



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

EFFECTO TÓXICO DE LA *THEVETIA PERUVIANA*,  
DETERMINADO MEDIANTE MARCADORES  
ENZIMÁTICOS EN UN MODELO DE RATÓN

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LAURA EDITH MILLÁN MEJÍA

DIRECTOR DE TESIS:

DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

FES ZARAGOZA, 2010





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## AGRADECIMIENTOS

Con estas líneas quiero agradecer a todas aquellas personas que han enriquecido mi vida personal y profesional.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermano por su cariño.

A Irving por darle brillo a mi vida.

A mis amigos porque siempre están ahí.

A mis compañeros del laboratorio que hicieron sumamente agradable mi estancia.

A la Mtra. María Isabel Garduño Pozadas y al Profesor Víctor Becerra por apoyarme académicamente, por sus consejos y por ser como son.

A la Dr. Patricia Parra Cervantes por su valioso tiempo y su enriquecedora opinión

Al M.C. Ricardo Calvillo Esparza quien me compartió sus conocimientos en histología.

Al O.F.B. Armando Ramírez González quien me apoyo con las determinaciones enzimáticas.

Al Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara quien me guió en el estudio estadístico y enriqueció este trabajo con sus observaciones.

A la M. en C. Abigail Aguilar Contreras por compartirme sus saberes en herbolaria.

Al Químico Carlos Salvador Valadez Sánchez y a su equipo de trabajo por habernos provisto del extracto de Thevetia peruviana.

Al personal del Bioterio y del departamento de Histología por sus valiosos aportes.

A la Mtra. Yolanda Flores Cabrera por su dedicación y tiempo al revisar este trabajo.

Al M.C. Maurilio Flores Pimentel por su valioso asesoramiento en este proyecto.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura por su gran calidad humana, por permitirme realizar este proyecto y más que nada por compartir su sabiduría.

A la UNAM, fuente de conocimiento y libertad.

## **El viaje de Darwin**

El joven Charles Darwin no sabía qué hacer con su vida. El padre lo estimulaba:

*-Serás una desgracia para ti y para la familia.*

A fines de 1831, se fue.

Regresó a Londres después de cinco años de navegaciones por el sur de América, las islas Galápagos y otros parajes. Trajo tres tortugas gigantes, una de las cuales murió en el año 2007, en un zoológico de Australia.

Volvió cambiado. Hasta el padre se dio cuenta:

*-¡Tu cráneo tiene otra forma!*

No sólo traía tortugas. También traía preguntas. Tenía la cabeza llena de preguntas.

*Espejos, Eduardo Galeano.*

## 1.0 RESUMEN

Se evaluó el efecto tóxico de la *Thevetia peruviana*, induciendo intoxicación aguda (100 mg/Kg) durante una semana e intoxicación subcrónica (50 mg/Kg) en un mes; en dos grupos de ratones CD1 de 1 mes de edad y 30 g de peso, por administración oral del extracto acuoso de *Thevetia peruviana*.

Se determinó ceruloplasmina por el método de Mancini y proteína C reactiva, como indicadores de inflamación aguda; se valoró la peroxidación lipídica siguiendo el método de Aust, se determinó la producción de  $\text{NO}_2^-$  (técnica de Griess). De igual manera las enzimas hepáticas AST y ALT, y las enzimas cardíacas CK, CK MB y LDH, para evaluar algún daño en estos órganos. Se realizaron cortes histológicos de corazón en busca de necrosis, así mismo fue monitoreado el cambio de peso de los ratones.

En la intoxicación aguda se encontró diferencia significativa en ceruloplasmina y una disminución importante de peso para el grupo tratado (10 g); para la intoxicación subcrónica en ninguna determinación hubo diferencias significativas, pero se encontraron zonas de necrosis e infiltraciones leucocitarias en tejido cardíaco. A los 15 días se presentó una disminución importante de peso (hasta 10 g), pero al finalizar el estudio los ratones recuperaron el peso perdido. Los grupos tratados aumentaban de peso en una proporción menor que los grupos testigo. Concluyendo que las dosis manejadas no producen daño hepático, pero si afectan el corazón produciendo microinfartos; al emplear una dosis constante por largo tiempo los efectos adelgazantes disminuyen. El empleo de esta planta causa severos daños a la salud.

## 2.0 INTRODUCCIÓN

En la actualidad el uso de plantas medicinales para el tratamiento de los diferentes padecimientos ha resurgido con gran fuerza, llegando en algunos casos, a darse abuso de éstos, ocasionando con ello el surgimiento de múltiples empresas dedicadas a la fabricación de artículos naturistas y complementos alimenticios que lanzan al mercado gran número de productos carentes del mínimo estudio de toxicidad.

En México, en los últimos años, el número de pacientes con obesidad se ha incrementado de forma alarmante (31.8% de la población mayor a 15 años, según informes de la OMS, 2009) lo cual entraña un problema de salud, ya que esta condición predispone para padecer diabetes, hipertensión arterial, enfermedades cardiovasculares, entre otras. En general, la obesidad es un trastorno que disminuye la calidad de vida. Este fenómeno ha provocado que las personas se preocupen y comiencen a hacer un uso indiscriminado de los diversos productos “milagro” para adelgazar (compuestos por alcachofa, vinagre de manzana, té rojo, piña, ortosifón, etc.), sin ninguna supervisión médica poniendo en riesgo la salud e incluso la vida.

Una de las plantas mayormente utilizada como adelgazante es la *Thevetia peruviana* mejor conocida como Codo de Fraile; la cual es un arbusto verde de 3- 5 metros de alto, con tronco corto y ramificación irregular; sus hojas son de color verde, membranosas, linear-lanceoladas, agudas, atenuadas en la base, glabras, venación secundaria escasa, a menudo sus bordes son enrollados.

Tiene inflorescencia cimosa, terminal o axilar, flores de color amarillo - anaranjado en forma de embudo. Sus frutos, de un rojo oscuro, al madurar se tornan negros, son globulares y carnosos. En su interior se encuentra una nuez de forma triangular que contiene en su interior de 2 a 4 semillas. Este género de planta se encuentra ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales de nuestro país y es empleada en el tratamiento de afecciones en la piel, se usa para mitigar el dolor de la dentadura, también en el tratamiento de hemorroides, como antiparasitario, abortivo y adelgazante.

Esta planta se puede conseguir en los puestos naturistas ya sea en forma de semilla o como un producto procesado el cual se anuncia y vende libremente sin ningún tipo de restricciones en nuestro país; causando problemas muy serios para la salud de los consumidores ya que, de acuerdo a la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios) en el 2009, sólo en Guadalajara se registraron 16 casos de intoxicación y dos muertes por el consumo de esta planta. Las empresas de los productos “milagro” no especifican la dosis ni advierten sobre los efectos secundarios que se pueden presentar al emplear el producto, y evaden su responsabilidad colocando la siguiente leyenda “El uso de este producto es responsabilidad de quien lo consume”.

Con el objetivo de evaluar el efecto tóxico de la *Thevetia peruviana* se utilizó un modelo en ratón CD1 para comprobar su función como adelgazante y sus efectos tóxicos. De esta forma se generó una intoxicación aguda aplicando, al inicio de la semana una sola dosis de 100 mg del extracto por Kg de peso para sacrificarlos al final de la misma. También se indujo una intoxicación subcrónica con una dosis diaria de 50 mg del extracto por Kg de peso por espacio de un mes, al cabo del cual se sacrificaron los animales respetando la NOM-062-ZOO-1999. Posteriormente se determinaron las enzimas cardíacas (CK, CK MB, LDH) y el índice cardíaco, para ver la posible

presencia de un daño en corazón; las enzimas hepáticas (AST, ALT) y el índice hepático para determinar el daño en hígado. En razón de que un proceso inflamatorio es precursor de un daño en cualquiera de los órganos, se valoró la ceruloplasmina y la proteína C reactiva como indicadores de una inflamación aguda.

Para conocer si se produjo algún daño a las células por la presencia de radicales libres, se evaluaron los niveles de nitritos por el método de Griess y el grado de peroxidación lipídica mediante el método de ácido tiobarbitúrico. Finalmente se realizaron cortes histológicos de corazón para buscar algún tipo de daño que se pudiera presentar.

En este estudio se observó que la dosis terapéutica se encuentra muy cerca de la dosis letal y se conocieron algunos de los efectos secundarios que produce la *Thevetia peruviana*, como: taquicardia, ansiedad, problemas en la marcha (ataxia), dificultad respiratoria, disminución de la actividad física, entre otros, así como el daño que se da en hígado y corazón, manejando dosis fijas (100 mg/ Kg en el ensayo agudo y 50 mg/ Kg en el ensayo subcrónico). Es importante considerar los efectos colaterales que produce el empleo de cualquier producto para adelgazar, ya que estos no especifican la cantidad de *Thevetia peruviana* contenida en ellos. El uso de productos para adelgazar que contienen esta planta causan más efectos adversos para la salud que beneficios.

## 3.0 FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

### 3.1 *Thevetia peruviana*

Desde la antigüedad el hombre ha buscado la forma de encontrar una cura a sus dolencias; esto lo llevó a emplear las diversas plantas que se encontraban a su alrededor, ya sea en cataplasmas o en infusiones, con el tiempo fueron encontrando la utilidad de cada una y sus efectos secundarios.

Poco a poco aplicaron sus conocimientos con sabiduría para el tratamiento de las distintas enfermedades con el fin de obtener una mejor calidad de vida.

En nuestros días, debido a nuestra cultura consumista y vida sedentaria, la obesidad ha llegado a ser un gran problema de salud en nuestro país; este hecho es aprovechado por las empresas que elaboran productos “milagro”, ya que sacan al mercado, sin ningún escrúpulo un sin fin de productos, los cuales son anunciados como seguros y eficaces. Las personas con tal de mejorar su apariencia y verse delgadas emplean dichos productos, sin importar que algunos de éstos causen daño a su salud.

Algunas de las plantas empleadas en estos productos son la alcachofa (*Cynara scolymus*), papaya (*Carica papaya*), encina de mar (*Fucus vesiculosus*), tamarindo malabar (*Garcinia cambogia*), guaraná (*Paullinia cupana*), alfalfa (*Medicago sativa*), piña (*Ananas comosus*), té verde (*Camellia sinensis*), naranjo amargo (*Citrus aurantium*), faselina (*Phaseolus vulgaris*), ortosifón (*Orthosiphon stamineus*), codo de fraile (*Thevetia peruviana*), vellosilla (*Hieracium pilosilla*), glucomanano (*Amorphophallus konjak*), té rojo (*Asphalatus linearis*), etc.

En esta investigación nos enfocaremos sobre la planta llamada *Thevetia peruviana*, la cual es un ingrediente contenido en diversos productos como Capslim<sup>®</sup>, Sin hambre<sup>®</sup>, Redugrass<sup>®</sup>, Total slim<sup>®</sup> y Diet sen<sup>®</sup>, anunciados en televisión como adelgazantes. Vulgarmente es conocida como codo de fraile, adelfa amarilla, yoyote, alcanfora, calaverilla, campanilla, flor de campana, venenillo, yellow oleander, adelfa amarilla, azuceno, laurel amarillo o flor del Perú. Pertenece a la familia *Apocynaceae* y se encuentra ampliamente distribuida en las zonas tropicales y subtropicales.

Se trata de un arbusto siempre verde de 3- 5 metros de alto, con tronco corto y ramificación irregular; sus hojas son de color verde, más oscuras en su cara superior, membranosas, linear-lanceoladas, de 3 a 15 cm de largo por 4 a 11 mm de ancho, agudas, atenuadas en la base, glabras, venación secundaria escasa o inconspícua, pecíolo de 3 a 9 mm de largo, a menudo sus bordes son enrollados, presenta inflorescencia cimosa, terminal o axilar, de 1 a 5 flores de color amarillo anaranjado en forma de embudo y de 4 a 6 cm de longitud, posee frutos rojos oscuros que al madurar se tornan negros. Son globulares y carnosos. En su interior se encuentra una nuez o almendra conocida popularmente en algunas regiones como “codo de fraile”, de forma triangular, que contiene en su interior de 2 a 4 semillas de 2.5 a 4 cm de largo, de 1.2 a 1.5 cm de largo.

Investigaciones serias señalan que todos los componentes de esta planta son en extremo tóxicos, ya que la inhalación, ingestión o contacto de la mucosa con la savia o extractos de dicho espécimen puede causar muchas reacciones adversas, debido a que sus tejidos presentan altas concentraciones de cardenólidos los cuales se presentan en orden de toxicidad: Peruvosido, Rubosido, *Thevetia A*, nerifolina, cerebrina y *Thevetia B*, capaces de producir efectos inotrópicos positivos en el hombre y los animales. Estas sustancias se encuentran distribuidos en toda la planta pero no de manera homogénea: en las semillas, un 4.8%, en las hojas, un 0.070%, en el fruto, un 0.045% y en la savia, un 0.036%. Las semillas también contiene ácido cianhídrico, en pequeñas proporciones.

El mecanismo de acción de los cardenólidos presentes en la planta provoca una inhibición de la bomba Na/K ATPasa cardiaca; algunos de sus efectos secundarios son: irritación de mucosas, eritema bucal, náuseas, vómitos, salivación profusa, dolor abdominal, daño hepático, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, convulsiones ocasionales, midriasis, procesos inflamatorios, neuritis periférica, síntomas cardiovasculares (bloqueo sinusal y aurículo-ventricular), bradicardia, arritmia, cambios electrocardiográficos, alteraciones electrolíticas, coma, etc.

Sin embargo, reiteramos que por desconocimiento, las personas emplean esta planta para:

- Tratamiento de afecciones en la piel (usando el jugo lechoso que se extrae de su tronco).
- Curación de hemorroides (Infusión de sus hojas).
- Tranquilizar el dolor de muelas (masa de *Thevetia peruviana*).
- Adelgazante (polvo de la semilla en agua).
- Antiparasitario
- Abortivo<sup>2,3,4</sup>



Figura 1. Imagen de la Thevetia peruviana donde se muestran: a) flor, b) fruto y c) Semilla.

Debido a que muchos de los daños que se producen en los órganos suelen empezar con un proceso inflamatorio, éste se explica a continuación.

### **3.2 Inflamación Aguda**

La inflamación es 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, quemaduras por agentes físicos o químicos, laceraciones, trauma por radiación, obstrucción vascular, etc.

La inflamación se caracteriza por la presencia de calor, rubor, edema, dolor y 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.

