
 - Concentración de nitritos como indicador de óxido nítrico.

VI. HIPÓTESIS

Se cree que al administrar una dosis única de 100 mg/Kg de peso de la planta denominada "PUCA", los ratones mostrarán un estado de postración, debido a que esta planta es usada como ansiolítico. Por lo tanto una intoxicación crónica a 50 mg/kg de peso, los animales mostrarán alteraciones en los marcadores enzimáticos de hígado y mostrarán un aumento en los radicales libres.

VII. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

- Tipo de estudio:

Experimental, prospectivo, observacional.

- Población de estudio:

Ratones divididos en cuatro grupos; dos grupos de 10 ratones cada uno para el ensayo agudo y dos grupos de 20 ratones cada uno para el ensayo crónico.

- Criterios de inclusión:

Ratones machos de 1 mes de edad, sanos y con un peso que no exceda los 30 g.

- Criterios de exclusión:

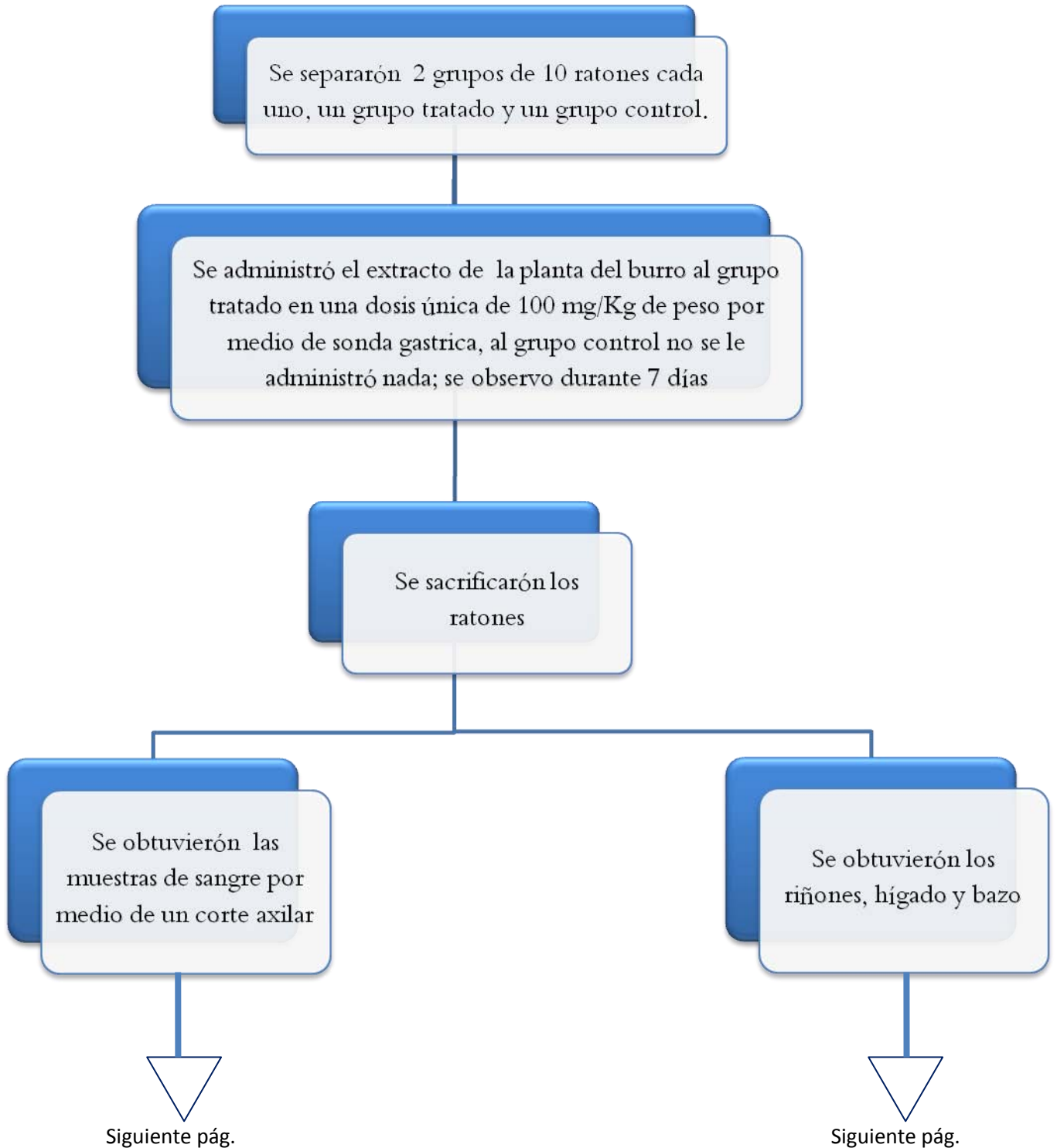
Ratones hembras, ratones que presenten alguna enfermedad y que no cumplan con la edad y el peso.

- Criterios de eliminación:

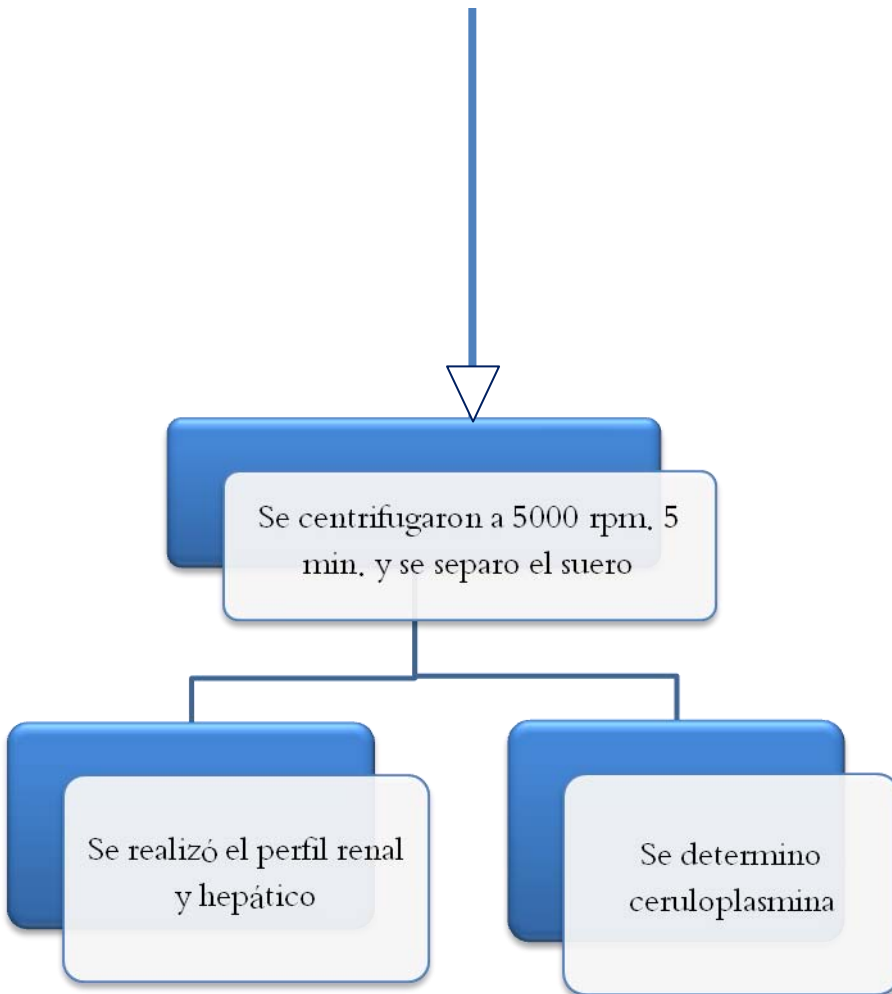
Aquel animal que presente lesiones graves por ser agredido durante el proceso experimental, que presenten algún padecimiento o que muera.