La inflamación es la encargada de focalizar los mecanismos inmunológicos protectores en una región localizada dentro del tejido.<sup>5</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 las 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>6,7</sup>

#### Fase silenciosa

El inicio de la inflamación en su fase aguda se debe a la liberación local de mediadores que aumentan el flujo sanguíneo de los capilares cercanos y producen trasvasación de plasma al tejido, posterior a esto se produce la activación de los sistemas de complemento y coagulación, así mismo, las células inflamatorias circundantes y las endoteliales liberan mediadores solubles de la inflamación y productos biológicamente activos.

## Elementos que interviene en la respuesta inflamatoria

### **Factores plasmáticos**

El complejo proceso inflamatorio es, en primer término, iniciado y propagado por componentes del sistema del complemento, el sistema de coagulación (factores de contacto), las quininas y los componentes del sistema fibrinolítico.

### **Sistema del complemento**

La acción de éste incluye destrucción celular, inflamación y efectos inmunológicos.

La activación del complemento produce péptidos que median la quimiotaxis, la anafilaxia, la vasodilatación y la secreción celular de citocinas. Los componentes C3a y C5a actúan como anafilotoxinas, causando desgranulación de células mastoideas y de basófilos, liberando simultáneamente histamina y otros mediadores. Como resultado del proceso antes mencionado se da la producción de vasodilatación, enrojecimiento, hinchazón y otros efectos que incluyen la contracción del músculo liso y la secreción de mucus por las células de las vías respiratorias.

El componente C5a es un potente estimulante químico para la migración de neutrófilos, monocitos y eosinófilos al área dañada, además, unido a la superficie de los neutrófilos estimula su adherencia, desgranulación y estallido respiratorio. El C5a también induce la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1), incrementando de esta forma la respuesta inflamatoria.

El C3b, cubre a las células blanco (opsonización). Las células fagocíticas poseen receptores específicos para C3b y pueden unirse a las células opsonizadas preparando la ingestión, la fijación del componente C3b a las células blanco también incrementa la lisis por células NK a través de la citotoxicidad medida por células dependientes de anticuerpos.

El resultado de la interacción de estos factores es la habilidad de la activación local del complemento a inducir aumento del flujo sanguíneo al tejido afectado, quimiotactismo, activación de fagocitos neutrófilos y mononucleares, secreción de citocinas, amplificación del efecto del complemento y aumento de las defensas inmunológicas.

### **Sistema de activación por contacto**

Existe una serie de proteínas que se activan por contacto con sustancias naturales, tales como cristales de urato de sodio, cristales de pirofosfato de calcio, sulfato de colesterol y homocisteína. Estas proteínas conforman lo que se conoce como "sistema de contacto"; y se encuentra a su vez conformado por el factor XII (factor Hageman), la pre-caliceína, el factor XI (antecedente plasmático de tromboplastina) y un cininógeno de alto peso molecular.

- **Factor XII:** es el responsable de la activación no inmunológica de la vía clásica del complemento, estimula la agregación y desgranulación de los neutrófilos.

- **Calicreína activada:** es un agente quimiotáctico para los neutrófilos.
- **Cininógeno de alto peso molecular:** se une a los neutrófilos de manera específica, reversible y saturable, lo que contribuye a la estimulación óptima de los neutrófilos por la calicreína.

**Bradiquinina:** la bradiquinina es generada por el clivaje del quinínogeno de alto peso molecular por acción de la calicreína, tiene la capacidad de liberar citocinas tales como IL-1 y TNF; promueve todas las señales de transducción a nivel celular:

- a) Movilización de calcio
- b) Transporte de cloruros
- c) Activación de la fosfolipasa específica para fosfatidilinositol
- d) Síntesis de óxido nítrico
- e) Estimulación de la fosfolipasa A2, la cual forma prostanglandinas y leucotrienos
- f) Estimulación de la adenilciclasa.

**Sistema fibrinolítico:** este sistema regula la deposición de fibrina en los vasos sanguíneos y en el tejido, la fibrinólisis es activada por un mecanismo dependiente de los neutrófilos, los cuales liberan proteasas luego de la migración al sitio de la inflamación, degradan el fibrinógeno, causa la retracción de las células endoteliales, permitiendo la migración de los neutrófilos hacia el espacio del tejido intersticial y la exudación de constituyentes del plasma.

**Mediadores lipídicos:** el rubor, dolor, edema y calor son producidos por mediadores lipídicos, como los eicosanoides y el factor activador de plaquetas (PAF), los cuales son sintetizados a partir de los fosfolípidos de las membranas de las células inflamatorias; los eicosanoides son productos oxigenados de 20 átomos de carbono que derivan, en su mayoría, del ácido araquidónico, y es generado por tres clases de enzimas intracelulares: la ciclo-oxigenasa (COX) que produce prostanglandinas y tromboxano; la lipo-oxigenasa que produce leucotrienos, lipoxinas e hidroxiácidos y la epoxigenasa, que genera epoxiácidos.

**Prostaglandinas y tromboxanos:** La vía para producción de las prostaglandinas y el tromboxano se inicia cuando la enzima ciclo-oxigenasa convierte el ácido araquidónico en endoperóxido cíclico (PGG<sub>2</sub>) por introducción de oxígeno molecular. Las prostaglandinas interactúan como receptores de superficie en los linfocitos, las PGE<sub>2</sub>, PGA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y PGI<sub>2</sub>, incrementan los niveles intracelulares de AMP cíclico (el aumento de AMP cíclico en los linfocitos está asociado a la inhibición de mitogénesis, a la reducción de la formación de linfoquinas y a la inhibición de citólisis), también pueden influir en el comportamiento celular a través de cambios de la función de la membrana; a causa de alteraciones en lípidos, proteínas, composición de glicoproteínas y por la alteración de captación de nutrientes esenciales y calcio, provocan la vasodilatación, la permeabilidad vascular y son quimioatrayentes de neutrófilos. El efecto de estos compuestos es antagonizado por el tromboxano A<sub>2</sub>.

**Los leucotrienos:** éstos son producidos por la acción de la enzima lipooxigenasa, los leucotrienos B<sub>4</sub>, C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> y E<sub>4</sub> actúan como potentes agentes estimulantes de la contracción de la

musculatura lisa y de los vasos sanguíneos; son los principales constituyentes de la sustancia de liberación lenta de la anafilaxia.

El leucotrieno B<sub>4</sub> es un potente activador de la función y comportamiento del leucocito, produce la agregación y estimulación de la función leucocitaria; es así mismo un factor quimiotáctico muy potente; trabajando conjuntamente con las prostaglandinas y el C5a, produce permeabilidad vascular y la infiltración celular, aumenta la expresión de receptores de superficie, potencia la expresión de los receptores C3b en eosinófilos y los niveles de GMP cíclico intracelular; como parte del mecanismo activador de leucocitos, incluye la estimulación en la captación de Ca<sup>2+</sup> extracelular y D-Fructosa.<sup>5</sup>

**Factor activador de plaquetas (PAF):** Es un potente activador de los neutrófilos, debido a que estimula la adhesión, la liberación de enzimas lisosomales, la generación de especies reactivas de oxígeno, además produce marginación de los neutrófilos en la pared del endotelio vascular y promueve la migración al espacio extravascular e incita la activación y agregación plaquetaria; además de actuar como regulador del funcionamiento de los linfocitos es el quimioatrayente más potente de eosinófilos.<sup>8</sup>

**Óxido nítrico (NO):** el efecto fisiológico más importante del NO es su comportamiento como vasodilatador.

**Histamina:** ésta se encuentra en forma de gránulos en las células mastoideas y en los basófilos, es una amina natural producida por descarboxilación de la histidina. Incrementa el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y produce edema. Puede ejercer quimiotactismo específico para eosinófilos. Su acción principal se da al inicio del daño.

**Citoquinas:** son señales intercelulares no específicas, por las cuales, se coordinan la respuestas inmunes e inflamatorias; las citoquinas que intervienen en el proceso inflamatorio son: factor de necrosis tumoral (TNF), interleucina- 1(IL-1), interleucina- 6 (IL-6), estos no presentan especificidad por los antígenos y operan en muy bajas concentraciones.

- **Interleucina- 1:** es producida por monocitos, neutrófilos, células epiteliales y queratocitos. Promueve la unión de los neutrófilos sanguíneos a las células endoteliales de la pared de los vasos sanguíneos, seguida de infiltración y edema; en la médula tiene efecto inductor de factores estimulantes del crecimiento de colonias (CSF) y diferenciación.
- **Factor de necrosis tumoral (TNF):** es producido por macrófagos activados. El TNF tiene un efecto citotóxico sobre ciertas células tumorales y se considera uno de los más importantes mediadores de la inflamación, induce la fiebre, promueve la respuesta de los hepatocitos produciendo diversos reactantes de la fase aguda. Los neutrófilos responden al TNF incrementando su capacidad de unión a las células del endotelio produciendo estallido respiratorio y desgranulación. En las células endoteliales vascular hay producción de procoagulantes, supresión de la actividad anticoagulante y bloquea el aporte de sangre.

- **Interleucina- 6:** produce efectos parecidos a la IL-1 y TNF.<sup>5</sup>

#### Fase vascular

##### **Dilatación y permeabilidad**

La respuesta al trauma generalmente comienza con la dilatación de los vasos sanguíneos de calibre pequeño localizados en y alrededor del sitio afectado como resultado de la relajación del músculo liso de la pared vascular, dicha vasodilatación tiene como consecuencia el incremento del flujo sanguíneo en la región afectada, lo cual produce eritema y calor; conforme se produce la vasodilatación, las células limitantes se retraen activamente alejándose una de otra para así crear hendiduras microscópicas en la membrana basal endotelial, lo cual aumenta la permeabilidad de la pared venular trayendo beneficios como:

El incremento de suministro sanguíneo local mejora la entrega de oxígeno, plaquetas y factores de coagulación en el sitio afectado, lo cual a su vez ayuda a estabilizar los tejidos dañados y facilita la cicatrización y reparación de la herida; así como aumenta la posibilidad de colisiones entre leucocitos sanguíneos y el endotelio vascular.<sup>9</sup> El líquido vascular puede inmediatamente diluir o disolver sustancias peligrosas en los tejidos y transporta en él muchas proteínas antimicrobianas desde el suero, contribuyendo a la llegada rápida de factores defensivos inespecíficos, innatos, al sitio donde se requieren.

#### Fase celular

El plasma contiene factores que potencializan la función de las células inflamatorias.

La migración de los leucocitos a los tejidos involucra una secuencia coordinada de fenómenos que se puede dividir en cuatro etapas:

1. En esta fase se generan gran cantidad de mediadores y la activación del endotelio, en el cual las células limitantes de las vénulas postcapilares expresan altas concentraciones de ciertas moléculas de adhesión de superficie en caso de lesión tisular, cuando tales células se exponen a mediadores inflamatorios particulares como histamina, lipopolisacáridos (LPS), productos intermedios de las cascadas de coagulación o del complemento, y citocinas como IL-1 o TNF.

Entre las moléculas que se expresan en el endotelio activado se encuentran la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM- 1), la molécula de adhesión intercelular 2 (ICAM2), la molécula de adhesión de células vasculares 1 (VCAM- 1), que son de tipo Ig y la selectina E, inducidas por IL-1 y TNF; y la selectina P, inducida por la histamina y el factor activador de plaqueta (PAF).

Las selectinas E y P interactúan con los oligosacáridos sialilados de los leucocitos del torrente circulatorio causando el “rodamiento” leucocitario a lo largo del endotelio.

2. En esta etapa se lleva a cabo la “activación” de los leucocitos rodantes debido a la acción de quimioatrayentes que provocan un aumento de la afinidad de la unión de las integrinas de los leucocitos a sus ligandos endoteliales, llevando a una adhesión firme. Las alfa quimiocinas y la IL-8 actúan sobre los neutrófilos, las beta quimiocinas sobre los monocitos y los eosinófilos. El TNF, el factor estimulante de crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la IL-3 y IL-5 incrementan la adhesividad de las integrinas leucocitarias.
3. Durante esta etapa se realiza la “adhesión firme”, resultante de la unión de las integrinas de los leucocitos a los ligandos endoteliales tipo Ig. Esta unión y la regulación de la expresión de los ligandos por las citocinas contribuyen a la selectividad de adhesión de los distintos subtipos de leucocitos, mediando así un reclutamiento selectivo de leucocitos al sitio de la inflamación.
4. En esta última fase se lleva a cabo la “migración trans-endotelial”, aquí los leucocitos se arrastran sobre la superficie del endotelio a la unión intercelular y se desliza entre las células endoteliales al tejido extravascular, este proceso se realiza mediante dos mecanismos diferentes; el quimiotaxismo y haptotaxismo. En el primero los leucocitos adherentes se mueven en el sentido de la concentración de un quimioattractante, para el caso de haptotaxismo los leucocitos migran a lo largo de un gradiente de los ligandos de adhesividad de las células endoteliales a la región de máxima densidad de ligandos, como a las moléculas de adhesión de leucocitos y plaquetas (PECAM-1).

El proceso planteado es de suma importancia, ya que lleva a las células fagocíticas al lugar donde se encuentra el agente patógeno causante el daño.

Aquí el neutrófilo o macrófago se adhiere al microorganismo a través del reconocimiento de patrones moleculares expresados sobre la superficie de los patógenos (PAMP), posteriormente inicia la fase de ingestión al activar un sistema contráctil de actina–miosina que extiende pseudópodos alrededor de la partícula, a medida que a la superficie del microorganismo se adosan en secuencia receptores adyacentes, la membrana plasmática es traccionada alrededor de la partícula, hasta incluirla por completo en una vacuola (fagosoma). A continuación los gránulos citoplasmáticos se fusionan con el fagosoma (fagolisosoma) y se liberan sus contenidos alrededor del microorganismo capturado, donde es destruido.<sup>5,8</sup>

En los lisosomas hay numerosos mecanismos microbicidas; el pH del fagolisosoma puede ser tan bajo como 4.0 debido a la acumulación de ácido láctico, lo que previene el crecimiento de la mayoría de los patógenos, el microambiente ácido optimiza la actividad de numerosas enzimas microbicidas presentes en los lisosomas entre las que se incluyen numerosas hidrolasa ácidas (proteasas, nucleasas, glucosidasas, lipasas). También contiene proteínas catiónicas que dañan la permeabilidad de las membranas bacterianas por interacción con sus superficies cargadas negativamente, o la lactoferrina, potente quelante de hierro, factor de crecimiento imprescindible para muchos microorganismos.