VIII. DIAGRAMA DE FLUJO

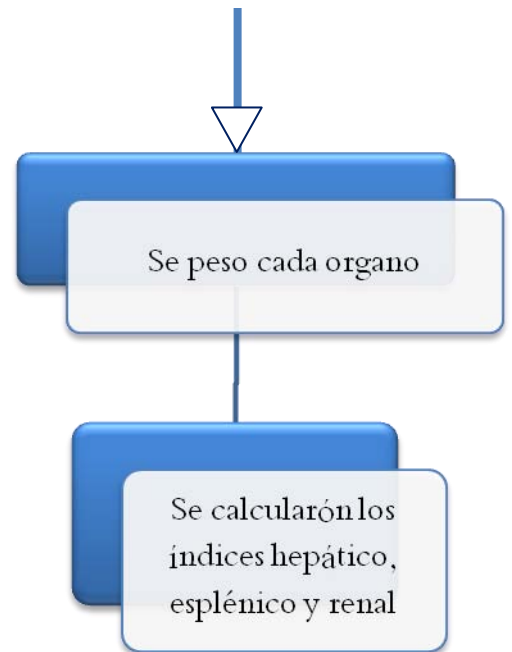
ENSAYO AGUDO



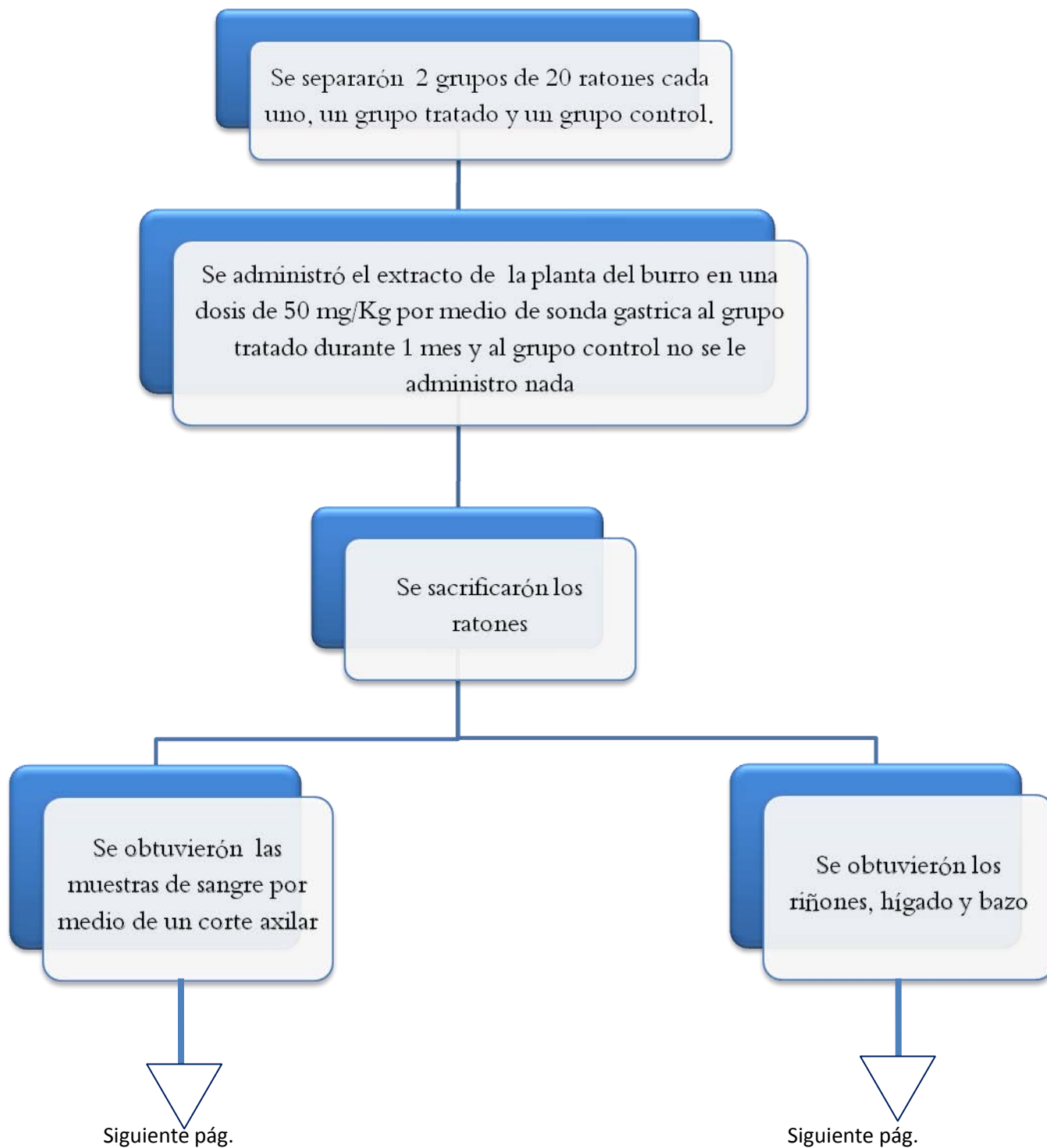
Pág. anterior



Pág. anterior

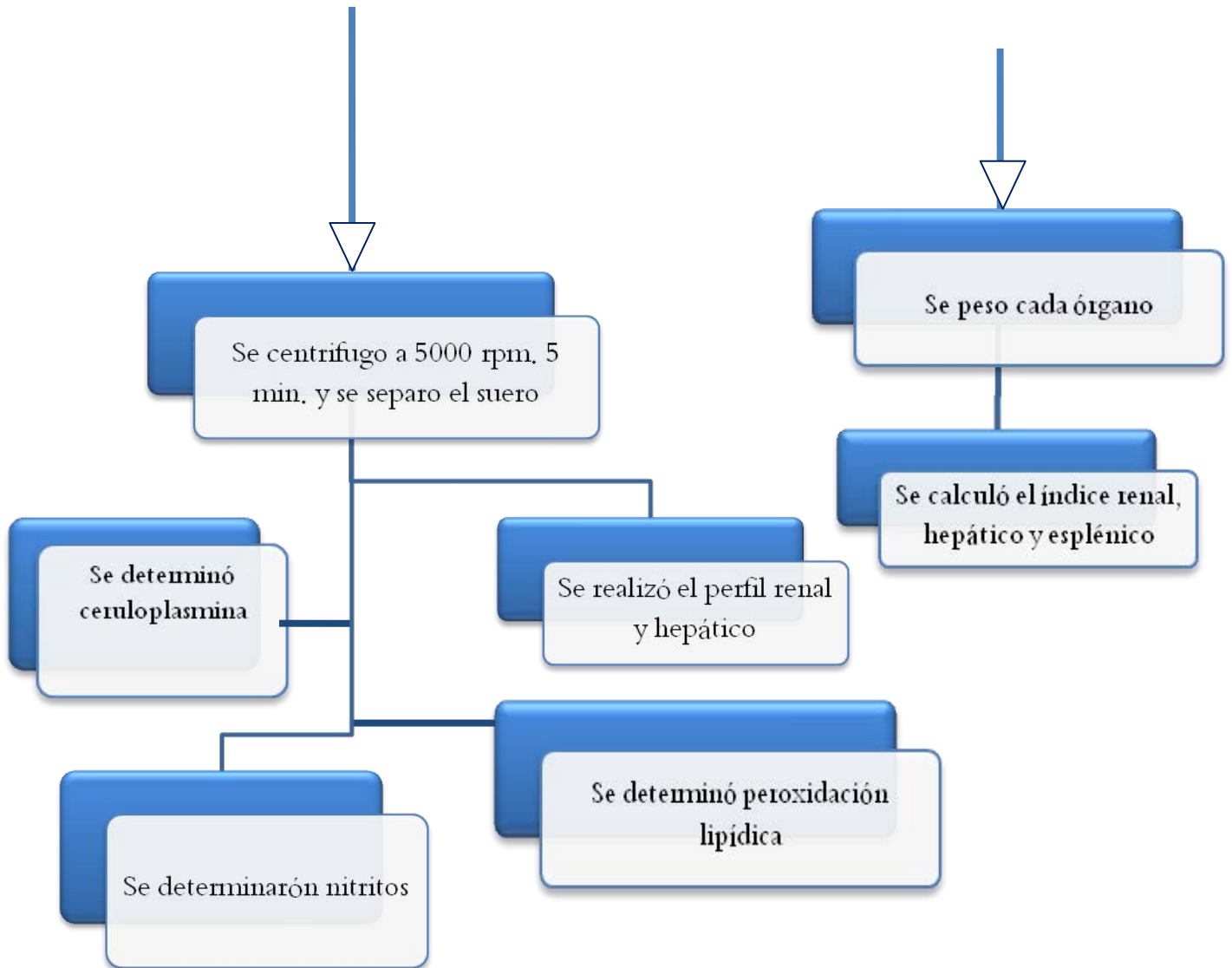


ENSAYO CRÓNICO



Pág. anterior

Pág. anterior



IX. MATERIAL, EQUIPO Y REACTIVOS

- **Material biológico**

- ✓ Ratones machos que no excedan el peso de 30 g, sanos.
- ✓ Extracto alcohólico de la planta "PUCA"

- **Reactivos**

Nombre	Proveedor
Acido clorhídrico	J. T. Baker
Ácido ortofosfórico	J. T. Baker
Ácido sulfúrico	J. T. Baker
Agar- Agar	
Agarosa	Bioxon
Agua destilada	Theissier
Azida de sodio	J.T. Barker
Borato de amonio	J.T. Barker
Butiril-hidroxitolueno (BHT)	Monterrey S.A. de C.V.
Cadmio metálico	Técnica Química S.A
Cloruro de amonio	J.T. Baker
Cloruro de sodio	JT. Baker
Formaldehído 37%	J.T. Baker
Fosfato de sodio dibásico (PBS)	J.T. Baker
N-(1 naftil)- etilendiaminodichlorhidrato (NED)	Merck
Nitrito de sodio	Mellinckrodot
N-butanol	JT. Baker
Sulfato de cobre	Técnica Clínica
Sulfato de Zinc	Hycel de México
Sulfanilamida	Merck
TBA (ácido tiobarbitúrico)	Sintetizado en el laboratorio de orgánica por el M en C Rodolfo Carreón Sánchez. FES Zaragoza UNAM.
1,1,3, 3- Tetrametoxipropano (TMP)	Aldrich

- **Equipo**

Equipo	Marca
Agitador Rocker	Rocker Platform Bellco Glass
Agitador Vortex	Scientific Industries
Balanza analítica	OHAUS
Báscula mecánica automática	TECNOCOR 100-S
Centrífuga para Eppendorf	HERMLE Z 233 M-2
Centrífuga	Hamilton BelVan Guard V 6500
Congelador	Reico
Espectrofotómetro	JENWAY 6305 UV/VIS
Estufa	SHEL LAB
Equipo para procesar química sanguínea	ILab 600
Micropipeta 1000 µL	Labsystems
Micropipeta 100 µL	Labsystems
Micropipeta 40 µL	Labsystems
Refrigerador	Twist aire- MABE

- **Material**

Material	Marca
Tubos Eppendorf	
Matraz Erlenmeyer de 125 mL, 1000 mL	KIMAX
Placas de Falcon	
Botellas para cultivo	NUNCLON
Pipeta graduada de 1 mL, 2 mL, 5 mL y 10 mL	KIMAX
Matraz aforado de 100 mL, 250 mL	KIMAX
Vaso de precipitado de 50 mL, 100 mL, 500 mL	KIMAX
Tubos de ensayo 13 X100	KIMAX
Pipeta Pasteur	
Papel parafilm	American National Can
Mechero Fisher	
Termómetro	BRANNAN
Celdas	
Bisturí	
Portaobjetos	CORNING
Tijeras de disección	WELDON
Pinzas	WELDON
Probeta	KIMAX
Cámara de éter	

X. PARTE EXPERIMENTAL

La planta con la que se trabajó en este proyecto, es una especie de la que no se tiene conocimiento sobre su actividad como ansiolítica, aunque sí ha sido utilizada para este fin, por tal motivo se decidió evaluar su actividad tóxica. Para realizar este proyecto se decidió que esta **planta del burro, fuera denominada "PUCA" ya que esta especie se encuentra en vías de clasificación y autenticación por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, en el Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social del Centro Médico Nacional Siglo XXI.**

Para llevar a cabo el estudio se realizaron pruebas de toxicidad de la **planta del burro denominada "PUCA" en ratones machos de un mes de edad, sanos de la cepa CD1, administrando el extracto mediante sonda gástrica al grupo tratado y al grupo control no se le administró nada sólo se mantuvieron bajo las condiciones convencionales del laboratorio, con cambio de cama de viruta de madera diario y con libre acceso al agua y alimento; para el ensayo agudo se utilizó una dosis única de 100 mg/Kg de peso en 0.2 mL de agua destilada y se observó el comportamiento (muerte, diarrea, salivación, irritabilidad, ataxia, sedación, efecto ansiolítico, etc.) de los animales diario durante 7 días. Para el ensayo de toxicidad crónico se administró diariamente durante un mes una dosis de 50 mg/kg de peso en 0.2 mL de agua destilada.**

En el ensayo agudo se determinaron los ensayos analíticos correspondientes al perfil renal, perfil hepático y ceruloplasmina; en el ensayo crónico se determinó el perfil renal, perfil hepático, ceruloplasmina, peroxidación lipídica y nitritos.¹⁶

El extracto etanólico de esta planta fue obtenido por el Ing. Eduardo Loyo Arnaud en la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Campus II.

Determinación de perfil hepático y renal

Estas determinaciones se realizaron de forma automatizada, con el equipo para química sanguínea ILab 600.

10.1 Determinación de Ceruloplasmina

Preparación de las placas

- 1.** Se pesaron 0.3 g de agarosa en la balanza analítica
- 2.** Se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 125 mL y se adicionaron 30 mL de PBS (buffer salino de fosfatos)
- 3.** Se colocó el matraz en el microondas y se le dieron ciclos de 10 segundos hasta que se observó totalmente disuelto
- 4.** Se colocaron 6 tubos de ensayo 13x100 mm en un baño a 45⁰ C y se adicionaron 2 mL de agarosa al 1% en cada tubo
- 5.** Se vertió en cada tubo 150 µL de suero de conejo anti-ceruloplasmina de ratón y se agitó con ayuda de un Vortex
- 6.** Cada uno de los tubos fue vaciado en un pozo de las placas de Falcon, evitando la formación de burbujas
- 7.** Las placas se dejaron reposar hasta alcanzar la solidificación
- 8.** Se realizaron 4 perforaciones en cada pozo con agarosa.

Procesamiento de la muestra

- 1.** Se colocaron 10 μL de cada muestra problema en los pozos
- 2.** La placa se refrigeró durante 48 horas
- 3.** Pasado el tiempo se midió el diámetro del halo de precipitación
- 4.** Se calculó la concentración de ceruloplasmina.

10.2 Determinación de peroxidación lipídica (MDA). Método de TBA (Ácido Tiobarbitúrico)

Procedimiento

1. Se colectaron las muestras de sangre mediante un corte axial en tubos Eppendorf
2. Se centrifugaron a 5000 rpm / 5 min. Se separó el plasma y se le agregaron 10 μL de BHT (Butil hidroxitolueno) 2mM a cada tubo
3. Posteriormente se diluyó el plasma 1:5 con PBS (100 μL de suero con 400 μL de PBS)
4. Se colocaron 400 μL del plasma con 50 μL de BHT 12.6 mM y 400 μL de H_3PO_4 (ácido Ortofosfórico) 0.2 M
5. Se mezcló en Vortex 10 seg.
6. Se adicionaron 50 μL de TBA (ácido tiobarbiturico) 0.11 M y se mezcló con Vortex nuevamente
7. La mezcla de reacción fue puesta en un baño de agua a 90° C, con los tubos tapados con papel aluminio por 15 min.
8. Cumplido el tiempo se pusieron a enfriar en hielo y se agregaron 1000 μL de n-butanol y 100 μL de NaCl solución saturada. Se agitó vigorosamente por 30 seg.

9. Se centrifugaron a 5000 rpm / 1min.
10. Se transfirieron 500 μL de la fase de butanol a una celda
11. Se leyeron las muestras a 535 nm y a 572 nm para corregir la absorción
12. Se realizó la curva estándar (Estándar: Tetrametoxipropano; TMP)

Tubo	TMP (μL)	H ₃ PO ₄ (μL)	TBA (μL)	H ₂ O (μL)
Blanco	0	600	200	200
1	5	600	200	200
2	10	600	200	198
3	20	600	200	196
4	30	600	200	194
5	50	600	200	190
6	70	600	200	186
7	100	600	200	180

Cuadro 1. Datos para construir la curva patrón de MDA (Malondialdehído) para peroxidación lipídica

10.3 Determinación de nitritos mediante el método de Griess

Plateamiento del Cadmio

1. Se colocaron en tubos de 13 X 100 limpios, 0.500 g de cadmio metálico en la campana de extracción.

2. El cadmio se plateo con aprox. 2 mL de una solución acuosa de CuSO_4 al 5%, se agito en un rocker hasta que el cadmio quedara plateado (aprox. por 10 min.).
3. Se lavo exhaustivamente con agua destilada para eliminar el cobre, 3 lavados con el tubo lleno y después se lavo con HCl 0.1N para remover todo el $\text{Cd}(\text{OH})_2$, aproximadamente dos volúmenes con el tubo lleno.
4. Posteriormente se lavo el cadmio con NH_4Cl (solución acuosa al 5% ajustado el pH a 9 con borato de sodio)

Nota: el cadmio se puede guardar en esta solución hasta el ensayo y se puede volver a reutilizar lavando sin platear el cadmio.

Procesamiento de la muestra

1. Se adicionaron a 100 μL del plasma 300 μL de agua bidestilada (la dilución es 1:4).
2. Se tiraron 20 μL de la dilución anterior y se adicionaron 20 μL de la solución de ZnSO_4 , mezclar bien. Se separo el precipitado por centrifugación durante 5 min a 10,000 rpm.
3. Al tubo con al cadmio activado se le tiro el NH_4Cl escurriéndolo lo mejor posible y se le adicionó al tubo todo el sobrenadante de la muestra, se dejo en agitación tapado con parafilm en un rocker durante 15 min.
4. Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante 5 min.

5. Se tomaron 200 μL del sobrenadante para el ensayo de la muestra siguiendo los pasos de la tabla.
6. Se construyo la curva de calibración con el patrón
7. Se determino la concentración de nitritos. **17,7**

Tubo	Estándar	Agua destilada
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
muestra	200 del sobrenadante	700

Adicionar 50 μL de sulfanilamida. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente

Adicionar 50 μL del reactivo de NED, mezclar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente

Leer a 540 nm.

Cuadro 2. Curva patrón y procesamiento de la muestra. Concentración del estándar 200 μg / mL de Nitrito de sodio.

XI. RESULTADOS

Para determinar la toxicidad por la planta determinada "PUCA" se administró en un ensayo agudo una dosis de 100 mg/Kg de peso a una población de 10 ratones y en un ensayo crónico una dosis de 50 mg/Kg de peso a un grupo de 20 ratones.

En la figura 3 se observan los ratones agrupados, esto es porque después de administrarles su dosis del extracto se mostraban agitados y decaídos, inmediatamente se juntaban y se quedaban muy quietos e incluso algunos parecían dormidos o sedados como en estado de postración (A, C). Por el contrario en el grupo control (B y D), después de manipularlos se mostraban con un comportamiento normal, muy inquietos, comiendo o bebiendo agua y algunos peleándose. (Fig. 3)

A)



B)



C)



D)



Fig 3. Efecto ansiolítico provocado por la planta "PUCA". En el inciso A y C se muestran los ratones tratados con la planta "PUCA" y en el inciso B y D se muestran los ratones control. A y B muestran ratones en el día 14 del tratamiento, C y D muestran ratones en el día 23 de tratamiento.

Estas fotos se tomaron con segundos de diferencia entre el grupo tratado y el grupo control, también se puede observar que los ratones tratados están abatidos o decaídos y los ratones control están muy inquietos, observando la diferencia en el comportamiento podemos ver que el extracto de la planta en estudio presenta efectos casi inmediatamente en el grupo tratado.

En el ensayo crónico se hizo la comparación de los resultados entre el grupo control y el grupo tratado aplicando el programa estadístico para las ciencias sociales SPSS (por sus siglas en inglés) versión 11.5. Para 2 muestras independientes con la prueba de t de *Student*. Con un intervalo de confianza de 95% y $\alpha = 0.05$.

Se obtuvo la significancia (P) para facilitar la identificación de los ensayos que mostraron resultados de importancia, esto es, los ensayos en los que el grupo tratado mostro una elevación con respecto a los resultados del grupo control.

Se tomaron como significativos sólo los resultados que mostraron una $P \leq 0.05$.

En el cuadro 3 podemos observar que en el ensayo crónico sólo la creatinina y la peroxidación lipídica son significativos y la ceruloplasmina se encuentra casi en el límite ($P = 0.054$), sin embargo, estos resultados nos indica un posible daño. Los demás resultados no mostraron diferencias significativas, lo que nos indica que los valores encontrados en el tratado no se alteraron en comparación con el grupo control.

ENSAYO DE TOXICIDAD CRÓNICO

Parámetros determinados	Sig. bilateral
Índice esplénico	P = 0.453
Índice hepático	P = 0.399
Índice renal	P = 0.906
Perfil renal	
Urea	P = 0.432
BUN	P = 0.394
Creatinina	P = 0.032*
Perfil Hepático	
TGP/ALT	P = 0.765
TGO/AST	P = 0.520
LDH	P = 0.277
Estrés oxidativo	
Peroxidación lipídica	P = 0.001*
Nitritos	P = 0.271
Indicador de procesos inflamatorios	
Ceruloplasmina	P = 0.054**

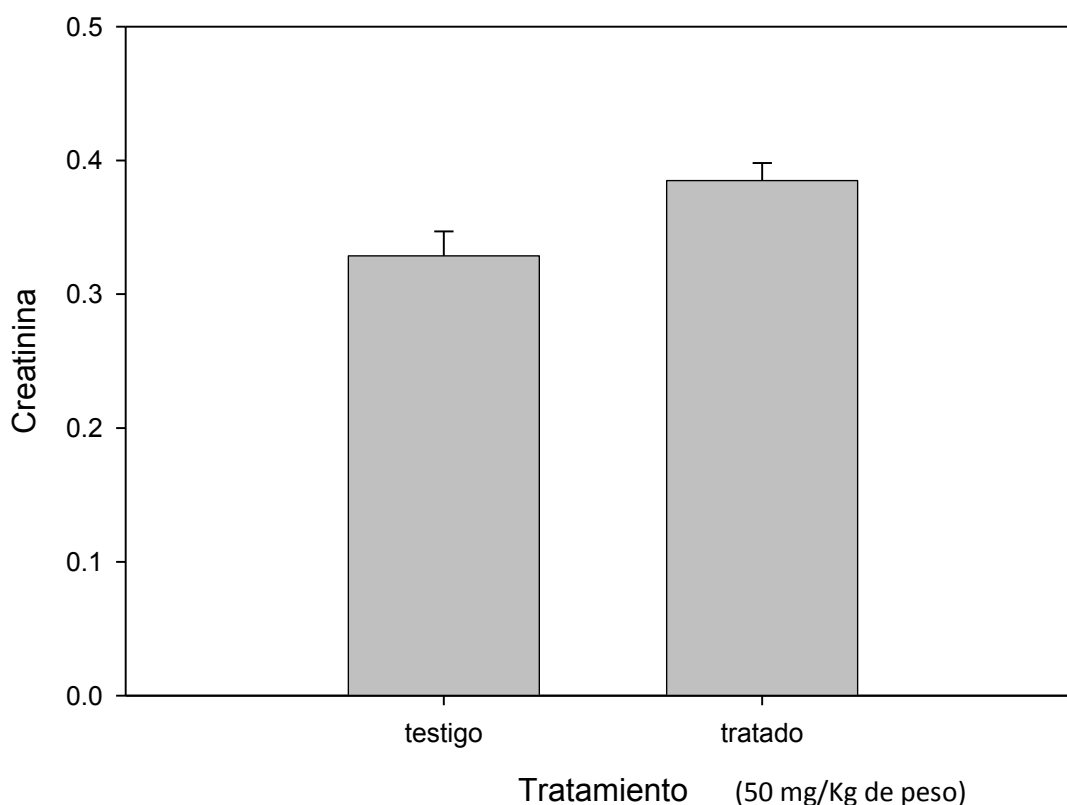
Cuadro 3. Resultados de la significancia del ensayo de toxicidad crónico.

*Resultados significativos, **resultado que quedo en el límite.

Gráficas de los resultados que mostraron significancia en el ensayo crónico.

Las demás gráficas se muestran en el anexo II.

CREATININA	
Tratamiento	Media
Testigo	0.3286
Tratado	0.3850

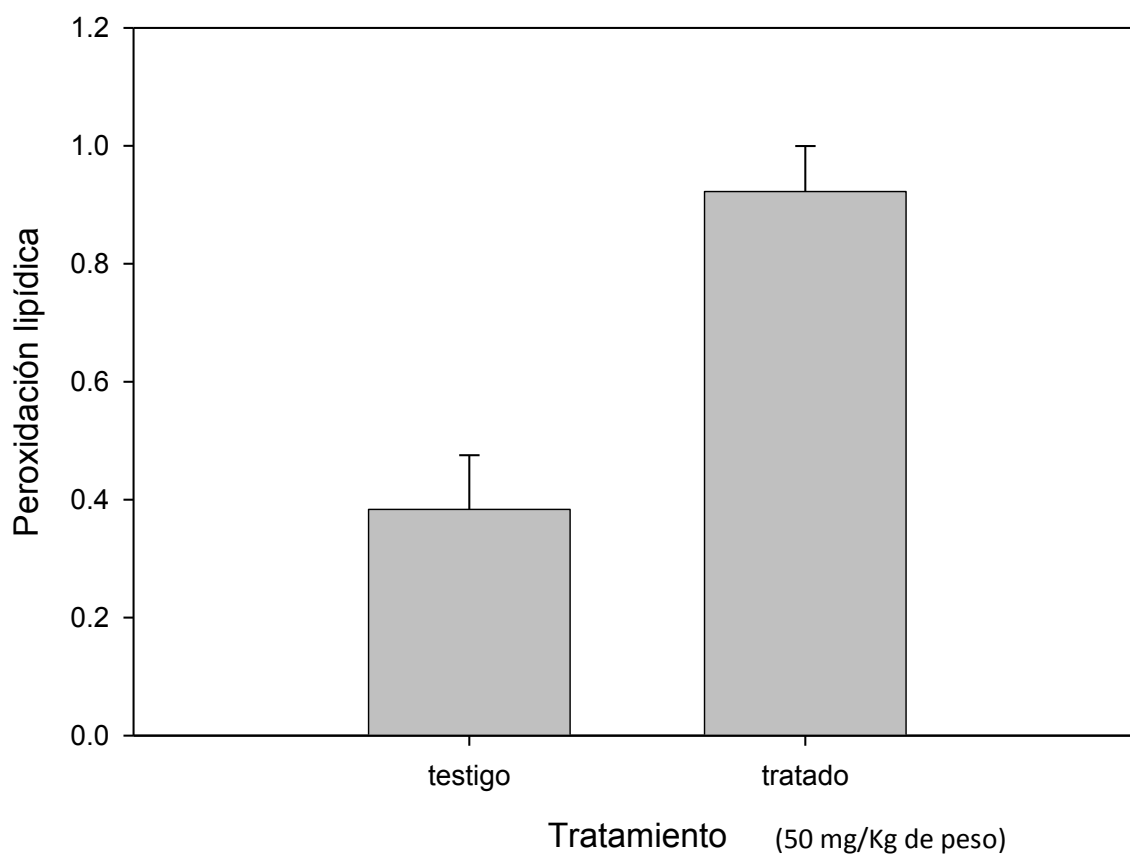


Gráfica 1. Creatinina. Prueba t de Student. $P=0.032$ si es significativa.