Tras la uniones de los receptores endocíticos se incrementa la captación de oxígeno por los macrófagos y neutrófilos, que es utilizado para generar productos intermedios reactivos de oxígeno, los cuales son agentes oxidantes muy reactivos capaces de destruir a los microorganismos, ésto se conoce como estallido respiratorio, el cual comienza con la activación de un complejo enzimático localizado en la membrana del fagocito y del fagolisosoma llamado NADPH oxidasa que reduce el oxígeno molecular a superóxido ( $O_2^-$ ) y éste puede reducirse a radicales hidroxilo ( $OH^-$ ) o dismutarse a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) por la acción de la enzima superóxido dismutasa. El  $OH^-$  y  $H_2O_2$  son potentes agentes oxidantes con gran capacidad microbicida, además los neutrófilos poseen una enzima llamada mieloperoxidasa que utiliza el peróxido de hidrógeno generado en el estallido respiratorio junto con iones cloruro para producir hipoclorito; los macrófagos también cuentan con un segundo sistema de generación de radicales libres, la sintetasa del óxido nítrico inducible (iNOS), la cual se induce durante la fagocitosis y cataliza la generación de óxido nítrico (NO).

También actúan las defensinas, éstas son péptidos antimicrobianos y citotóxicos. Cada péptido, incluye 6 cisteínas constantes, formando una molécula circular que se estabiliza mediante enlaces disulfuro intramoleculares. Se ha demostrado que estos péptidos defensinas circulares forman canales permeables iónicos en membranas de la célula bacteriana. La lisozima que daña las células bacterianas cataliza la hidrólisis de las uniones beta 1,4 entre los residuos de ácido N-acetilmurámico y N-acetil-D-glucosamina en un peptidoglicano.<sup>10,11</sup>

#### Fase de regulación

Existen varios mecanismos regulatorios de la inflamación, algunos de estos son:

- **PGE2:** inhibidor potente de la proliferación de linfocitos y de la producción de citocinas por células T y macrófagos.
- **Histamina:** Actúa sobre receptores H<sub>2</sub>, induce en los mastocitos y basófilos una inhibición en la liberación de mediadores, inhibe la actividad del neutrófilo, inhibe la quimiotaxis y activa las células T supresoras.
- **Factor de crecimiento en transformación (TGFβ):** desactiva los macrófagos mediante la inhibición de la producción del intermediario reactivo del oxígeno, disminuye el efecto citotóxico de macrófago y células NK activadas.
- **Glucocorticoides endógenos:** ejercen efecto antiinflamatorio mediante la represión de varios genes, que incluyen a aquellos para las citocinas proinflamatorias y las moléculas de adhesión.
- **Heparina:** Inhibe la coagulación y la activación de los factores del complemento.
- **Eosinófilo:** Esta célula, atraída por el ECF-A, acude al foco inflamatorio donde libera una serie de enzimas que degradan determinados mediadores potenciadores de la

inflamación. La histaminasa actúa sobre la histamina, la arilsulfatasa sobre los leucotrienos y la fosfolipasa sobre el PAF

- **Interleucina 10 (IL- 10):** inhibe la presentación del antígeno, la producción de citocinas y la destrucción con NO por los macrófagos.<sup>5,7</sup>

#### Fase de recuperación

El resultado óptimo de una reacción inflamatoria aguda es la restitución completa de la estructura y función normal del tejido lesionado. Esto requiere:

- a) la remoción del exudado inflamatorio, fibrina y desechos celulares;
- b) inversión de los cambios en la microvasculatura;
- c) el remplazo de todas las células especializadas perdidas a causa de la lesión.

Este proceso sólo se cumple si el agente agresor es eliminado completamente y la necrosis de las células especializadas es mínima.

Cuando se ha eliminado el agente patógeno disminuyen tanto la liberación de mediadores, el estímulo para la vasodilatación y el reclutamiento celular, habiendo también una disminución de la permeabilidad vascular. Al disminuir la vasodilatación las fuerzas hidrostáticas y osmóticas regresan a su estado normal; el líquido del exudado y las proteínas son eliminados a través del drenaje linfático.

Los neutrófilos infiltrados mueren en el lugar, las células de tejido muerto son digeridas parcialmente por sus propias enzimas lisosomales así como por las liberadas por los neutrófilos y macrófagos. Se lleva a cabo un remplazo de neutrófilos por monocitos y macrófagos, los cuales se encargaran de identificar y degradar gran parte de los desechos celulares y tejidos destruidos en las lesiones inflamatorias.

La fibrina depositada en los espacios extravasculares es metabolizada por las enzimas fibrinolíticas del exudado y los productos de degradación son eliminados por el sistema linfático.<sup>12</sup>

### **3.3 Inflamación crónica**

Cuando un agente inflamatorio persiste, ya sea por su resistencia 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.<sup>8</sup>

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 que afectan a las células parenquimales y a la función de las células inflamatorias.

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>5</sup>

### **3.4 Sistema cardiovascular**

Está conformado por:

- Arterias: transportan la sangre desde el corazón a los tejidos del organismo.
- Capilares: ahí se produce la difusión de los nutrientes y los productos de desecho.
- Venas: devuelven la sangre desde los tejidos al corazón
- Vasos linfáticos: regresan a la sangre cualquier exceso de agua y nutrientes que se hayan difundido fuera de los capilares.

Las principales funciones del sistema cardiovascular son:

- Distribución de O<sub>2</sub> y nutrientes.
- Transporte de CO<sub>2</sub> y de los productos metabólicos de desecho desde los tejidos a los pulmones y a los órganos excretores.
- Distribución del agua, electrolitos y hormonas por todo el organismo.
- Contribución a la infraestructura del sistema inmunitario.
- Termorregulación.<sup>13</sup>

#### El corazón

El corazón es un músculo hueco, cónico, con la base en la parte alta y el ápex en la parte baja, dirigido hacia la izquierda. Se encuentra situado en el mediastino anterior y está formado por dos bombas musculares (ventrículos).

El ventrículo derecho es la bomba de la circulación pulmonar; la sangre es bombeada a los pulmones, donde toma oxígeno y se desprende el dióxido de carbono y luego vuelve a la aurícula; el ventrículo izquierdo es la bomba de la circulación sistémica, la sangre es bombeada desde ahí al resto del organismo. En los tejidos del cuerpo se intercambian nutrientes y productos de desecho, la sangre (que ahora transporta menos oxígeno y más dióxido de carbono) vuelve a la aurícula derecha y de ahí al ventrículo derecho. Las dos circulaciones actúan simultáneamente.

Las aurículas izquierda y derecha se comunican con los ventrículos a través de las válvulas auriculoventriculares mitral y tricúspide, respectivamente, estos se encuentran separados por una banda de tejido conjuntivo fibroso, que proporciona un esqueleto para la fijación del músculo y la inserción de las válvulas.<sup>14</sup>

El corazón se conforma por tres capas:

1. Pericardio: es el saco o cubierta exterior del corazón que protege, aísla y mantiene las condiciones óptimas para que el corazón pueda moverse libremente durante las contracciones, consta de dos hojas: una visceral que constituye toda la superficie externa del corazón y sirve de protección contra el roce; y otra parietal, es la más extensa de las dos y posee mayor resistencia, se adhiere firmemente al centro tendinoso del diafragma y a otras estructuras cercanas. Entre las dos hojas hay un espacio (cavidad pericárdica) que contiene líquido citrino, el cual tiene como principal función lubricar.
2. Miocardio: constituye la capa más gruesa del corazón; el espesor y diámetro de las células son máximos en el ventrículo izquierdo y menos en el derecho, está constituido en su mayoría por células contráctiles llamadas miocitos, las cuales tienen un núcleo central y son más cortas que las fibras musculares esqueléticas, forman largas cadenas; no pueden regenerarse; tienen un diámetro de 15 a 20 micras y alrededor de 100 micras de longitud.
3. Endocardio: es a capa interna del corazón, se encuentra constituido por una capa de células endoteliales con una porción subendotelial de fibras elásticas, nervios, vasos sanguíneos y colágena. El endocardio de las aurículas es más grueso que el de los ventrículos y frecuentemente contiene músculo liso.<sup>13,14,15,16</sup>

El daño de la célula miocárdica se mide con marcadores ampliamente conocidos como la creatinina total (CK total), lactato deshidrogenasa (LDH) y la transaminasa glutámico-oxalacético (GOT); y los indicadores más específicos de lesión miocítica son medidos con la fracción MB de la creatinina (CK-MB), la mioglobina y las troponinas cardíacas.

#### Microinfarto

Es un daño producido por la oclusión del flujo de la microvasculatura que causa la necrosis de una pequeña zona, en él se muestran niveles elevados de troponina, pero cuyas enzimas tradicionales son normales.<sup>17,18</sup>

### **3.5 El hígado**

Es una glándula que se encuentra en el hipocondrio derecho; es el órgano más voluminoso del organismo (en el adulto llega a pesar hasta 1500 g).

Está formado por cuatro lóbulos: los dos principales son el derecho y el izquierdo en la cara superior, en la inferior están dos lóbulos pequeños llamados lóbulo cuadrado y lóbulo caudado (de Spiegel).

Se encuentra cubierto por el peritoneo y además presenta una envoltura independiente del recubrimiento peritoneal: la cápsula de Glisson que penetra con los vasos sanguíneos y le da sostén a las células hepáticas. Junto con este árbol conjuntivo corren ramas de la vena porta, la

arteria hepática, así como los conductos linfáticos y los conductos biliares; estos cuatro elementos constituyen el espacio llamado porta.

Microscópicamente el hígado está conformado por lobulillos que constan de varios espacios porta (usualmente cinco o seis) unidos por tejido conjuntivo y cuyos vasos sanguíneos drenan hacia la vena que se encuentra en el centro de dicho lobulillo; las células hepáticas o hepatocitos forman cordones que corren del tejido conjuntivo de los espacios porta a la vena central o centrolobulillar. Los vasos sanguíneos que se forman entre el espacio porta y la vena centrolobulillar son capilares modificados y se hallan revestidos por células epiteliales y por células reticuloendoteliales con capacidad fagocítica (células de Kupffer). Las venas centrolobulillares finalmente drenan en la cara inferior.

Sus funciones caen en alguna de las siguientes categorías:

- Almacenamiento: de grasas, vitaminas como la A y B12, minerales como el fierro y carbohidratos en forma de glucógeno; cuando estas sustancias se encuentran en exceso, el hígado, es capaz de almacenarlas y regresarlas a la circulación cuando disminuyen o son requeridas por otro tejido.
- Transformaciones y conjugaciones: las sustancias que deben llegar a nuestras células deben a su vez ser las más adecuadas para su buen funcionamiento, así pues el hígado es el responsable de eliminar o transformar dichas sustancias manteniendo una composición adecuada en sangre, por ejemplo metaboliza el amoniaco en urea, degrada y excreta algunas hormonas, así como numerosos fármacos y drogas, por medio de la bilis, transforma los quilomicrones en los distintos componentes de las grasas, realiza la gluconeogénesis (formación de glucosa a partir de ciertos aminoácidos, lactato y glicerol), la glucogenólisis (fragmentación de glucógeno para liberar glucosa en la sangre) y la glucogenogénesis (es la síntesis de glucógeno a partir de glucosa)
- Síntesis: se encarga de la síntesis de factores de coagulación como el fibrinógeno (I), la protrombina (II), la globulina aceleradora (V), proconvertina (VII), el factor antihemofílico B (IX) y el factor Stuart-Prower (X), participa en la síntesis de proteínas.<sup>19</sup>

El hígado está especialmente expuesto a toxicidad por razón de su función en la biotransformación, metabolismo y eliminación de agentes potencialmente tóxicos. Ciertos productos medicinales, al tomarse en dosis elevadas o por una larga extensión de tiempo causan daños celulares. La hepatotoxicidad puede ser causada por elementos naturales, remedios caseros o industriales, entre otros.

Este daño puede ser medido por marcadores como la aspartato aminotransferasa (AST), alaninoaminotransferasa (ALT), que son indicadores de daño celular hepático; la gammaglutamiltranspeptidasa (GGT) y fosfatasa alcalina las cuales indican obstrucción del sistema biliar, ya sea en el hígado o en los canales mayores de la bilis que se encuentran fuera de este

órgano, y finalmente la bilirrubina total, directa e indirecta porque refleja la habilidad del hígado de recoger, procesar y segregar la bilirrubina a la bilis.

### 3.6 Fundamento de las técnicas empleadas para determinar el grado de afección causada por procesos inflamatorios

#### 3.6.1 Ceruloplasmina

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.<sup>20</sup>

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  $\alpha_2$ - 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 ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ).

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

<i>Niveles por debajo de normal</i>	<i>Niveles arriba de lo normal</i>
Síndrome de Menkes Enfermedad de almacenamiento de cobre de Wilson Hemocromatosis hereditaria Desnutrición Nefrosis Síndrome de mala absorción Enteropatía exudativa	Embarazo Linfoma Infecciones agudas y crónicas Artritis reumatoide. Enfermedades hepáticas y pelagra

Cuadro 1. Padecimientos que muestran los niveles de ceruloplasmina , ya sea, elevados o disminuidos.<sup>21,22</sup>

Esta proteína se determina por la técnica de inmunodifusión radial.

### **3.6.2 Inmunodifusión radial o técnica de Mancini.**

Este método se basa en mezclar los anticuerpos en una solución de agarosa mantenida entre 40 y 45° C, al enfriarse, la agarosa gelifica, constituyendo el soporte semisólido donde los anticuerpos interaccionarán con los antígenos homólogos. Los antígenos solubles colocados en las perforaciones practicadas en el gel se difunden radialmente, al tiempo que interaccionan con los anticuerpos incluidos en el mismo, originando, al alcanzarse, las concentraciones de equivalencia, la formación de halos o anillos definidos de precipitación.

Manteniendo constante la cantidad de anticuerpo, el diámetro de los halos de precipitación será proporcional a la concentración del antígeno; de esta manera, al incluir cantidades conocidas del antígeno (para construir una curva de calibración), la técnica se torna cuantitativa.<sup>23</sup> Entre más grande sea el diámetro del halo de precipitación, mayor será la concentración de ceruloplasmina presente en la muestra de suero.

### **3.6.3 Reacción antígeno- anticuerpo**

Una reacción antígeno-anticuerpo es la interacción del antígeno con su respectivo anticuerpo, este acoplamiento estructural se da por varias fuerzas débiles que disminuyen con la distancia, podemos citar como ejemplo los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van der Waals, las interacciones electrostáticas débiles y las hidrofóbicas.

Esta unión depende de la complementariedad entre ambas moléculas por lo que se efectúa a través de múltiples enlaces no covalentes entre una parte del antígeno y los aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo. La reacción se caracteriza por ser específica, rápida, reversible y espontánea.