En la gráfica 1 se puede observar que el nivel de creatinina, en el grupo de ratones tratados presenta una diferencia estadísticamente significativa con respecto a su grupo control.

La gráfica 2 muestra los resultados obtenidos de la determinación de peroxidación lipídica, se observa una diferencia estadísticamente significativa en el grupo tratado con respecto al grupo control.

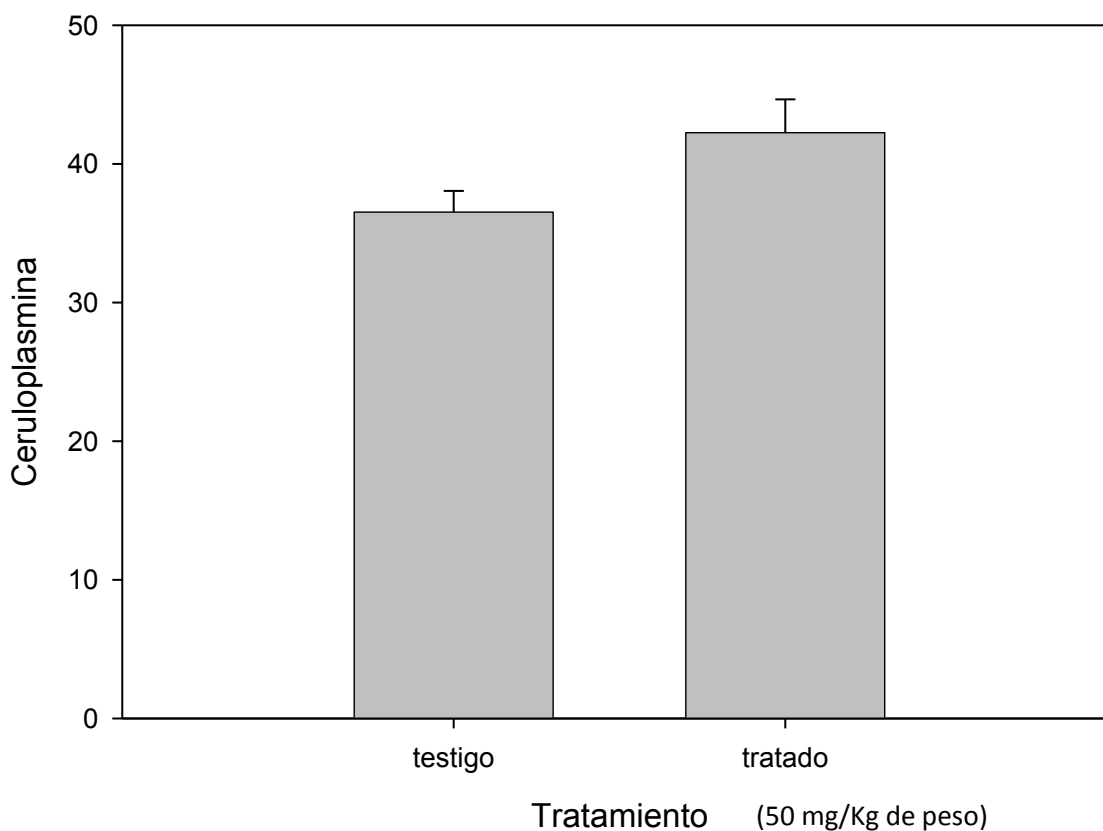
PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	
Tratamiento	Media
Testigo	0.383553
Tratado	0.922500



Gráfica 2. Peroxidación lipídica. Prueba t de Student. $P=0.000$ si es significativa.

La gráfica 3 muestra los resultados obtenidos de la determinación de ceruloplasmina y se observa que la diferencia estadística se encuentra en el límite por lo que no se considera significativa con respecto a los animales testigo.

CERULOPLASMINA	
Tratamiento	Media
Testigo	36.5211
Tratado	42.2550



Gráfica 3. Ceruloplasmina. Prueba t de Student. $P=0.054$ no significativa. Sin embargo se encuentra en el límite.

En el ensayo de toxicidad agudo también se hizo la comparación de los resultados entre el grupo control y el grupo tratado aplicando el programa estadístico SPSS versión 11.5. Para 2 muestras independientes con la prueba de t de *Student*. Con un intervalo de confianza de 95% y $\alpha = 0.05$.

Se tomaron como significativos los resultados que mostraron una $P \leq 0.05$.

En el cuadro 4 podemos observar que sólo el índice hepático y renal, y la ceruloplasmina son significativos. Los demás resultados no mostraron diferencias significativas.

ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDO

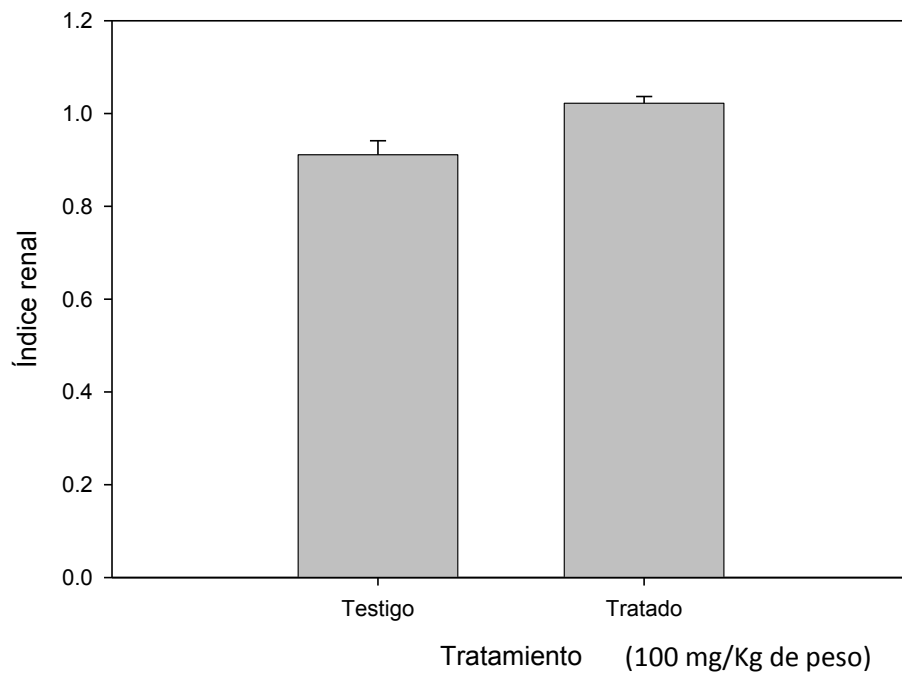
Parámetros determinados	Sig. Bilateral
Índice esplénico	P = 0.090
Índice hepático	P = 0.001*
Índice renal	P = 0.005*
Perfil renal	
Urea	P = 0.892
BUN	P = 0.961
Creatinina	P = 0.123
Perfil Hepático	
TGP/ALT	P = 0.407
TGO/AST	P = 0.072
LDH	P = 0.092
Indicador de procesos inflamatorios	
Ceruloplasmina	P = 0.012*

Cuadro 4. Resultados de la significancia del ensayo de toxicidad agudo.

*Se Observa que sólo 3 ensayos fueron significativos.

Gráficas de los resultados que mostraron significancia en el ensayo agudo. Las demás gráficas se muestran en el anexo II.

La gráfica 4 muestra los resultados obtenidos de la determinación del índice renal y se observa la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado y el grupo control.

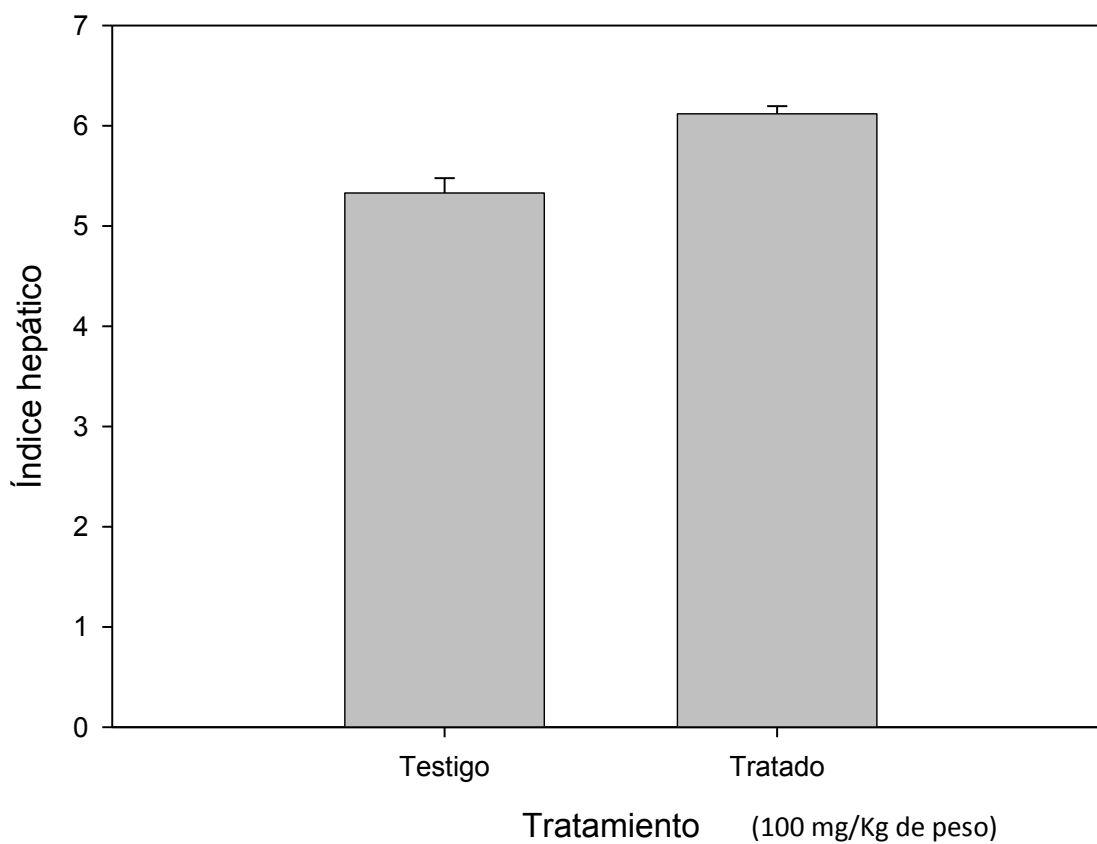


Gráfica 4. Índice renal. Prueba t de Student. P=0.005 Significativa.

ÍNDICE RENAL	
Tratamiento	Media
Testigo	0.9110
Tratado	1.0222

La gráfica 5 muestra los niveles del índice hepático y se observa una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado y el grupo control.

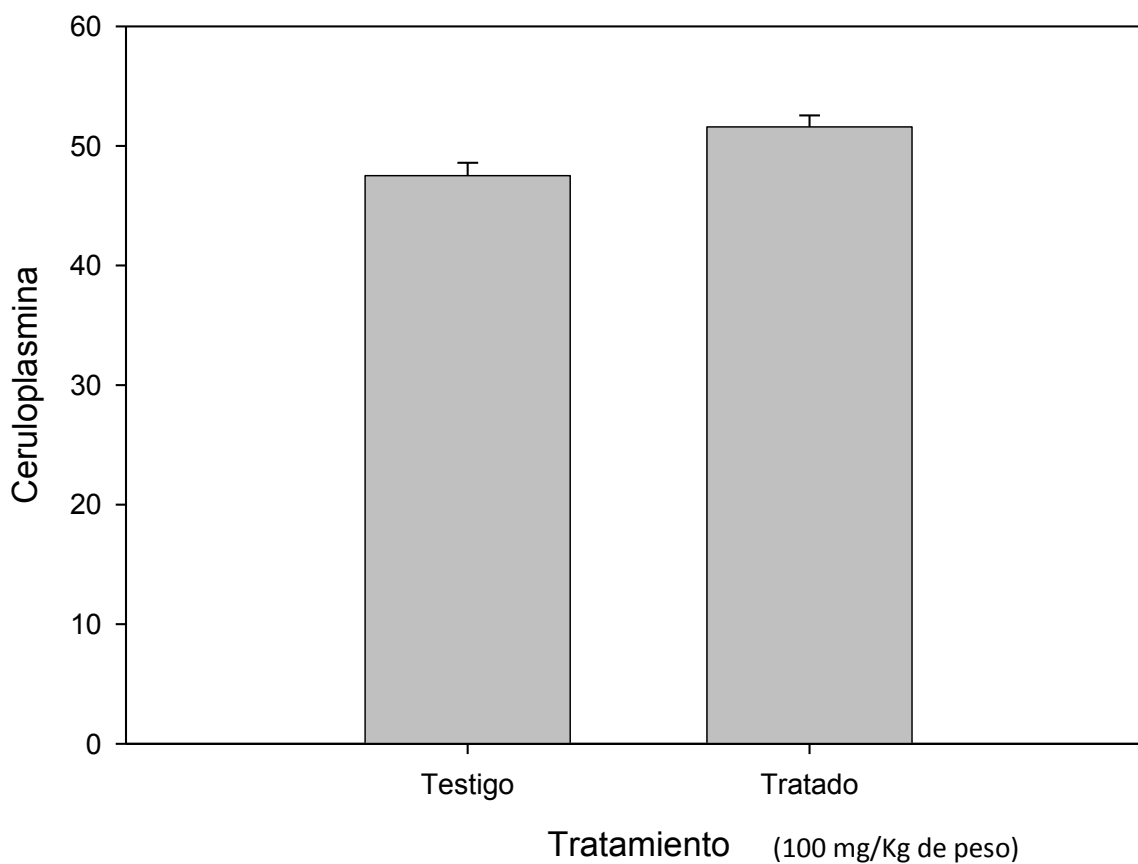
ÍNDICE HEPÁTICO	
Tratamiento	Media
Testigo	5.3290
Tratado	6.1200



Gráfica 5. Índice hepático. Prueba t de Student. P=0.000 Significativa.

La gráfica 6 muestra los niveles de ceruloplasmina y se puede observar una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo tratado con respecto al grupo control.

CERULOPLASMINA	
Tratamiento	Media
Testigo	47.5200
Tratado	51.6000



Gráfica 6. Ceruloplasmina. Prueba t de Student. P=0.012 Significativa.

XII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

“Lo natural” es un concepto que resulta seductor en muchos sentidos, se suelen elogiar sus ventajas a distintos niveles, entre ellos la salud, ofreciéndose como opción terapéutica casi milagrosa e inofensiva en el tratamiento de distintas enfermedades, sin embargo, muchos desconocen que algunos de estos mismos productos que aparentan ser inocuos y que se usan frecuentemente, pueden llegar a ser peligrosos. **Este es el caso de la planta del burro “PUCA”, ya que tanto en el ensayo agudo como en el crónico** después de administrar las dosis indicadas al grupo tratado, los ratones mostraron un cambio en su comportamiento; se mostraron agitados y casi inmediatamente se agruparon quedándose quietos como si estuvieran sedados, en un estado de postración, a diferencia del grupo control que no mostró ningún cambio en su comportamiento, después de manipularlos se ponían inquietos, algunos comiendo, bebiendo agua o peleando, un comportamiento que se podría considerar normal en estos animales, (Fig. 3).

De acuerdo a los datos obtenidos en este estudio, a través de la t de Student para la igualdad de medias, podemos observar en el cuadro 3, que en el ensayo crónico se muestra significancia para creatinina, peroxidación lipídica y podemos ver que la ceruloplasmina quedo en el límite; en el cuadro 4 se muestran los resultados del ensayo agudo y se puede observar que existen diferencias significativas para ceruloplasmina, índice hepático e índice renal.

Los resultados nos indican que en el ensayo agudo se produjo un daño hepático ya que hay una diferencia muy marcada en el índice hepático ($P = 0.001$), así como también en el índice renal ($P = 0.005$).

Se ha reportado que la ceruloplasmina se comporta como proteína reactante de fase aguda (se llaman así porque en situaciones de stress, procesos inflamatorios o traumatismos aumentan su concentración para compensar esos estados), por lo tanto existe una lesión que independientemente de su etiología, hizo que se desencadenara un proceso inflamatorio que normalmente es mediado por diferentes factores, en este caso uno de los factores de interés fue la ceruloplasmina.¹⁸

En el ensayo crónico podemos observar que el valor de significancia esta en el limite ($P = 0.054$), esto pudo ser debido a que la ceruloplasmina tiene una vida media corta aproximadamente de 5 días y el ensayo crónico no fue realizado en ese plazo, este se realizó al día 30, a diferencia del ensayo agudo que se realizo al día 7 y si presento diferencia significativa ($P = 0.012$).¹⁹

En el caso de la creatinina, sabemos que esta se excreta completamente por los riñones y, por tanto, es directamente proporcional a la función excretora renal y por eso, con una función excretora renal normal, la creatinina sérica debe permanecer constante y normal, lo cual no se cumplió en el ensayo crónico ya que se muestra una elevación significativa en comparación con el grupo control, por lo tanto podemos deducir que se produjo un daño renal.²⁰

En la cuadro 3 también podemos observar que la peroxidación lipídica tiene una significancia muy marcada, lo cual se puede percibir mejor en la gráfica 2. Estos datos son muy importantes debido a que los fosfolípidos presentes en las membranas plasmáticas y de organelos están sujetos a peroxidación lipídica. Además una consecuencia

significativa de la peroxidación lipídica es un aumento de la permeabilidad de las membranas a una afluencia de calcio y otros iones con la consiguiente hinchazón de la célula y su apoptosis. Las proteínas también son susceptibles a daños debido a estos radicales, y las proteínas que han sufrido daños pueden estar sujetas a velocidades de digestión más elevadas por proteasas.

Pero sin duda, la consecuencia más importante de la peroxidación lipídica es la lesión tanto del DNA nuclear como mitocondrial que da lugar a mutaciones. **21**

Esto nos indica que esta planta presenta el efecto ansiolítico deseado por las personas que la ingieren. Sin embargo, estos efectos se pueden percibir o sentir pero los efectos tóxicos que presenta la planta no son perceptibles a simple vista y por eso hay que tener más cuidado al ingerir estos remedios naturales.

XIII. CONCLUSION

En el ensayo de toxicidad agudo con dosis de 100 mg/Kg de peso, se logro observar que los ratones mostraron un efecto ansiolítico casi inmediato a la administración. Las determinaciones realizadas nos indican la presencia de un proceso inflamatorio agudo debido quizá a un daño renal al verse alterado el índice renal o a un daño hepático observado por la elevación en el índice hepático.

En el ensayo de toxicidad crónico con dosis de 50 mg/Kg de peso, también se obtuvo una alteración en su comportamiento, encontrándose en un estado de postración, como si estuvieran sedados; en cuanto a las determinaciones realizadas se obtuvo una alteración en la creatinina indicando un daño renal, así como también, un aumento en los radicales libres (peroxidación lipídica).

Con estos resultados se puede concluir que esta planta efectivamente tiene efectos ansiolíticos pero también tiene efectos muy tóxicos, esto si es consumida constantemente o en abundantes cantidades; pudiendo dañar hígado, riñón o provocando un daño oxidativo a moléculas importantes como lípidos, proteínas y DNA.

XIV. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES

Debido a que la ceruloplasmina tiene una vida media corta, se puede realizar su determinación a la mitad y al final del ensayo crónico para observar si efectivamente hay alguna diferencia significativa y si hay variación por el tiempo en que se determina.

XV. ANEXOS

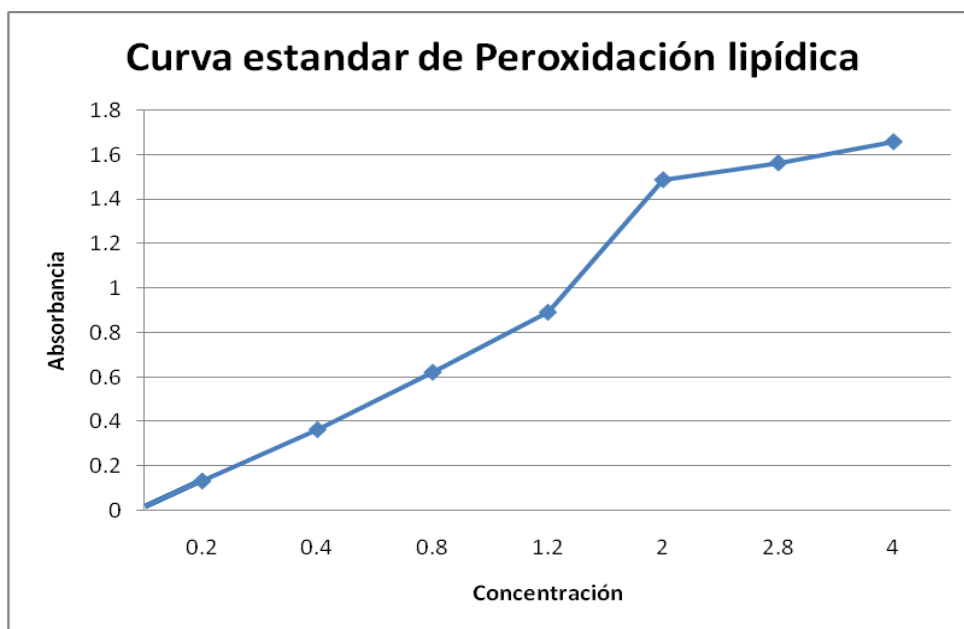
ANEXO I

CURVA ESTANDAR DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA Y NITRITOS

Peroxidación lipídica (MDA). Método de TBA (Ácido Tiobarbitúrico)

Tubo	TMP (μL)	H ₃ PO ₄ (μL)	TBA (μL)	H ₂ O (μL)	Abs.	MDA ($\mu\text{M/L}$)
Blanco	0	600	200	200	0	0
1	5	600	200	200	0.133	0.2
2	10	600	200	198	0.364	0.4
3	20	600	200	196	0.622	0.8
4	30	600	200	194	0.892	1.2
5	50	600	200	190	1.488	2.0
6	70	600	200	186	1.564	2.8
7	100	600	200	180	1.659	4.0

Cuadro 5. Concentraciones para la curva estándar de MDA para peroxidación lipídica



Nitritos mediante el método de Griess

Tubo	Estándar	Agua destilada	Abs.	Concentración ($\mu\text{g} / \text{mL}$)
1	0	900	0	0
2	100	800	0.137	0.2
3	200	700	0.213	0.4
4	300	600	0.336	0.6
5	400	500	0.403	0.8
6	500	400	0.538	1.0