### **3.6.4 Reacción de precipitación**

La reacción de precipitación ocurre cuando se combina un anticuerpo, por lo menos divalente, con un antígeno soluble y esto conlleva a la formación de agregados que precipitan, para que tal precipitación ocurra en forma máxima se necesita que tanto el antígeno como el anticuerpo se hallen en concentraciones óptimas, cuando cualquiera de los reaccionantes se encuentran en exceso no se pueden formar grandes agregados antígeno-anticuerpo; en este caso el antígeno se encuentra disuelto, y al unirse a los anticuerpos se forman unos macrocomplejos moleculares, semejantes a una red tridimensional, que debido a su tamaño, precipita. Esta etapa se acelera con el aumento de la temperatura y además es dependiente de la concentración de electrolitos.<sup>24</sup>

### **3.6.5 Proteína C reactiva**

La proteína C reactiva (PCR) fue descubierta por Tillet y Francis en 1930, fue la primera proteína de fase aguda descrita y el nombre deriva de su capacidad para precipitar al polisacárido somático C del *Streptococcus pneumoniae*, dicha proteína está formada por cinco polipéptidos idénticos que se mantienen unidos entre sí por medio de interacciones no covalentes, y dispuestos como un pentámero cíclico alrededor de una cavidad fijadora de calcio, tiene la capacidad de

fijación dependiente de calcio a los grupos fósforilcolina de numerosos microorganismos que lo contienen en sus membranas; esta proteína imita la acción de los anticuerpos uniéndose a los microorganismos y provocando la activación de la vía clásica del complemento (induce el depósito de C3b sobre la superficie del microorganismo, contribuyendo así a la opsonización de éstos); la PCR incrementa su expresión más de cien veces a las pocas horas de desencadenarse una respuesta inflamatoria.<sup>8,18</sup>

El TNF, el IL- 1 y el IL- 6 participan en el aumento de la síntesis y secreción de la PCR por los hepatocitos.

La síntesis *de novo* de la PCR principia a las 6 horas después de iniciado el estímulo inflamatorio y alcanza su máximo a las 24-72 horas. Su vida media es relativamente corta (19 horas), pero su concentración plasmática es constante bajo cualquier condición y no se modifica con la ingestión de alimentos. Un dato importante es que los valores elevados de PCR se asocian de forma directa con el grado de necrosis miocárdica.<sup>17</sup>

La determinación de la proteína C reactiva se realiza a través de una reacción de aglutinación, la cual se explica enseguida.

### **3.6.6 Reacción de aglutinación**

La interacción entre el anticuerpo y un antígeno particulado resulta en un agrupamiento visible llamado aglutinación, los anticuerpos que producen estas reacciones se denominan aglutininas, éstas dependen del enlace cruzado de antígenos polivalentes.

Cuando la partícula aglutinada es el antígeno mismo se habla de una reacción de aglutinación directa o activa; si el antígeno es soluble y se absorbe física o químicamente sobre una partícula, entonces se habla de una reacción de aglutinación indirecta o pasiva; en el caso de que los antígenos particulados sean eritrocitos, la reacción se describe como hemaglutinación; y se denomina hemaglutinación pasiva cuando los eritrocitos se utilizan sólo como soporte de antígenos solubles.<sup>23</sup>

### **3.6.7 *Streptococcus pneumoniae***

Los neumococos (*S. pneumoniae*) son diplococos grampositivos, lanceolados o dispuestos en cadenas y con una cápsula de polisacárido que permite tipificarlos con antiseros específicos; los neumococos son habitantes normales de las vías respiratorias superiores en un porcentaje del 5 al 40% de los humanos y puede causar neumonía, sinusitis, otitis, bronquitis, bacteriemia, meningitis y otros procesos infecciosos.

Cultivos: los neumococos forman una pequeña colonia redonda, al principio en forma de domo y después desarrollan una placa central con un reborde elevado, son  $\alpha$ -hemolíticos sobre agar sangre, su crecimiento aumenta con 5 a 10% de CO<sub>2</sub>.

### Características

Fermenta la glucosa; esto se acompaña de producción rápida de ácido láctico que limita el crecimiento; con la neutralización a intervalos del caldo de cultivo con álcali se logra un crecimiento masivo. Los neumococos aislados que generan gran cantidad de cápsulas producen colonias mucoides; con la edad, los microorganismos tienden a manifestar lisis espontánea, la de los neumococos ocurre en algunos minutos cuando se añade bilis de buey (10%) o desoxicolato sódico (2%) a un caldo de cultivo o suspensión de microorganismos con pH neutro; sobre un medio sólido, el crecimiento de los neumococos se inhibe alrededor de un disco de optoquina.

Reacción Quellung: consiste en la mezcla del neumococo de un cierto tipo con suero antipolisacárido específico del mismo tipo, o con antisuero polivalente sobre un portaobjetos de microscopio, la cápsula se hincha notablemente, esta reacción es útil para su identificación.

### Estructura antigénica

- Antígenos de la pared celular específico de grupo: este carbohidrato se encuentra en la pared celular y constituye la base de los grupos serológicos (grupos de Lancefield A- U, K U), la especificidad serológica de los carbohidratos específicos de grupo se determinan mediante un aminoazúcar.

Para los estreptococos del grupo A, este azúcar es la ramnosa- N- acetilglucosamina, para el grupo B, el polisacárido de ramnosa glucosamina, para el grupo C, la ramnosa- N- acetilgalactosamina; para el grupo D, el ácido glicerol teicoico que contiene D- alanina y glucosa; para el grupo F, la glucopiranosil- N- acetilgalactosamina.

- Proteína M: tiene la apariencia de prolongaciones semejante a pelos de la pared celular, cuando la proteína M está presente los estreptococos son virulentos, y en ausencia de anticuerpos específicos tipo M pueden resistir la fagocitosis efectuada por los leucocitos polimorfonucleares.
- Sustancia: esta sustancia es ácido lábil y termolábil, permite diferenciar ciertos tipos de estreptococos por aglutinación con antisueros específicos, en tanto que otros tipos comparten la misma sustancia.
- Neumolisinas: estimulan citocinas y destruyen los cilios de las células epiteliales respiratorias humanas en cultivo.
- Neuraminidasa: segmenta el ácido siálico que se encuentra en mucina, glucolípidos y glucoproteínas del huésped. Tiene efecto directo sobre los fagocitos y suprime las funciones inflamatorias e inmunológicas del huésped.
- El polisacárido C es un ácido teicoico que forma parte de la pared celular, representa una porción del antígeno de Forsman o F, inhibidor específico de la autolisina homóloga, dicho

ácido teicoico es rico en colina que puede reaccionar con una proteína sérica, conocida como proteína C reactiva.

- La pared celular de *S. pneumoniae* tiene la estructura general de las cocáceas Gram. positivas, con una capa importante de peptidoglicano constituida por subunidades alternadas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil murámico enlazadas por puentes peptídicos, un componente importante de esta pared lo constituye el ácido teicoico, rico en galactosamina, fosfato y en colina; esta última sustancia es exclusiva de esta bacteria y cumple una función reguladora importante en la hidrólisis de la pared. El ácido teicoico se dispone de dos formas en la pared celular, una expuesta en la superficie celular, (conocido como sustancia C) y otra forma unida de manera covalente a los lípidos de la membrana citoplasmática
- El polisacárido capsular es inmunitariamente distinto para cada uno de los más de 83 tipos, es un antígeno que induce principalmente una respuesta de células B.
- La cápsula polisacárida es el factor que determina la virulencia, tal polisacárido interfiere con el depósito eficaz del complemento sobre la superficie del microorganismo, y de esta manera, con el reconocimiento y la ingestión por el fagocito.

Esta propiedad resulta particularmente importante en ausencia de anticuerpos específicos, en los casos en que la vía alterna es el medio primario para la opsonización mediada por C3b, el efecto neto consiste en que los fragmentos del complemento reconocidos por los receptores del fagocito no están disponibles sobre la superficie del microorganismo; cuando el anticuerpo se fija al polisacárido capsular, lo hace también el C3b generado por la vía clásica y sobreviene la opsonofagocitosis.

- Proteína A: interfiere en el depósito del complemento.
- Los peptidoglicanos y el ácido lipoteicoico de la pared celular estimulan la inflamación.

### Tipos

En los adultos los tipos 1 a 8 causan casi el 75% de los casos de neumonía neumocócica y más de la mitad de todas las muertes por bacteriemia neumocócica; en los niños, los tipos 6, 14, 19 y 23 son la causa más frecuente.

### Producción de la enfermedad

Los neumococos producen enfermedad por su capacidad para multiplicarse en los tejidos y como no generan toxinas significativas, la virulencia del microorganismo está en función de su capsula, que evita o retarda la ingestión por los fagocitos.

## Patología

Las infecciones neumocócicas causan exudación de líquido fibrinoso edematoso a los alveolos, seguido por eritrocitos y leucocitos que producen consolidación de partes del pulmón. En este exudado se encuentra gran cantidad de neumococos que pueden alcanzar el torrente sanguíneo por la vía del drenaje linfático de los pulmones; las paredes alveolares normalmente permanecen intactas durante la infección, después, las células mononucleares fagocitan activamente los residuos y gradualmente se reabsorbe esta fase líquida; los fagocitos captan y digieren en su interior los neumococos.

El neumococo fue empleado debido a que presenta el llamado polisacárido C (ramnosa- N-acetil galactosamina), que produce una precipitación de la proteína C reactiva, lo que nos ayuda a determinarla.<sup>25,26</sup> Para que esto sea posible, se debe realizar primeramente una cuantificación del polisacárido C que hemos obtenido, esto se realiza por medio del método ácido sulfúrico y fenol, que se explica enseguida.

### **3.6.8 Método de ácido sulfúrico y fenol**

Las bacterias poseen gran número de carbohidratos diferentes: azúcares libres, derivados de azúcares, polisacáridos simples (polímeros de azúcares) y polisacáridos complejos (polímeros de azúcares diferentes, aminoazúcares, ácidos urónicos, etc.). Algunas macromoléculas contienen además componentes no glucídicos (lipopolisacáridos, peptidoglucanos, ácidos teicoicos, ácidos nucleicos, glucoproteínas, etc).

Ningún método permite la determinación de todos los azúcares presentes en bacterias ya que diferentes glúcidos generan diferente intensidad de color a una cierta longitud de onda, sin embargo, los métodos de antrona, de ácido sulfúrico y fenol son los más utilizados por su simplicidad, rapidez y baja interferencia con otros componentes celulares, estas características los hacen elegibles para la determinación de un índice confiable de "carbohidratos totales", la cual se basa en la reacción colorida producida por la condensación de los productos de degradación de los azúcares (despolimerización, ciclación y deshidratación), obtenidas por el tratamiento de ácidos minerales fuertes (HCL, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) con diversos reactivos orgánicos.<sup>27</sup>

### **3.6.9 El oxido nítrico (NO)**

El NO 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.

En las células humana 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.

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>28,29,30</sup>

### **3.6.10 Peroxidación lipídica**

El proceso de peroxidación lipídica (MDA) comienza cuando un radical libre quita un átomo de hidrógeno de uno de los carbonos metileno de la cadena hidrocarbonada para originar un radical libre lipídico. Los ácidos grasos poliinsaturados son especialmente susceptibles al ataque de los radicales libres, puesto que contienen grupos metileno separados por dobles enlaces que debilitan el enlace metileno C- H. El radical libre lipídico, para estabilizarse, sufre un reajuste molecular y se forma un dieno conjugado que reacciona con el oxígeno molecular y se forma un radical peroxilo que puede dar lugar a endoperoxidos, o bien tomar átomos de hidrogeno de un carbono metileno o de otro ácido graso poliinsaturado adyacente y formar de nuevo, radical libre lipídico y un hidroperóxido.<sup>31</sup>

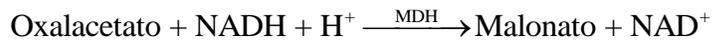
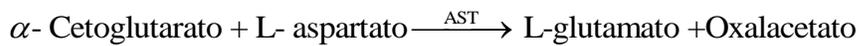
Los hiperoxidos lipídicos son compuestos estables, pero si entran en contacto con iones metálicos de transición, producen más radicales los cuales pueden iniciar y propagar otras reacciones en cadena, de esta manera se altera la estructura de las membranas y por tanto su función; los productos finales entre los que se incluyen hidrocarburos volátiles, alcoholes, aldehídos, pueden difundirse lejos del lugar donde se originaron y alterar la permeabilidad vascular, la respuesta inflamatoria o la quimiotaxis.<sup>32</sup>

### 3.6.11 Transaminasas

#### Aspartato animotransferasa

La aspartato animotransferasa (ALT) también conocida como transaminasa glutámico-oxalacética (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.

Reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría:



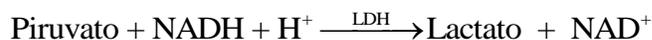
La AST cataliza la reacción de  $\alpha$ -cetoglutarato y L-aspartato a L-glutamato y oxalacetato, en la segunda reacción la malato deshidrogenasa (MDH) cataliza la oxidación del NADH a  $\text{NAD}^+$ . El índice de reducción en absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm debido a la oxidación del NADH es proporcional a la actividad AST.

#### Alanino aminotransferasa (ALT)

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.

Reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría:



La ALT cataliza la conversión de L-alanina y  $\alpha$ -cetoglutarato a piruvato y L-glutamato, posteriormente la LDH cataliza la oxidación de NADH a  $\text{NAD}^+$ . El índice de reducción en absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm debido a la oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad de ALT.

### 3.6.12 Creatín cinasa

#### CK - Total

El papel fisiológico de la creatín cinasa (CK) deriva de que el principal componente fosforilado del músculo es la fosfocreatina, cuando el músculo se contrae, el adenosintrifosfato (ATP) se consume y la creatinquinasa cataliza la refosforilación del adenosindifosfato (ADP) para formar ATP, usando fosfocreatina como reservorio de la fosforilación. La actividad en suero parece estar en función de la masa muscular del individuo.

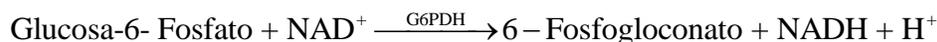
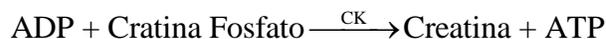
La elevación de la CK total puede ser causada por necrosis o atrofia aguda del músculo estriado, por cirugía, Parkinson, accidente cerebro-vascular (ACV), alcoholismo agudo, en las últimas semanas del embarazo, en enfermedades del corazón: miocarditis severa, infarto agudo de miocardio.

#### CK-MB

La molécula de creatinquinasa (CK) es un dímero compuesto por dos subunidades monoméricas, no idénticas: M y B. Cada una tiene un peso molecular de 40000 daltons, estas subunidades M y B, son el producto de dos genes estructurales distintos.