Adicionar 50 μL de sulfanilamida. Incubar

10 minutos a temperatura ambiente

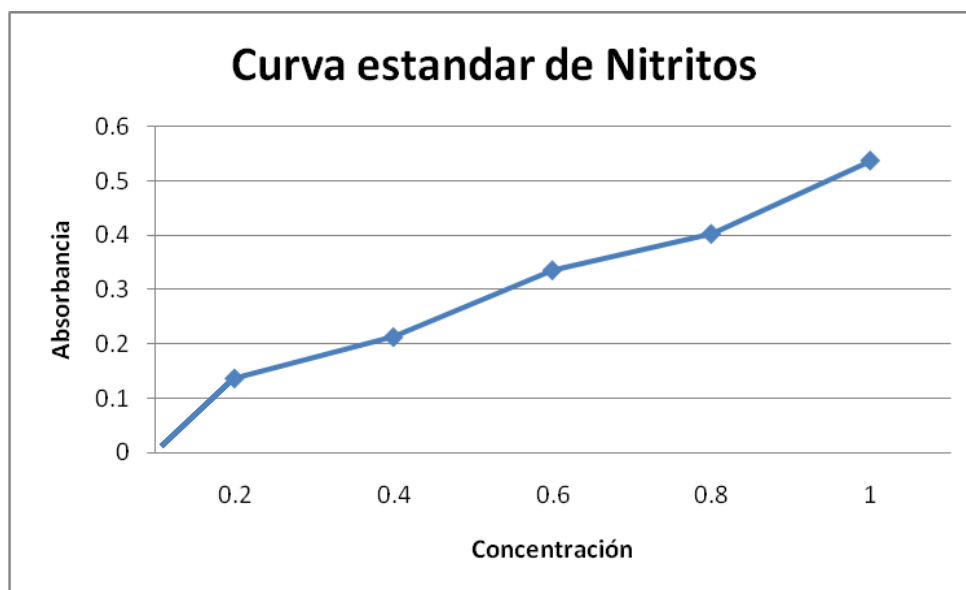
Adicionar 50 μL del reactivo de NED,

mezclar e incubar 30 minutos a

temperatura ambiente

Leer a 540 nm.

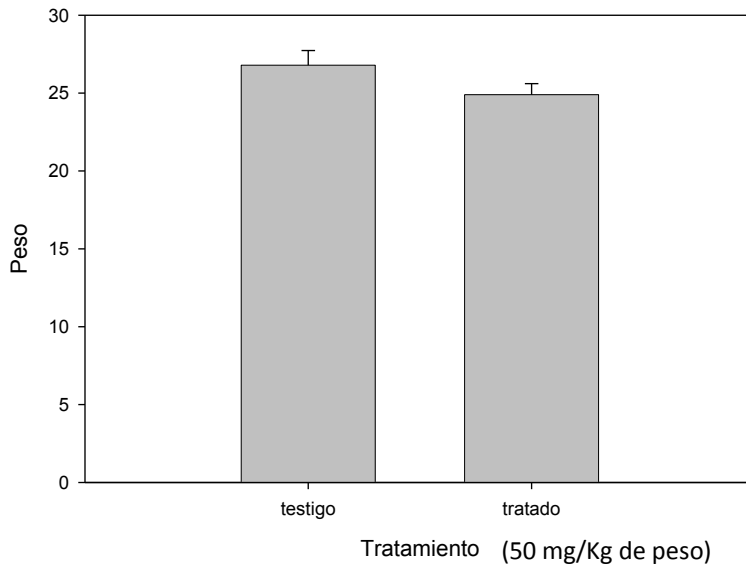
Cuadro 6. Curva patrón. Concentración del estándar 200 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de Nitrito de sodio.



ANEXO II

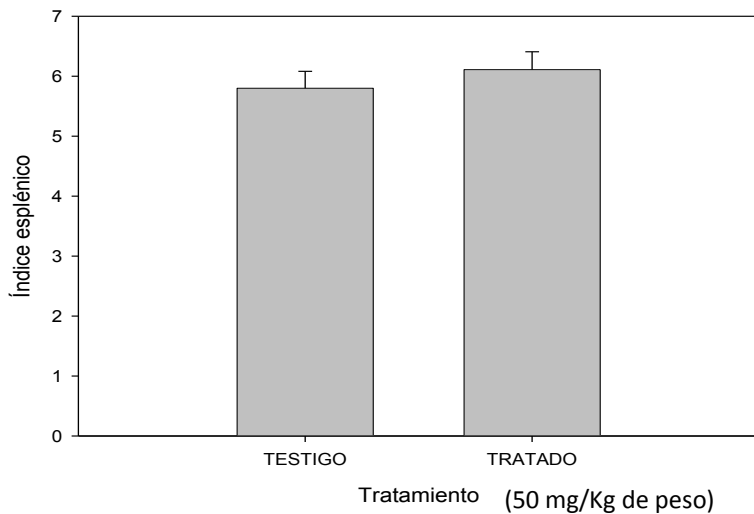
Resultados NO significativos del ensayo agudo y crónico

Ensayo de toxicidad crónica



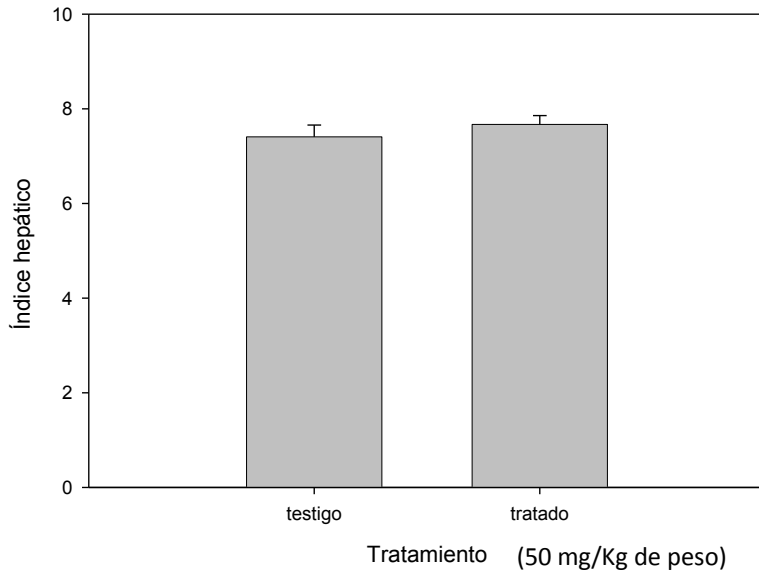
PESO	
Tratamiento	Media
Testigo	26.7895
Tratado	24.9000

Gráfica 7. Peso. Prueba t de Student. $P=0.115$ no significativa.



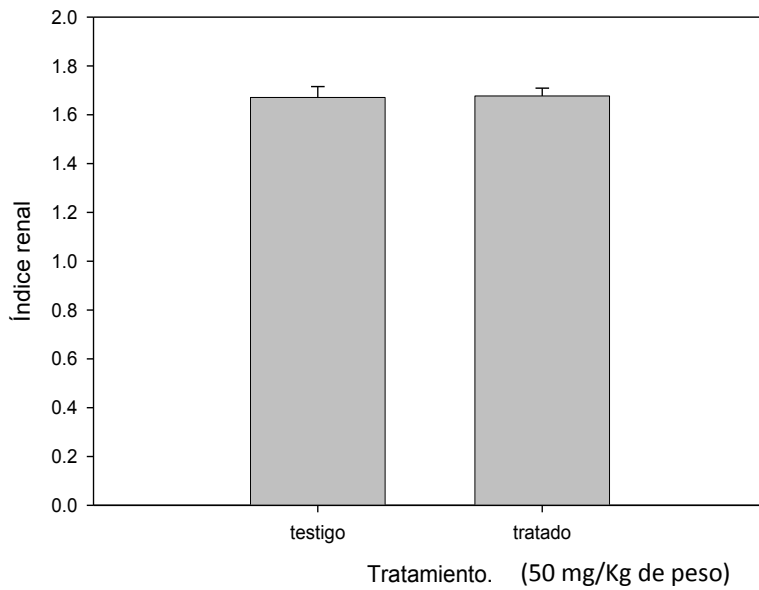
ÍNDICE ESPLÉNICO	
Tratamiento	Media
Testigo	5.7974
Tratado	6.1090

Gráfica 8. Índice esplénico. Prueba t de Student. $P=0.453$ no significativa.



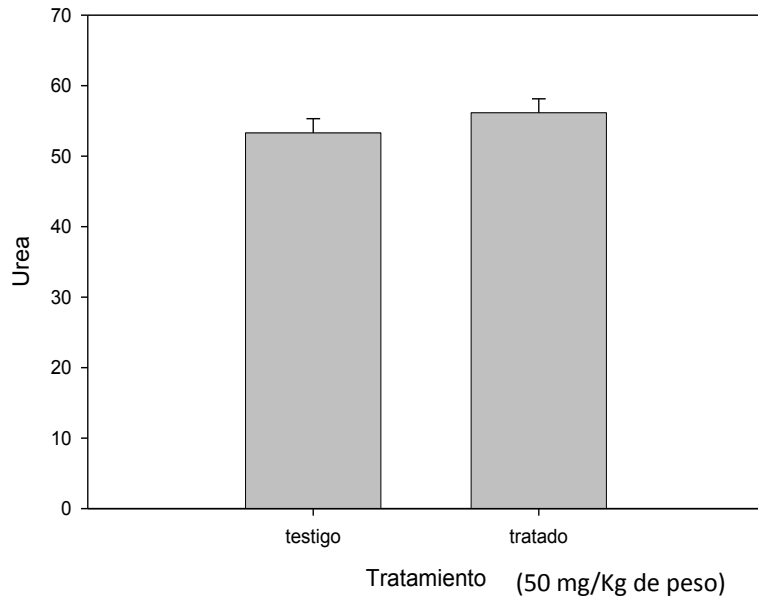
INDICE HEPÁTICO	
Tratamiento	Media
Testigo	7.4068
Tratado	7.6700

Gráfica 9. Índice hepático. Prueba t de Student. P=0.399 no significativa.



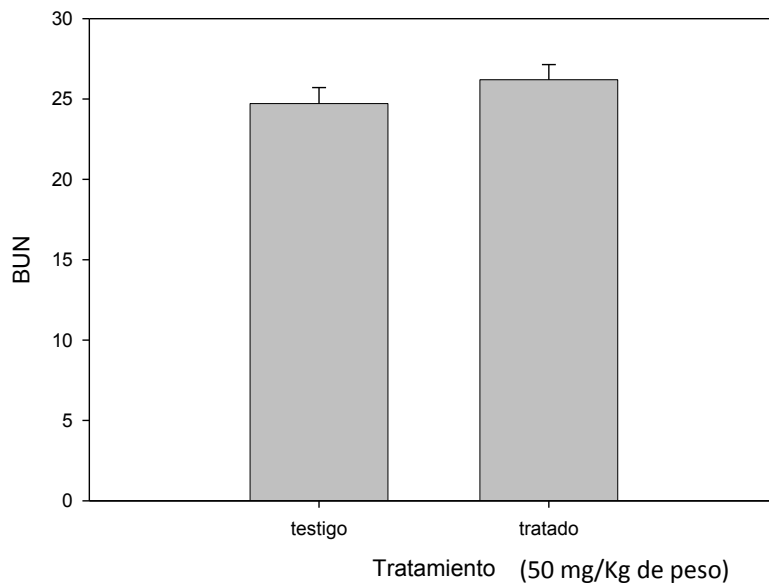
INDICE RENAL	
Tratamiento	Media
Testigo	1.6705
Tratado	1.6770

Gráfica 10. Índice renal. Prueba t de Student. P=0.906 no significativa.



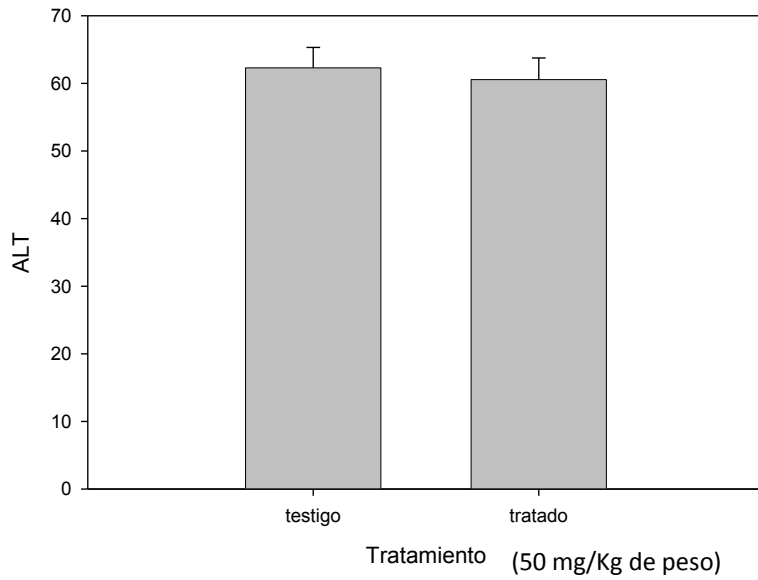
UREA	
Tratamiento	Media
Testigo	53.2857
Tratado	56.1500

Gráfica 11. Urea. Prueba t de Student. P=0.432 no significativa.



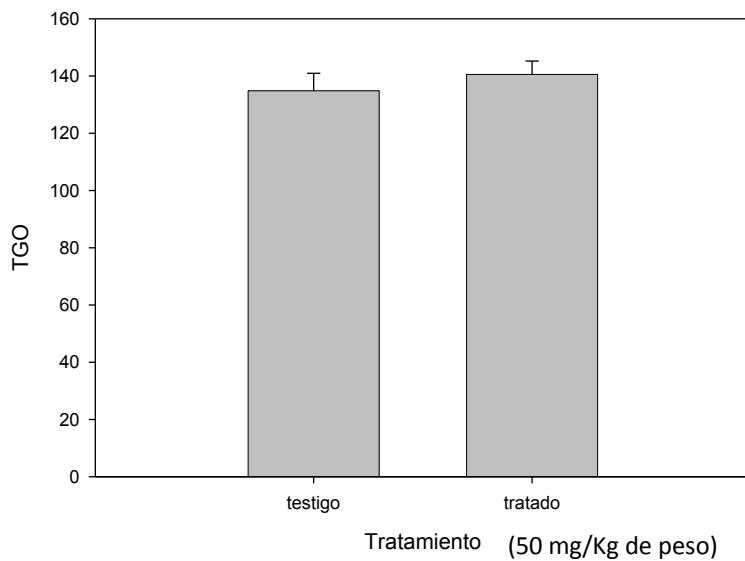
BUN	
Tratamiento	Media
Testigo	24.7143
Tratado	26.2000

Gráfica 12. BUN. Prueba t de Student. P=0.394 no significativa.



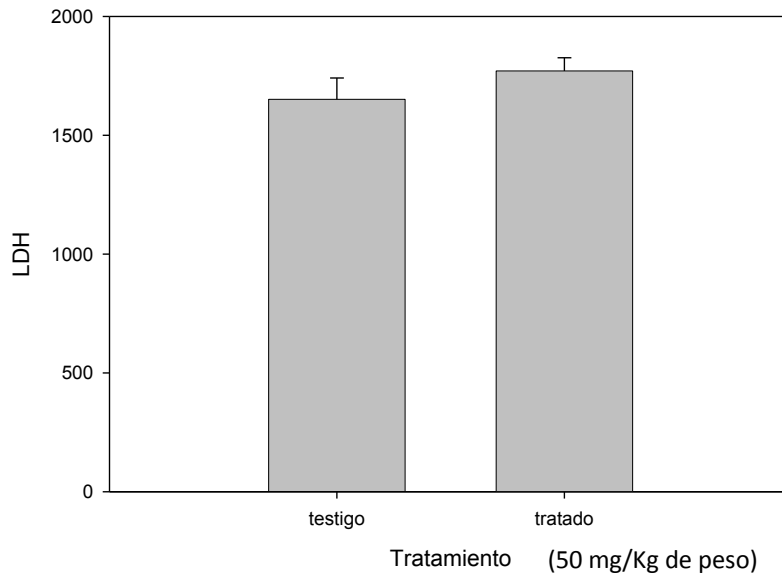
TGP/ALT	
Tratamiento	Media
Testigo	62.2857
Tratado	60.5500

Gráfica 13. TGP/ALT. Prueba t de Student. $P=0.765$ no significativa.



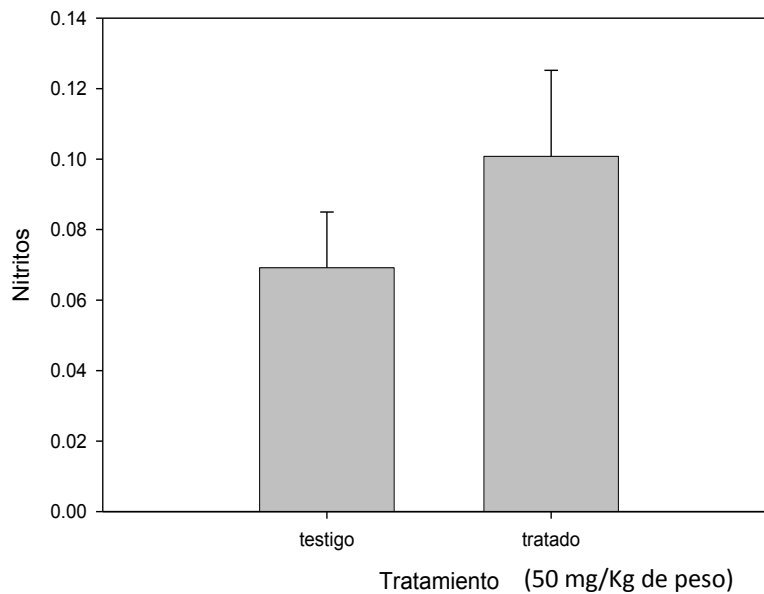
TGO/AST	
Tratamiento	Media
Testigo	134.8571
Tratado	140.5577

Gráfica 14. TGO/AST. Prueba t de Student. $P=0.520$ no significativa.



LDH	
Tratamiento	Media
Testigo	1651.1490
Tratado	1770.8500

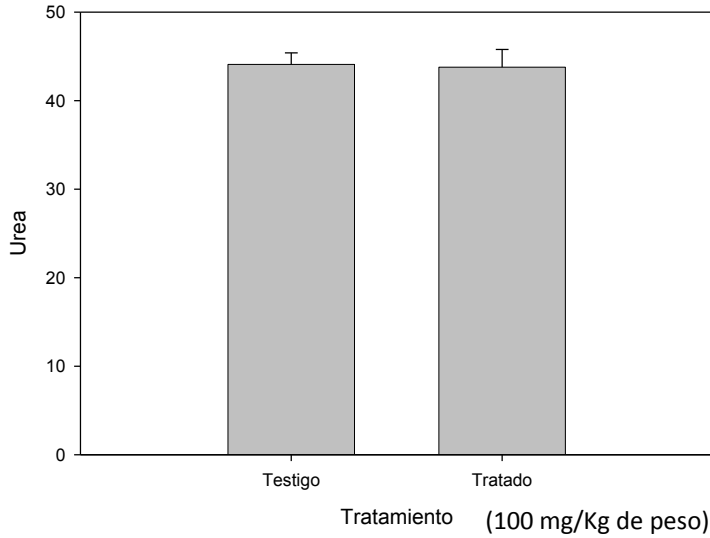
Gráfica 15. LDH. Prueba t de Student. P=0.277 no significativa.



NITRITOS	
Tratamiento	Media
Testigo	0.0692
Tratado	0.1008

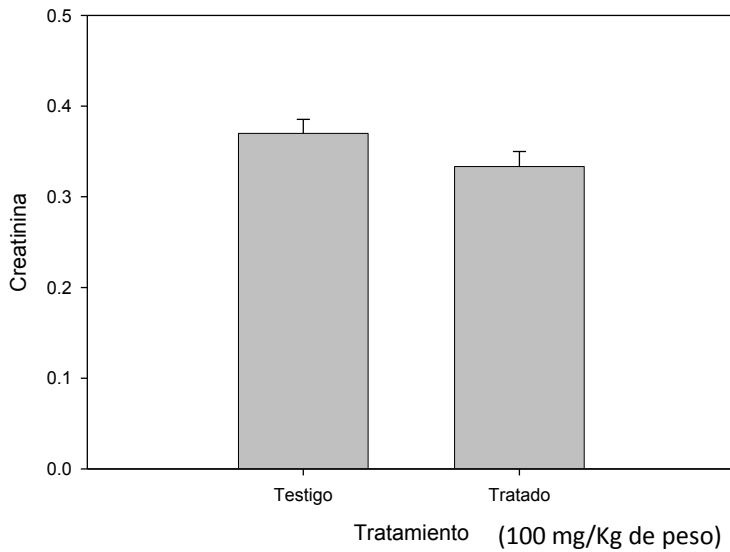
Gráfica 16. Nitritos. Prueba t de Student. P=0.271 no significativa.

Ensayo de toxicidad agudo



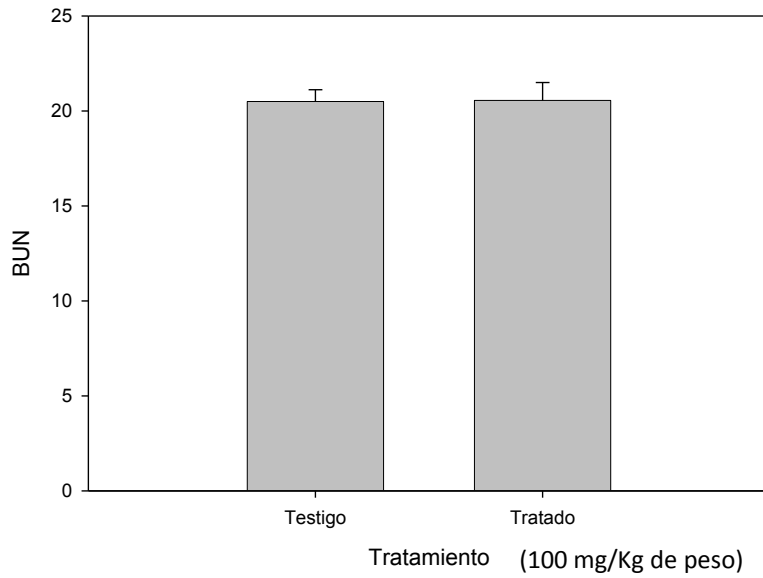
UREA	
Tratamiento	Media
Testigo	44.1000
Tratado	43.7778

Gráfica 16. Urea. Prueba t de Student. $P=0.892$ no significativa.



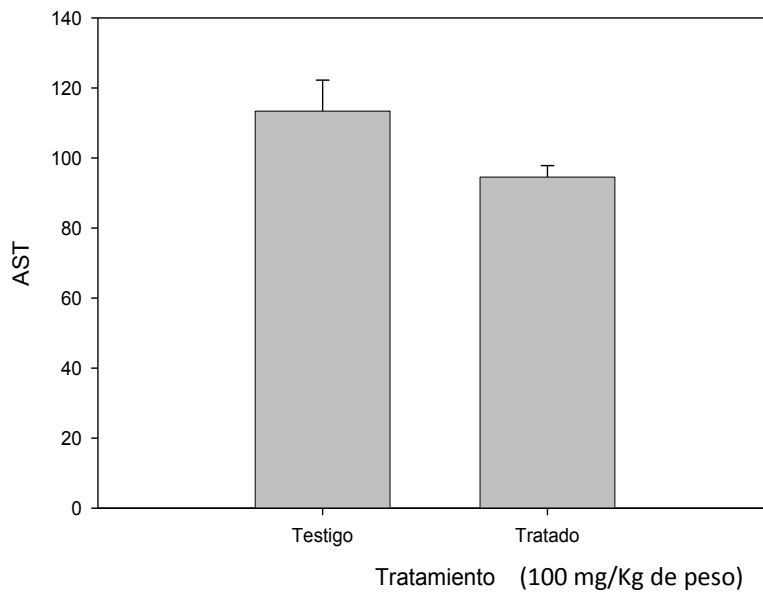
CREATININA	
Tratamiento	Media
Testigo	0.3700
Tratado	0.3333

Gráfica 16. Creatinina. Prueba t de Student. $P=0.123$ no significativa.