La CK-MB, está presente en el músculo cardíaco (de 25 a 46% de la actividad de la creatinquinasa (CK) Total) y también, en menor grado, en el músculo esquelético (< 5%), aumenta de 3 a 6 horas tras el inicio de los síntomas de infarto agudo al miocardio y el máximo se alcanza entre las 12 y 24 horas después.<sup>33</sup>

Reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría:



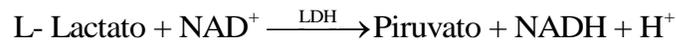
La CK cataliza la fosforilación reversible del ADP en presencia de creatinafosfato para formar ATP y creatina. La enzima auxiliar hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP formado, para producir ADP y Glucosa-6-Fosfato (G-6-P) se oxida a 6 fosfogluconato con la producción concomitante de NADH. La formación de NADH, medida a 340nm, es directamente proporcional a la actividad de CK en suero.

### 3.6.13 Deshidrogenasa

#### Lactato deshidrogenasa (LDH)

Es la enzima responsable de la conversión de lactato a piruvato. Se encuentra distribuida en hígado, corazón, músculo esquelético, eritrocitos, pulmón, bazo, plaquetas, leucocitos y cerebro, las concentraciones de esta enzima son cerca de 500 veces mayores dentro de las células que en sangre, por lo que un aumento en la actividad de la LDH en suero sugiere una lesión tisular.<sup>34</sup>

Reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría:



La lactato deshidrogenasa convierte el L-lactato en piruvato y NADH. El índice de incremento en absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm, debido a la formación del NADH, es proporcional a la actividad de la LDH.

### 3.6.14 Toxicología

Es el estudio de los efectos adversos producidos por químicos en organismos vivos. Los toxicólogos tratan de examinar la naturaleza de estos efectos (incluyendo los mecanismos de acción celulares, bioquímicos y moleculares), así como conocer la probabilidad de que ocurran.

### 3.6.15 Importancia de los exámenes de toxicidad en animales

Los efectos producidos por un compuesto en animales de laboratorio, cuando son correctamente calificados, son aplicables al ser humano; el efecto tóxico en humanos se da usualmente en el mismo rango que en los animales de experimentación; tomando como base el peso, las personas son generalmente más vulnerables que los animales de experimentación, aproximadamente con un factor de 10.

Cuando se tiene conocimiento de las diferencias cuantitativas, pueden ser aplicados factores de seguridad apropiados para calcular dosis relativamente seguras para la gente; el segundo principio, consistente en exponer a animales de laboratorio a altas dosis tóxicas, es un método necesario y válido para descubrir posibles peligros para la salud de las personas; este principio se basa en el concepto de dosis-respuesta, ya que la incidencia de un efecto en una población va a ser mayor por los aumentos de la dosis o de la exposición.

Consideraciones prácticas en el diseño de modelos experimentales demanda que el número de animales usados en experimentos de toxicología siempre sea pequeño comparado con el tamaño de las poblaciones humanas en peligro.

La obtención de resultados estadísticamente válidos en tales grupos de animales requiere el empleo de dosis relativamente grandes de modo que el efecto ocurra con bastante frecuencia para ser descubierto.

Sin embargo, el empleo de elevadas dosis puede crear problemas de interpretación si la respuesta obtenida en altas dosis no ocurre en dosis bajas. Las pruebas de toxicidad no son empleadas para demostrar que una sustancia química es segura, sino para caracterizar los efectos tóxicos que una sustancia química puede producir.<sup>35</sup>

### **3.6.16 Procedimientos generales de evaluación toxicológica.**

El conocimiento de la toxicidad de las sustancias sólo puede obtenerse, además de las previsiones teóricas, por dos vías: 1) estudios retrospectivos de casos de intoxicación, y 2) por estudios experimentales con animales y plantas.

El planteamiento de un protocolo tradicional de toxicología experimental con animales, presenta a priori, cuatro cuestiones que se deben resolver, a saber:

- a) La vía de administración que se debe emplear en el ensayo, el cual se elige de acuerdo con el tipo de producto y la posible vía por la cual el hombre la absorbe.
- b) El efecto tóxico producido por un determinado agente, que resulta directamente proporcional a su concentración en el sistema biológico y que depende de numerosos factores externos, como la naturaleza del tóxico, la cantidad administrada o el tiempo de exposición; teniendo en cuenta que la distribución del tóxico en el animal no es homogénea.
- c) El tiempo de duración del estudio realizado, en función del tipo de ensayo requerido (estudios de toxicidad aguda, subcrónica o crónica.)
- d) La especie animal utilizada en el ensayo (en general se emplean animales pequeños, por razones económicas, como ratones, hámsters, ratas, cobayos, conejos y en algunos casos, perros, en cualquiera de estos, habrá especies más sensibles que otras o más resistentes al tóxico.)

Se entiende por ensayo de toxicidad aguda la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos tras una dosis única.

Por otra parte se entiende como ensayo de intoxicación subcrónica, la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos tras pequeñas dosis diarias repetidas durante aproximadamente 90 días, pero la duración de la administración puede variar.

Por último el ensayo de toxicidad crónica hace referencia a la capacidad de una sustancia para producir efectos adversos tras pequeñas dosis diarias durante aproximadamente 2-7 años, en función de la especie estudiada.<sup>35</sup>

### 3.6.17 Técnicas histológicas

La técnica histológica es una serie secuencial de pasos a través de los cuales una muestra de tejido llega a transformarse en delgados cortes coloreados capaces de ser observados al microscopio.

Paso	Objetivos	Medios usuales
Obtención	Proveer el material para su estudio	Biopsia Resección quirúrgica Necropsia
Fijación	Preservar la morfología y composición química de las células y los tejidos. Interrumpir los procesos celulares dinámicos que ocurren a la muerte de la célula, para evitar la autólisis. Facilitar la coloración posterior Inhibir el crecimiento microbiano Aumentar la consistencia de los tejidos	Formol al 10 Bouin Glutaraldehído
Deshidratación	Eliminar el agua de los tejidos	Alcohol etílico Acetona
Diafanización	Aclarar el tejido, debido a un cambio en el índice de refracción	Xilol
Inclusión	Embeber el material en un medio fácil de cortar en fetas muy delgadas	Parafina Acrílicos Resinas Epoxi
Corte	Lograr láminas muy delgadas que sean atravesadas por la luz	Micrótomo rotatorio M. de deslizamiento Ultramicrótomo
Coloración	Posibilitar el estudio morfológico o estructural La histoquímica permite identificar a un determinado tipo de molécula o sustancia específica	Hematoxilina Eosina Tricrómicos Histoquímica
Montaje	Preservar el corte, manteniéndolo aislado del aire y deshidratado	Bálsamo del Canadá Medios plásticos

## 4.0 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México el 31.8% de la población mayor de 15 años, según informes de la OMS, 2009, presenta sobrepeso, aunado a este creciente fenómeno, existe un tremendo bombardeo publicitario, por lo que se ha hecho obsesivo la ingesta de productos para adelgazar que se anuncian en los medios de comunicación. De acuerdo a los informes de La Comisión Federal contra Riesgos Sanitario (COFEPRIS), en la nación se comercializan 21,672 productos de ese tipo, elaborados por 1,568 empresas, de las cuales 70.7% se concentran en el Distrito Federal, Estado de México y Jalisco, estos productos se venden como suplementos alimenticios con advertencias mínimas sobre efectos secundarios en la salud.<sup>1</sup>

De acuerdo a un documento emitido por el Senado de la República Mexicana, en mayo del 2008 se registraron 16 casos de intoxicación y 2 muertes en el estado de Jalisco por el consumo de *Thevetia peruviana*, esta situación ha alarmado a las autoridades sanitarias; la COFEPRIS realiza operativos en mercados en todo el país con el fin de retirar los productos que contienen esta planta y hace un llamado constante(aunque insuficiente) a la población para que no consuma dicha semilla y para que denuncie a quienes la ofrecen; sin embargo, estos tipos de productos siguen vendiéndose a través de Internet y en tiendas naturistas.<sup>4</sup>

La población mexicana tiene muy arraigado el hábito de la automedicación, y acostumbra seguir los consejos de terceras personas que carecen de preparación médica, de igual forma, busca soluciones inmediatas para resolver sus problemas de salud sin el menor esfuerzo, lo que la orilla a buscar salidas fáciles como el consumo de extractos naturales tales como la alcachofa (*Cynara scolymus*), la papaya (*Carica papaya*), la encina de mar (*Fucus vesiculosus*), el tamarindo malabar(*Garcinia cambogia*), el guaraná (*Paullinia cupana*), la alfalfa (*Medicago sativa*), la piña (*Ananas comosus*), el té verde(*Camellia sinensis*), el naranjo amargo(*Citrus aurantium*), la fasolina (*Phaseolus vulgaris*), el ortosifón (*Orthosiphon stamineus*), el codo de fraile(*Thevetia peruviana*), la vellosilla (*Hieracium pilosilla*), el glucomanano (*Amorphophallus konjak*), el té rojo (*Asphalatus linearis*), entre otros; que aunque tienen un efecto terapéutico debido a un determinado principio activo, también contiene otras sustancias que pueden llegar a ser peligrosas para la salud.

El empleo de la planta *Thevetia peruviana* como objeto de estudio en este proyecto deriva de la inquietud de conocer sus efectos tóxicos, debido a que es ingrediente de algunos productos para adelgazar, los cuales se anuncian por televisión; estos son: Capslim<sup>®</sup>, Sin hambre<sup>®</sup>, Redugrass<sup>®</sup>, Total slim<sup>®</sup> y Diet sen<sup>®</sup>.<sup>3,4</sup>

Debido a que se han registrado efectos secundarios serios, y muertes por consumo de *Thevetia peruviana*, pero no existen estudios toxicológicos referentes a esta planta, se consideró necesario realizar estudios para conocer cuál es el grado y tipo de daño que puede provocar su administración y de ser posible, indicar cuál es el rango de seguridad.

## 5.0 OBJETIVOS

### Objetivo general:

Evaluar el efecto tóxico (toxicidad aguda y subcrónica) de la *Thevetia peruviana*, determinado mediante marcadores enzimáticos en corazón e hígado en un modelo de ratón.

### Objetivos particulares:

- Inducir una intoxicación aguda por medio de la administración de una dosis única de *Thevetia peruviana*, al día 1 en un periodo de 7 días.
- Inducir una intoxicación subcrónica por medio de una administración diaria durante un mes de *Thevetia peruviana*.
- Evaluar el daño cardíaco mediante la medición de la concentración de enzimas cardíacas (CK, CK-MB, LDH) en suero de ratón.
- Medir las concentraciones de ceruloplasmina y Proteína C reactiva en suero como indicador de inflamación aguda.
- Determinar en el suero, nitritos como indicador de óxido nítrico por el método Griess, y valorar la concentración de MDA (peroxidación lipídica) mediante el método de ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Evaluar el daño hepático mediante la medición de la concentración de transaminasas (TGO Y TGP) en suero de ratón.
- Realizar cortes histológicos de corazón para la observación de zonas con necrosis.

## **6.0 HIPÓTESIS**

Si se emplea *Thevetia peruviana* en dosis única de 100 mg/ Kg de peso o de 50 mg/ Kg de peso por un periodo de un mes a dos grupos de ratones CD1 entonces se espera daño a nivel de hígado y corazón con un aumento en la concentración de ceruloplasmina, PCR, ALT, AST, LDH, CK y CK-MB y una disminución de peso en ambos grupos.

## 7.0 DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

**Población:** Ratones CD 1 con peso promedio de 25-30 g divididas en dos grupos de 15 animales cada uno.

**Tipo de estudio:** Experimental, prospectivo y transversal.

**Criterios de inclusión:** ratones CD1 machos de 1 mes de edad, con un peso de 30 g, sanos.

**Criterios de exclusión:** hembras, animales con alguna enfermedad o que no cumplan con la edad y el peso.

**Criterios de eliminación:** aquel animal que presente algún tumor durante el proyecto o muera.

## 8.0 REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL

<i>Reactivo</i>	<i>Marca</i>
Ácido clorhídrico	EM Science
Ácido ortofosfórico	
Ácido tiobarbiturico (TBA)	Sintetizado en el laboratorio de orgánica por el M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez. FES Zaragoza
Ácido sulfúrico	J.T. Baker
Agar- Agar	Bioxon
Agarosa	Bioxon
Agua destilada	Theissier
Azida de sodio	J.T. Barker
BHI (Infusión de cerebro – corazón)	Bioxon
Borato de Amonio	Mallinckrodt
Cadmino metálico	Técnica Química S.A
Cloruro de Amonio	J.T. Baker
Cloruro de sodio	Hycel de México
2,6-Di- terbutil- 4 metil fenol (BHT)	Sigma Aldrich
Fenol	J.T. Baker
Formaldehído 37%	J.T. Baker
Fosfato de sodio dibásico (PBS)	J.T. Baker
Glucosa	Merck
N- Butanol	J.T. Baker
N(1 naftil)- etilendiaminodichlorhidrato (NED)	Merck
Nitrito de sodio	Mellinckrodt
Sulfato de cobre	Técnica Clínica
Sulfato de Zinc	Hycel de México
Sulfanilamida	Merck
1,1,3,3 Tetrametoxipropano (TMP)	Aldrich
Sulfanilamida	Merck

<i>Equipo</i>	<i>Marca</i>
Agitador Rocker	Rocker Platform Bellco Glass
Agitador Vortex genie	Scientific Industries
Baño María	Precision
Baño de tejidos	Tissue FLDAT Bath Les. Boy
Balanza Analítica	Mettler H33AR
Báscula para animales	OHAUS
Centrífuga para endorf	HERMLE Z 233 M-2
Centrífuga	Hamilton BelVan Guard V 6500
Congelador	Reico
Espectrofotómetro	JENWAY 6305 UV/VIS
Estufa	Shel Lab

Histoquinete	Wax Bath Type E7606
ILab 600	
Micropipeta 5- 40 $\mu$	Finnpipette- Labsystems
Micropipeta 10- 100 $\mu$	Labpette- Labnet
Micropipeta 100- 1000 $\mu$	BIOHIT Proline
Microscopio	ZEISS Primo Start
Micrótopo	Leicon RM 2025
Olla express	Presto H Steele
Pipeta automática	Finnpipette- Labsystems
Refrigerador	Twist aire- MABE

Material	
Tubos Eppendorf	
Gradilla	
Matraz Erlenmeyer	125 mL, 1000 mL
Placas de poliestireno	Nunclon
Placas de 35mm	Falcon
Botellas para cultivo	Nunclon
Asa bacteriológica	
Pipeta graduada	1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL
Matraz aforado	100 mL, 250 mL
Vaso de precipitado	100 mL
Tubos de ensayo	13 X100
Pipeta Pasteur	
Papel parafilm	
Mechero Fisher	
Termómetro	-20 a 150° C
Celdas	
Bisturí	
Portaobjetos	
Tijeras de disección	
Pinzas	
Probeta	100 mL
Cámara de éter	
Tubos con tapón de rosca	

#### Material biológico

- Ratones machos CD1 (25g- 30 g)
- Suero de conejo anti- ceruloplasmina de ratón
- Suero de ratón
- Eritrocitos de carnero
- Extracto de *Thevetia peruviana*.