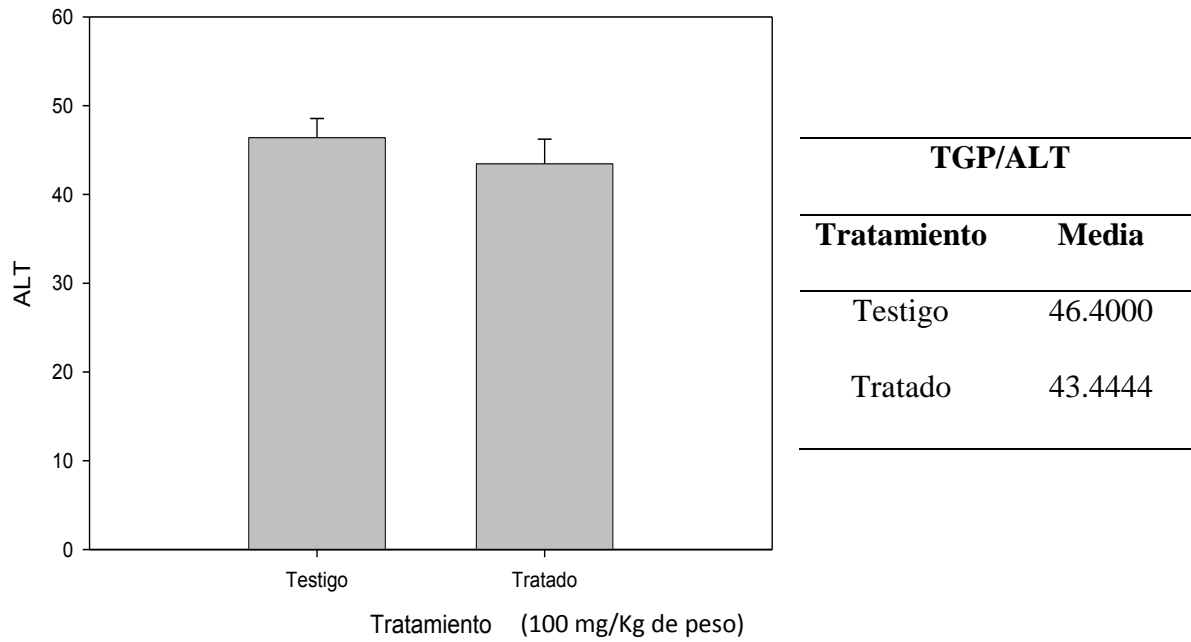
BUN	
Tratamiento	Media
Testigo	20.5000
Tratado	20.5556

Gráfica 16. BUN. Prueba t de Student. P=0.961 no significativa.

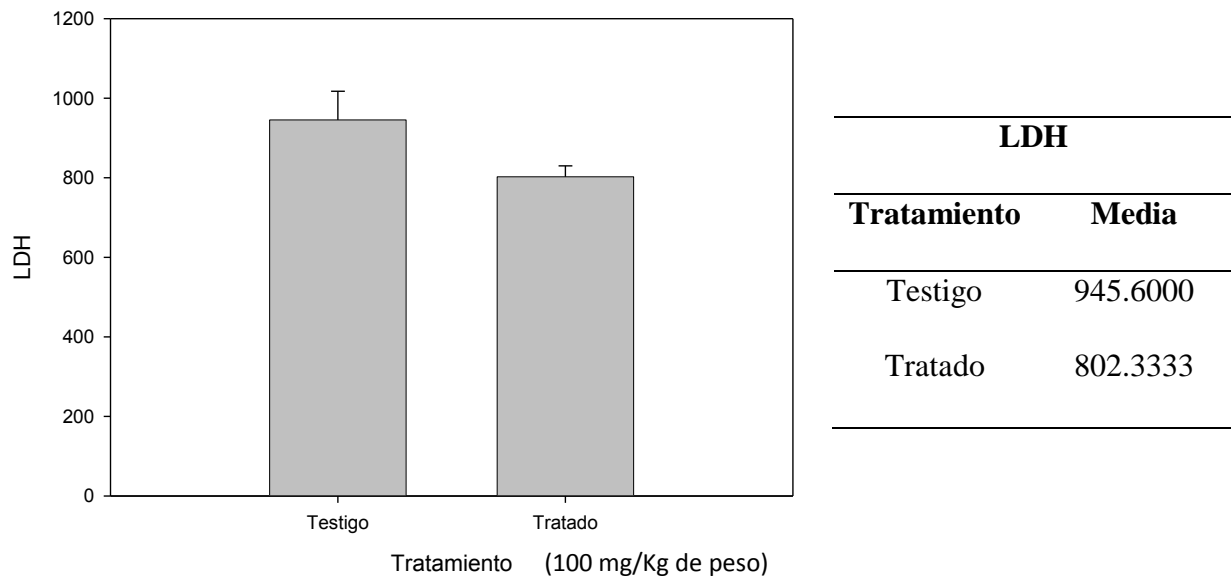


TGO/AST	
Tratamiento	Media
Testigo	113.4000
Tratado	94.5556

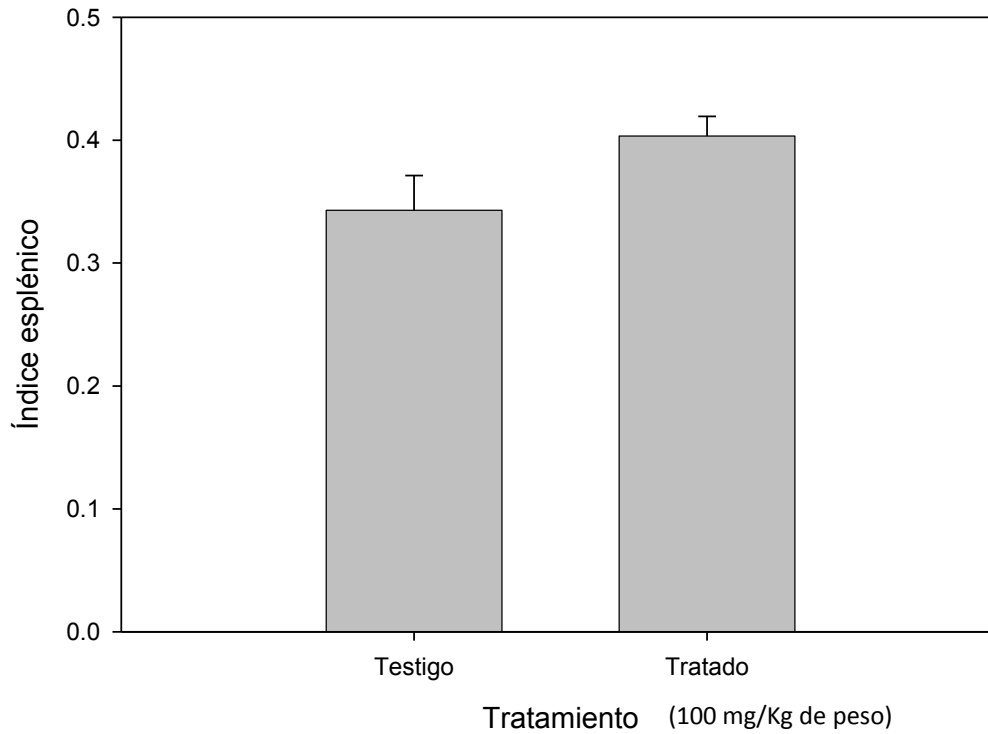
Gráfica 16. TGO/AST. Prueba t de Student. P=0.072 no significativa.



Gráfica 16. TGP/ALT. Prueba t de Student. $P=0.407$ no significativa.



Gráfica 16. LDH. Prueba t de Student. $P=0.092$ no significativa.



Gráfica 16. Índice esplénico. Prueba t de Student. $P=0.090$ no significativa.

ÍNDICE ESPLÉNICO	
Tratamiento	Media
Testigo	0.3430
Tratado	0.4033

XVI. REFERENCIAS

1. Hernández M, Gally M. Plantas medicinales. Colombia: Editorial Pax; 1981.
2. Corsi M. Aproximaciones de las neurociencias a la conducta. 2ª ed. México: UNAM; 2004.
3. Ansiedad. [Pagina de internet]. No fecha [Citado 2010 Febrero 3]. Esta disponible en
<<http://132.248.60.110/farmacologia/nervioso/sn17-25.pdf>>
4. Dietética y salud. Soluciones naturales contra la ansiedad. [<http://www.revistadieteticaysalud.com>] No fecha [Citado 2010 Febrero 3]. Esta disponible en
<http://www.revistadieteticaysalud.com/articulos/mente/ansiedad.htm>
5. Mendoza N. farmacología medica. México: Editorial medica panamericana; 2008.
6. Mardomingo M, Rodríguez P, Velasco A. Psicofarmacología del niño y del adolescente. Madrid: Ediciones Díaz de Santos; 2000.
7. Duch F, Ruiz de Porras L, Gimeno D. Manejo clínico de los ansiolíticos. Revista Semergen. 1998; 10: 826-36.
8. Gómez U. Plantas y medicamentos naturales [<http://www.elhospitalblog.com>]. [actualización 2007 Agosto 28; citado 2010 Febrero 3]. Esta disponible en
http://www.elhospitalblog.com/mambo/index.php?option=com_content&task=view&id=38&Itemid=47
9. Castillo E, Martínez I. Manual de fitoterapia. España: Elsevier Masson; 2007.
10. Banha J, Marques L, Oliveira R, Martins M, Paixão E, Pereira D, y otros. Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: A new link between immunity and iron metabolism. Portugal. 2007.
11. Teijón J, Garrido A. Fundamentos de bioquímica estructural. 2ª ed. Madrid: Editorial Tébar; 2006.
12. Robbins and Cotran. Patología estructural y funcional. 7ª ed. Madrid: Elsevier; 2005.
13. Pérez C. Evaluación de la actividad fagocítica y radicales libres de dos extractos de Barreta (*Helietta parvifolia*) en un modelo de ratas. [Tesis experimental]. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2009.
14. Montero M. Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk. [Tesis de doctorado]. México: Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela; 2000.

15. Lira V, Arredondo R. Óxido nítrico: un héroe disfrazado de villano. Revista elemento, ciencia y cultura. 2004.
16. Marroquín R, Flores M, Carreón R, García M, Mora J, Aguilar A, Hernández V. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw oedema and granuloma tissue formation in mice. Journal of Ethnopharmacology. 2009; 124.
17. **Maldonado M. Efectos de la infusión de la corteza de la planta "PAX" en las concentraciones de glucosa en sangre en pacientes diabéticos no insulino pénicos.** [Tesis experimental]. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM; 2000.
18. Carrasco M, Paz J. Tratado de emergencias médicas. España: Arán ediciones; 2000.
19. Leonor Thomson. Proteínas plasmáticas. [<http://enzimologia.fcien.edu.uy/index.htm>] No fecha [Citado 2010 Agosto 7]. Esta disponible en <http://enzimologia.fcien.edu.uy/teoricos%202009/Proteinas%20plasmaticas.pdf>
20. Deska K, James T. Guía de pruebas diagnósticas y de laboratorio. 5ª ed. España: Elsevier; 2001.
21. Devlin T. Bioquímica: libro de texto con aplicaciones clínicas. 4ª ed. España: Reverte; 2004.