La *Thevetia peruviana* (codo de Fraile) se colectó en el mes de abril, en la comunidad de Izúcar de Matamoros, Estado de Puebla; una muestra de la planta (semilla) fue depositada en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), a la cual se le asignó un número de registro IMSSM 15 545 y fue autenticada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, jefa del herbario del IMSS. Los extractos utilizados fueron obtenidos y proporcionados por el Químico Carlos Salvador Valadez Sánchez profesor de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

## 9.0 MÉTODOS

### 9.1 Modelos de toxicidad

Inducción del proceso de intoxicación aguda

- 1) Se administró por sonda gástrica una dosis única 100 mg/ Kg del extracto acuoso de *Thevetia peruviana* a 15 ratones CD1, en el día 1.
- 2) Se observaron a los ratones diariamente durante 7 días para identificar efectos tóxicos (muerte, diarrea, salivación, irritabilidad, pérdida de peso, ataxia, anestesia, etc.), al terminar la semana, se sacrificaron los animales por medio de corte del plexo axilar (previamente anestesiados con éter) para colectar muestras de sangre con ayuda de tubos Eppendorf.
- 3) Posteriormente se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 5 minutos para la obtención de suero.

Grupo control

- 1) Se administró por sonda gástrica una dosis única de 0.2 mL de solución salina isotónica a 15 ratones CD1 y se procedió a realizar el mismo procedimiento que el grupo tratado.

Inducción del proceso de intoxicación subcrónica

- 1) Se administró por sonda gástrica 50 mg/ Kg del extracto acuoso de *Thevetia peruviana* a 15 ratones CD1 diariamente por un periodo de un mes.
- 2) Se observaron los ratones después de cada administración para identificar efectos tóxicos (muerte, diarrea, salivación, irritabilidad, pérdida de peso, ataxia, anestesia, etc.)
- 3) Finalizado el mes, se sacrificaron los animales por medio de corte del plexo axilar (previamente anestesiados con éter) para colectar muestras de sangre con ayuda de tubos Eppendorf.
- 4) Posteriormente se centrifugaron las muestras a 5000 rpm durante 5 minutos para la obtención de suero.

Grupo control

- 1) Se administró por sonda gástrica una dosis de 0.2 mL de solución salina isotónica a 15 ratones CD1 diariamente por un mes y se procedió a realizar el mismo procedimiento que el grupo tratado.

## **9.2 Índices**

Después de sacrificar a los animales se procedió a obtener el hígado y el corazón de cada ratón.

### **Índice hepático y cardiaco**

- Se pesó el órgano (hígado y corazón)
- Posteriormente se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Índice: } \frac{\text{Peso del órgano}}{\text{Peso del ratón}} \times 100$$

## **9.3 Cortes histológicos**

Los corazones fueron conservados en Formalina al 10%

A continuación se llevaron al laboratorio de Histología de la FES Zaragoza, UNAM, para la realización de los cortes histológicos.

## **9.4 Determinaciones enzimáticas (AST, ALT, LDH, CK y CK- MB)**

Estas determinaciones se realizaron de forma automatizada por el equipo I Lab 600 por medio de espectrofotometría, en suero.

## **9.5 Determinación de Ceruloplasmina**

### Preparación de las placas

- 1) Se pesaron 0.3 g de agarosa en la balanza analítica;
- 2) Se pasaron a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, se les adicionaron 30 mL de PBS;
- 3) Se colocaron 6 tubos de ensayo 13x100 en un baño a 45° C;
- 4) Se colocó el matraz en el microondas y se le dieron ciclos de 10 segundos hasta que se observó totalmente disuelto;
- 5) Se adicionaron 2 mL de agarosa al 1% en cada tubo 13x100;
- 6) A cada tubo se le vertieron 150µL de suero de conejo anticerculoplasmina de ratón y se agitaron con ayuda de un vortex;
- 7) Cada uno de los tubos fue vaciado en un pozo de las placas de Falcon, evitando la formación de burbujas;
- 8) La placa se dejó reposar hasta alcanzar la solidificación;
- 9) Se realizaron 4 perforaciones en cada placa de agarosa.

### Procesamiento de la muestra

- 1) Se colocaron 10  $\mu\text{L}$  de cada muestra problema en los pozos;
- 2) Estos fueron identificados de acuerdo a la numeración que se le asignó a cada muestra;
- 3) La placa se refrigeró por un tiempo de 48 horas;
- 4) Pasado el tiempo, se midió el diámetro del halo de precipitación con una regla milimétrica y consecutivamente se midieron los diámetros de los halos del estándar (se empleó una concentración de 21.6 mg/ dL de ceruloplasmina con un halo de 4 mm de diámetro).

### 9.6 Determinación de nitritos

#### Plateamiento del cadmio

- 1) En 30 tubos de 13 X 100 se colocaron 0.5 g de cadmio metálico;
- 2) Se agregaron 2 mL de sulfato de cobre al 5 %, se agitaron por 10 minutos en un agitador de placa horizontal;
- 3) A continuación se lavaron 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre;
- 4) Se le dio un último lavado con ácido clorhídrico 0.1 N para retirar el hidróxido de cadmio, aproximadamente a 2 volúmenes con el tubo lleno, mediante centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos;
- 5) Finalmente se lavó el cadmio con cloruro de amonio al 5 % pH= 9, por centrifugación a 3500 rpm por 5 minutos.

#### Preparación de la muestra

- 1) A 100  $\mu\text{L}$  de suero se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada (dilución 1:4);
- 2) Se desecharon 20  $\mu\text{L}$  de la dilución y se agregaron 20  $\mu\text{L}$  de la solución de  $\text{ZnSO}_4$ , se mezcló bien (esta solución formó un precipitado de proteínas);
- 3) Se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos;
- 4) A los tubos con el cadmio activado se les eliminó el  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se les adicionó el sobrenadante del centrifugado anterior;
- 5) Se taparon con parafilm y se colocaron en una plancha de agitación horizontal por 15 minutos;
- 6) Se centrifugaron los tubos a 3500 rpm por 5 minutos, y se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para el ensayo;
- 7) Se construyó la curva de calibración con el patrón

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
Muestra	200 del sobrenadante	700

---

Adicionar 50  $\mu$ L de sulfanilamida. Incubar 10 min.

Adicionar 50  $\mu$ L del reactivo de NED, mezclar e incubar 30 min

Leer a 540 nm.

---

Cuadro 1. Curva patrón. Concentración del estándar 20 mg/ mL de Nitrito de sodio

- 8) Se determinó la concentración de nitritos en suero de ratón y se reportaron los resultados con la utilización de la curva patrón de nitrito de sodio.

### 9.7 Determinación de peroxidación lipídica (MDA). Método de TBA (ácido tiobarbitúrico)

#### Procesamiento de la muestra

- 1) Se colectaron 100  $\mu$ L de la muestra del plasma de cada ratón en tubos Eppendorf;
- 2) Se les agregaron 10  $\mu$ L de BHT 2 mM;
- 3) Se diluyó el plasma 1:5 con PBS (100  $\mu$ L de plasma en 400  $\mu$ L de PBS);
- 4) Se tomaron 400  $\mu$ L de plasma con 50  $\mu$ L de BHT 12.6 mM y 400  $\mu$ L de ácido orto fosfórico 0.2 M;
- 5) Se mezclaron en el vortex por 10 segundos, y se le adicionaron 50  $\mu$ L de TBA 0.11 M/L y se mezclaron de nuevo con vortex.

#### Producción de color

- 1) Se colocó la mezcla de la reacción en un baño de agua a 90° C por 15 minutos, los tubos se taparon con papel aluminio;
- 2) Se enfriaron en hielo, se agregaron 1000  $\mu$ L de n-butanol y 100  $\mu$ L de NaCl solución saturada y se agitaron vigorosamente por 30 segundos;
- 3) Se centrifugaron a 5000 rpm por 1 minuto, y se transfirieron 500  $\mu$ L de la fase de butanol a una celda;
- 4) Se realizó la lectura a 535 nm y a 572 nm, para con ello corregir la absorción;
- 5) Se realizó la curva estándar de MDA, para sacar las concentraciones de MDA y así reportar la peroxidación lipídica en suero de ratón.

Tubos	MDA ( $\mu$ mol/ L)	TMP ( $\mu$ L)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ( $\mu$ L)	TBA ( $\mu$ L)	Agua ( $\mu$ L)
B	0	0	600	200	200
1	0.2	5	600	200	195
2	0.4	10	600	200	190
3	0.8	20	600	200	180
4	1.2	30	600	200	170
5	2.0	50	600	200	150
6	2.8	70	600	200	130
7	4.0	100	600	200	100

Cuadro 2. Curva patrón. Concentración del estándar de peroxidación lipídica.

## 9.8 Determinación de Proteína C Reactiva.

### Extracción del grupo carbohidrato de neumococo

- 1) Se preparó el medio de cultivo BHI Agar (Se prepararon 450 mL: Se preparó primero el HBI, se colocaron 16.65 g en un matraz de 1000 mL, posteriormente se agregó agua destilada aprox. 350 mL para disolverlo, se pesaron 7.2 g de agar-agar y se pasaron al matraz; finalmente se agregaron los 100 mL restantes. Se agitó con un poco de calentamiento para disolverlo);
- 2) Se esterilizó a 121°C, 15 psi por 15 minutos;
- 3) Después de esterilizar se dejó enfriar a 45°C en baño de agua;
- 4) Posteriormente se vació en botellas de cultivo agregando 60 mL en cada una, se dejaron las cajas en posición horizontal hasta que solidificó el medio de cultivo. (4 botellas);
- 5) Al solidificar el medio se introdujo en la incubadora a 37°C por 24 horas para verificar que no haya crecimiento por contaminación.

### Sembrado de *Streptococcus pneumoniae*

- 1) A 2 tubos sembrados anteriormente se le agregaron a cada uno 2 mL de agua destilada estéril;
- 2) Se agitaron los tubos y con ayuda de un asa bacteriológica se desprendieron las bacterias, con una pipeta estéril se tomaron los 2 mL de inóculo de cada tubo (4 mL en total);
- 3) Se colocaron 4 mL de inóculo en cada botella. Se agitaron las botellas para que todo el inóculo se esparciera en toda la superficie del medio;
- 4) Se metieron a incubar a 37°C durante 48 horas.

### Obtención del polisacárido C

- 1) Ya que se observó suficiente crecimiento en las botellas, se agregaron a cada botella 2 mL de PBS y se agitaron para remover las bacterias;
- 2) Con ayuda de una pipeta se tomaron los 2 mL de cada botella y se colocaron en un tubo para centrifugarlos por 30 minutos a 3500 rpm. Se realizaron 3 lavados con PBS;
- 3) Después del último lavado que se hizo con PBS se colocó el tubo en la autoclave a esterilizar a 121°C, 15 psi por 15 minutos;
- 4) Una vez estéril se centrifugó por 30 minutos a 3500 rpm para separar el polisacárido C del paquete celular;
- 5) Se eliminó el paquete celular y nos quedaremos con el sobrenadante.

### Cuantificación de polisacárido C por el método de Fenol- ácido sulfúrico.

Curva patrón: Se usó un estándar de glucosa

- 1) Se preparó una solución de glucosa. (Colocando 25 mg de glucosa en 250 mL de agua destilada.);
- 2) Se preparó la solución de Fenol al 80% (para 4 mL se pesaron 3.2 g de fenol + 0.8 mL de agua);
- 3) El ácido sulfúrico se agregó poco a poco ya que se trata de una reacción exotérmica.

Tubo	mL de STD de glucosa	mL agua destilada	mL fenol 80%	mL de H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> concentrado
Blanco	0.0	2	0.1	5.0
1	0.1	1.9	0.1	5.0
2	0.2	1.8	0.1	5.0
3	0.3	1.7	0.1	5.0
4	0.4	1.6	0.1	5.0
5	0.5	1.5	0.1	5.0
6	0.6	1.4	0.1	5.0
7	0.7	1.3	0.1	5.0
8	0.8	1.2	0.1	5.0
9	0.9	1.1	0.1	5.0
10	1.0	1.0	0.1	5.0

Cuadro 3. Curva patrón para cuantificación de azúcares reductores

- 4) Se dejaron reposar los tubos de 20 a 30 minutos y se leyeron a 490 nm.

#### Muestra problema

- 1) Se realizó una dilución 1:10

1:10: 0.5 mL de muestra + 4.5 mL de agua destilada –Solución A  
1 mL + 0.05 mL de Fenol + 2.5 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

En este trabajo solo se realizó el tubo 3 de la curva estándar, este mostró una absorbancia de 0.386 nm (que equivale a una concentración de 30 µg); para la muestra problema se obtuvo una absorbancia de 0.271 nm (que equivale a una concentración de 210.6 µg/ mL)

#### Pegado del carbohidrato C

- 1) Se lavaron los eritrocitos (3 mL de eritrocitos + 3 mL de solución salina – centrifugación por 5 minutos);
- 2) Se preparó la solución de carbohidrato C a 50 µg/ mL (0.5 mL de carbohidrato + 1.5 mL de agua destilada);
- 3) Se colocaron 0.2 mL de paquete celular con 2 mL del carbohidrato y se incubaron en baño de agua a 37° C por una hora;
- 4) Posteriormente se lavó tres veces para eliminar el carbohidrato libre;
- 5) Finalmente se ajustó a un volumen de 20 mL con PBS para obtener una solución al 1 %.

#### Determinación de la proteína C reactiva en muestras problemas.

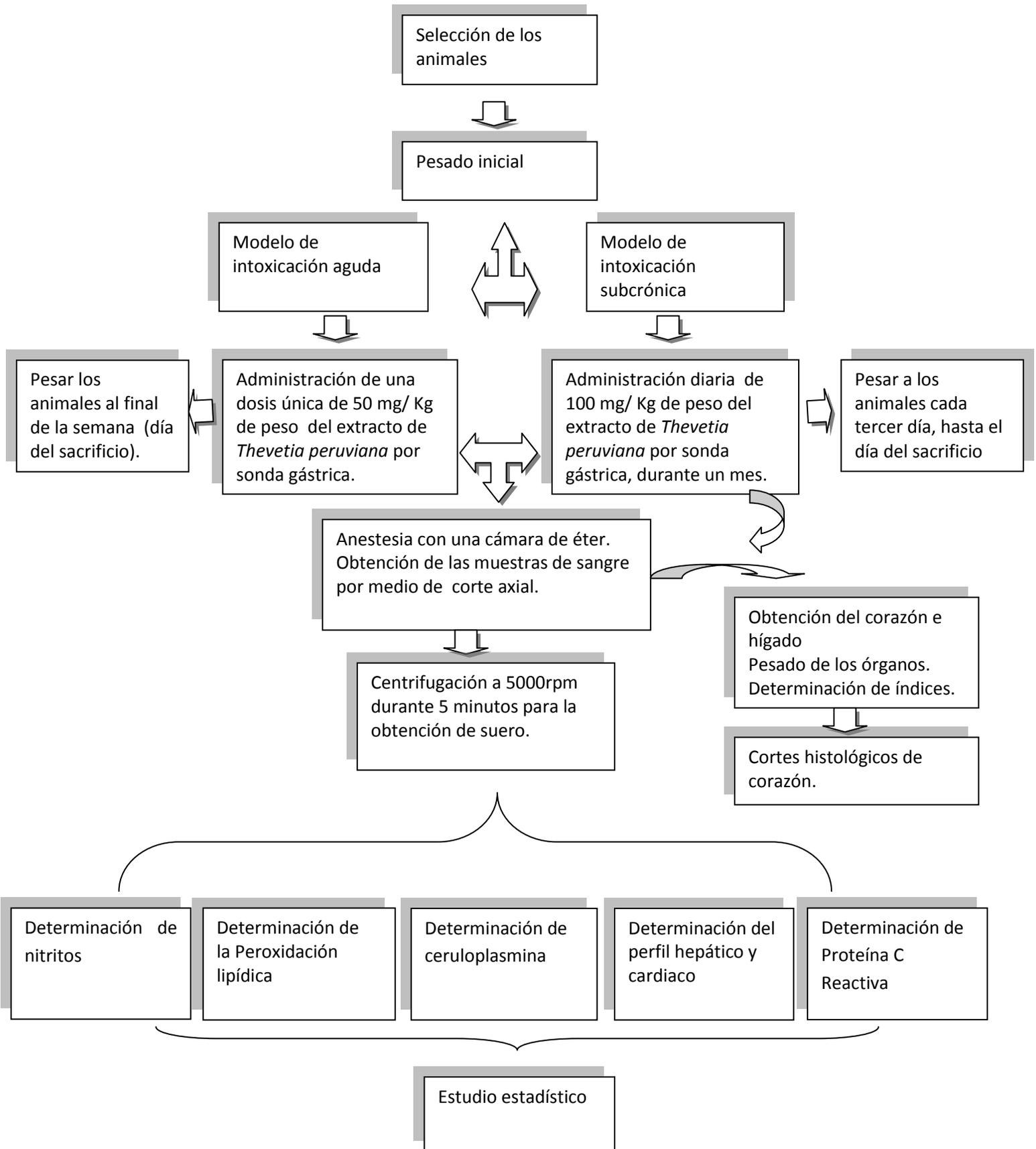
- 1) En placas de poliestireno de fondo en pico se colocaron 50 µL de PBS + 50 µL del suero problema + 50 µL eritrocitos al 1%;
- 2) Se homogenizó y se pasaron 50 µL de la mezcla al pozo 2, se homogenizó y se realizó lo mismo hasta llegar al pozo 11, donde se eliminaron 50 µL de la mezcla;
- 3) El pozo número doce fungió como testigo, aquí solo se colocó PBS y eritrocitos al 1%;

- 4) Se incubó la placa a 37° C por una hora;
- 5) Se observaron los pozos para verificar que muestras presentaron aglutinación.

### **9.9 Estudio estadístico**

Se realizó el análisis estadístico de los resultados mediante el programa estadístico SPSS versión 11.5, y la técnica estadística usada fue la t de Student, que nos permite identificar si existen diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con tratamiento, con una confianza al 95%.

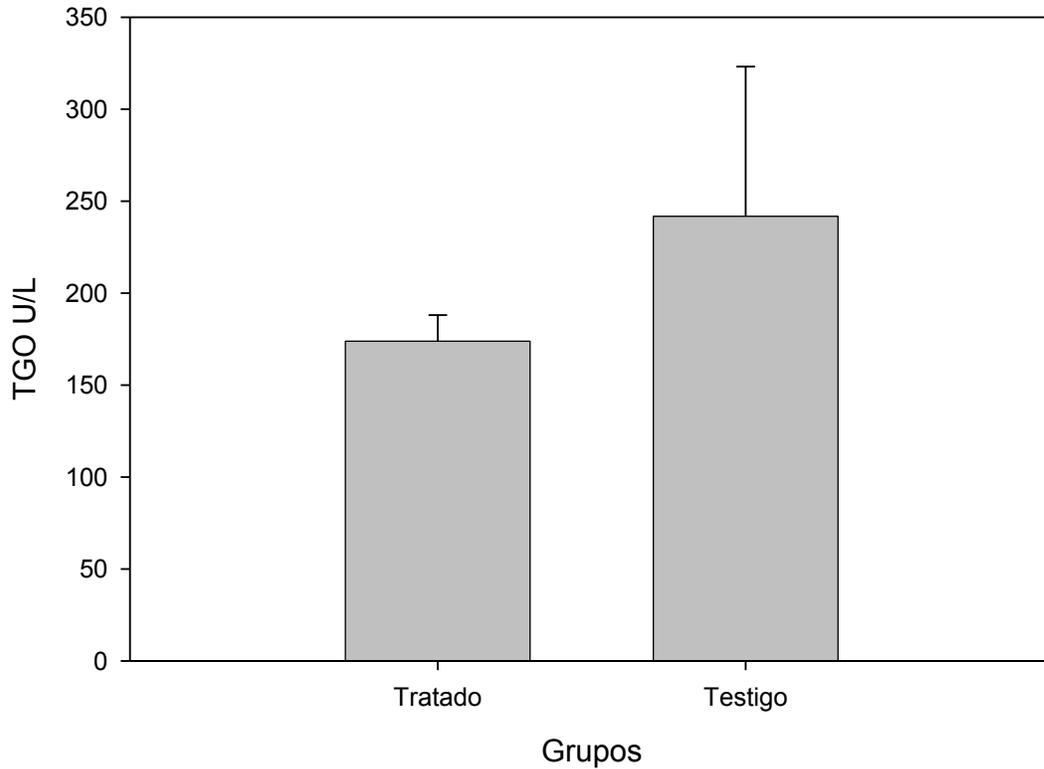
## 10.0 DIAGRAMA DE FLUJO



## 11.0 RESULTADOS

### 11.1 Resultados de la intoxicación aguda

Comparación de medias de las concentraciones de TGO con respecto al tratamiento

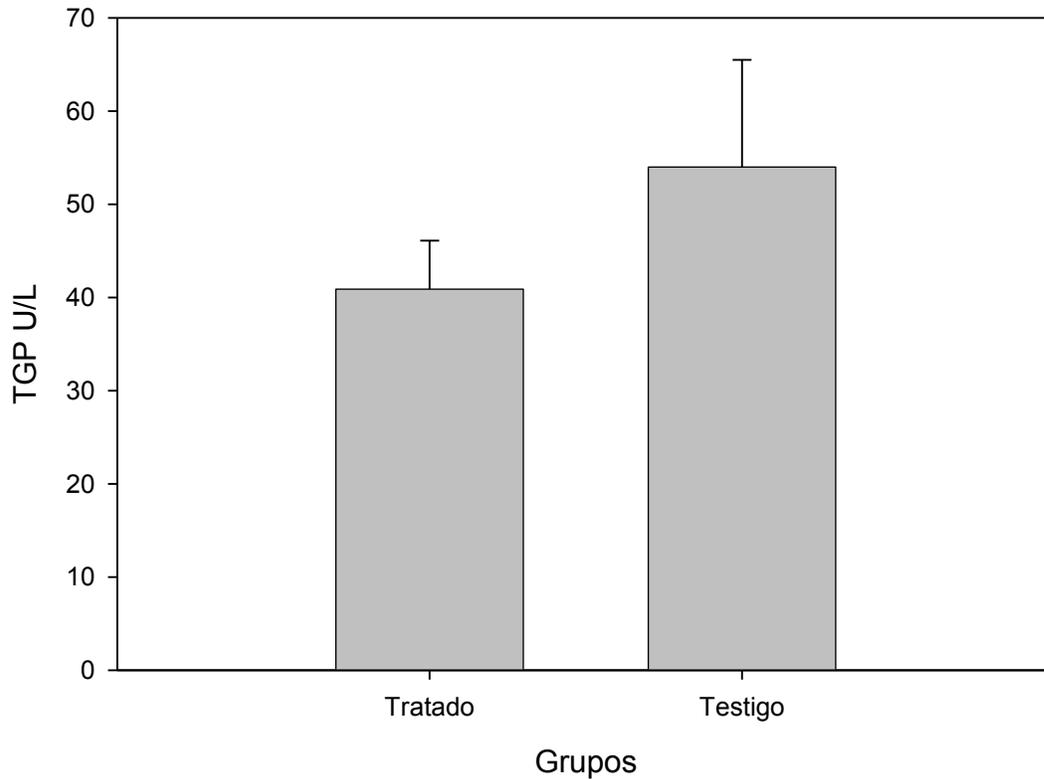


Gráfica 1. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de TGO del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	241.80	81.32333	0.422
<b>Tratado</b>	173.90	14.19894	

Cuadro 4. Comparación de medias de las concentraciones de TGO con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de TGP con respecto al tratamiento.

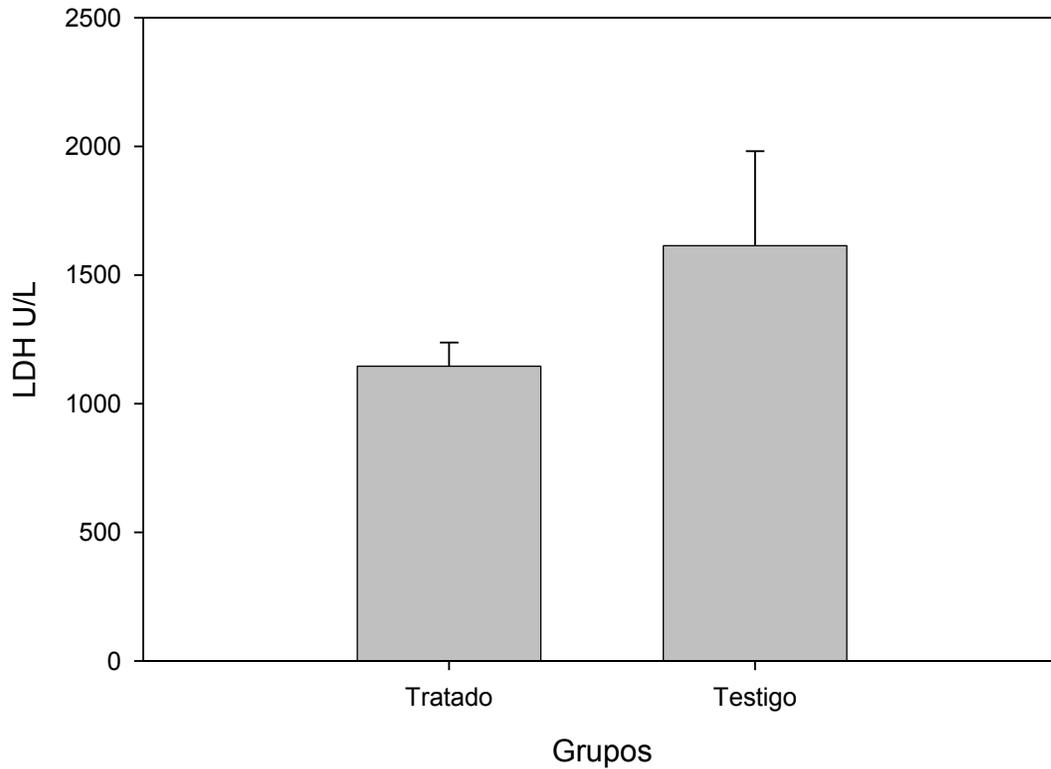


Gráfica 2. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de TGP del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	54.00	11.49493	0.313
<b>Tratado</b>	40.90	5.18856	

Cuadro 5. Comparación de medias de las concentraciones de TGP con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de LDH con respecto al tratamiento.

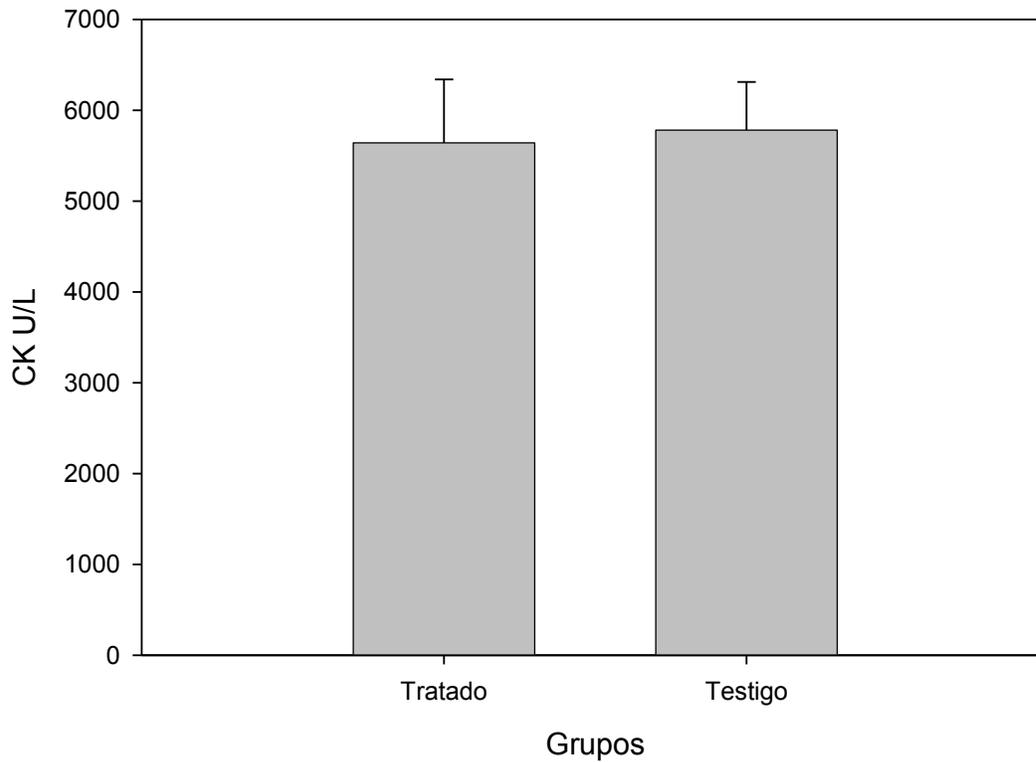


Gráfica 3. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de LDH del grupo tratado y el grupo control

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	1613.90	367.5189	0.232
<b>Tratado</b>	1145.10	92.56475	

Cuadro 6. Comparación de medias de las concentraciones de LDH con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de CK con respecto al tratamiento.

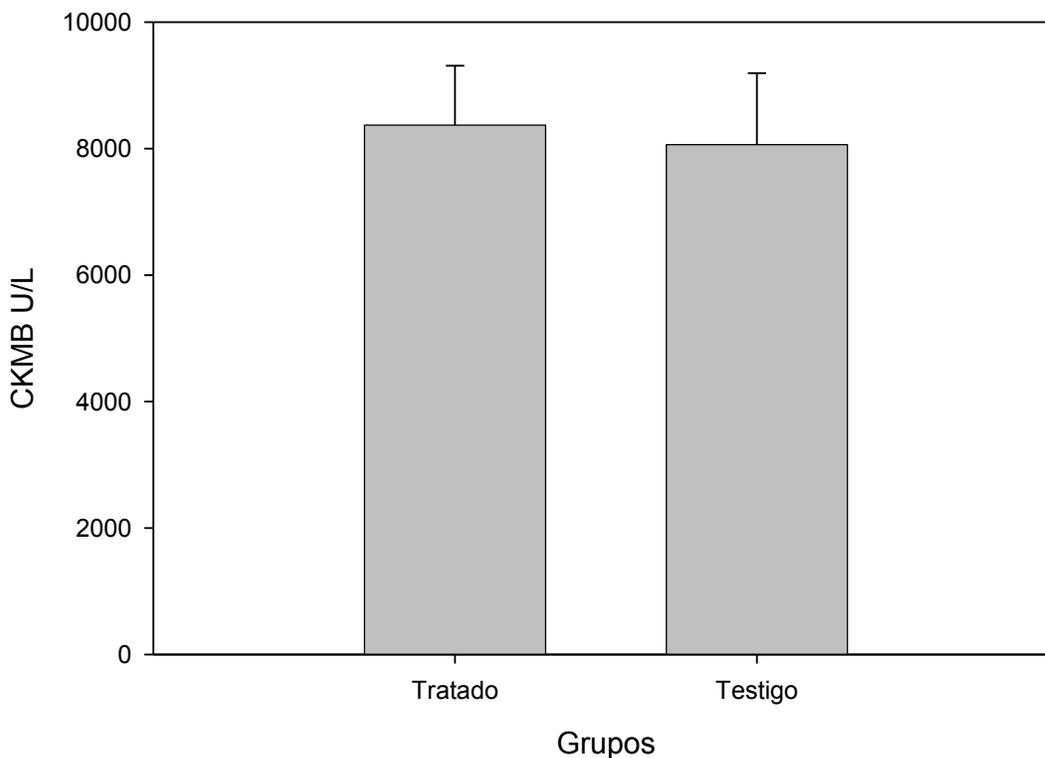


Gráfica 4. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de CK del grupo tratado y el grupo control

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	5780.3333	530.48081	0.878
<b>Tratado</b>	5641.00	697.36901	

Cuadro 7. Comparación de medias de las concentraciones de CK con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de CK MB con respecto al tratamiento.

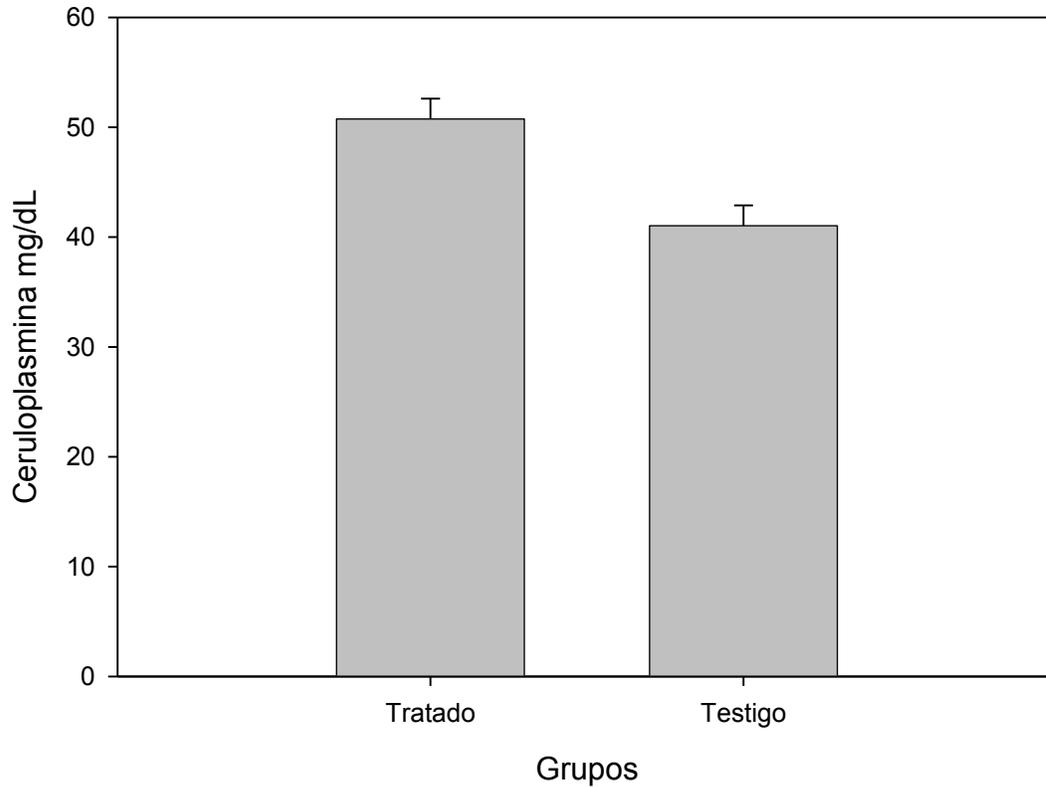


Gráfica 5. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de CK- MB del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	8060.80	1133.20183	0.836
<b>Tratado</b>	8369.40	939.96328	

Cuadro 8. Comparación de medias de las concentraciones de CK con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de ceruloplasmina con respecto al tratamiento.

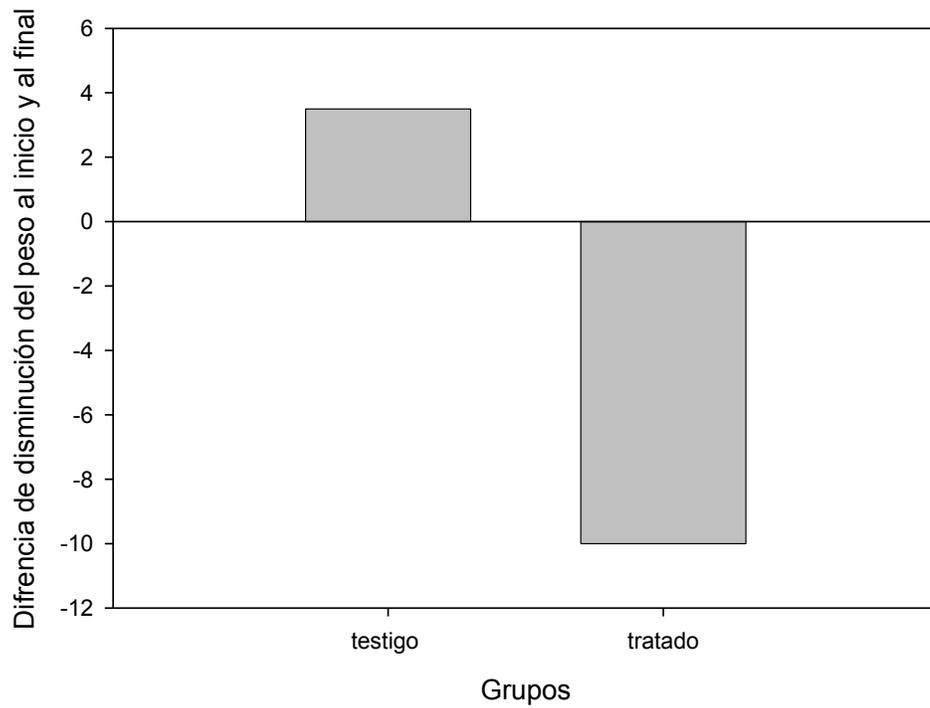


Gráfica 6. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de Ceruloplasmina del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	41.04	1.83565	0.001
<b>Tratado</b>	50.76	1.83565	

Cuadro 9. Comparación de medias de las concentraciones de Ceruloplasmina con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student con diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), con una confianza del 95%.

## Diferencia del incremento de peso al inicio y al final del ensayo



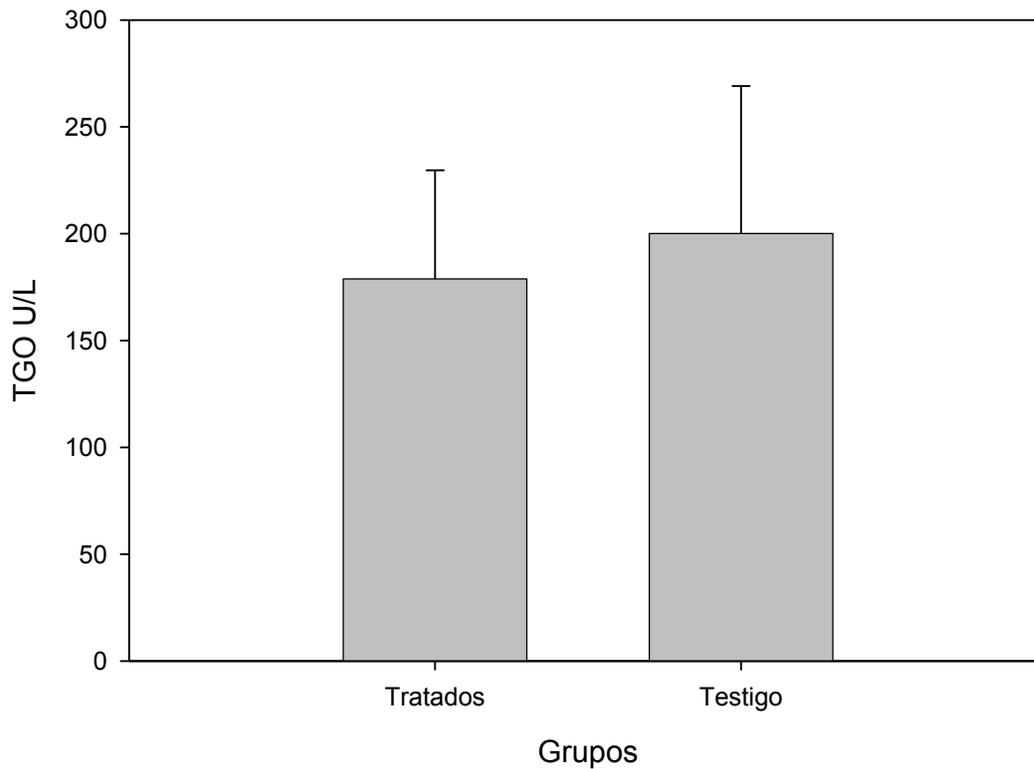
Gráfica 7. Muestra la cantidad de peso que aumento el grupo testigo y la cantidad de peso que perdió el grupo tratado al término del estudio.

<i>Grupo</i>	<i>Disminución promedio de peso (g)</i>
<b>Testigo</b>	3.5
<b>Tratado</b>	-10.0

Cuadro 10. Comparación de la disminución de peso entre el grupo Testigo y el grupo Tratado.

### 11.2. Estudio subcrónico.

Comparación de medias de las concentraciones de TGO con respecto al tratamiento.

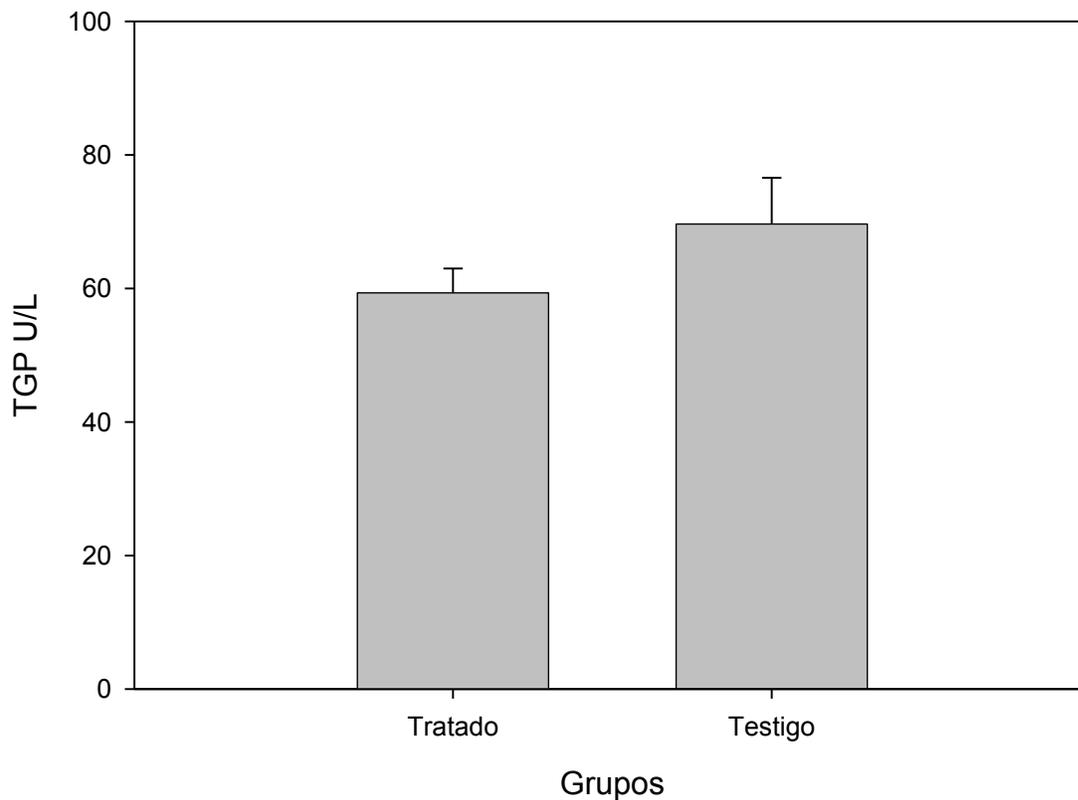


Gráfica 8. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de TGO del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	200.13	68.950	0.408
<b>Tratado</b>	178.87	50.813	

Cuadro 11. Comparación de medias de las concentraciones de TGO con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de TGP con respecto al tratamiento.

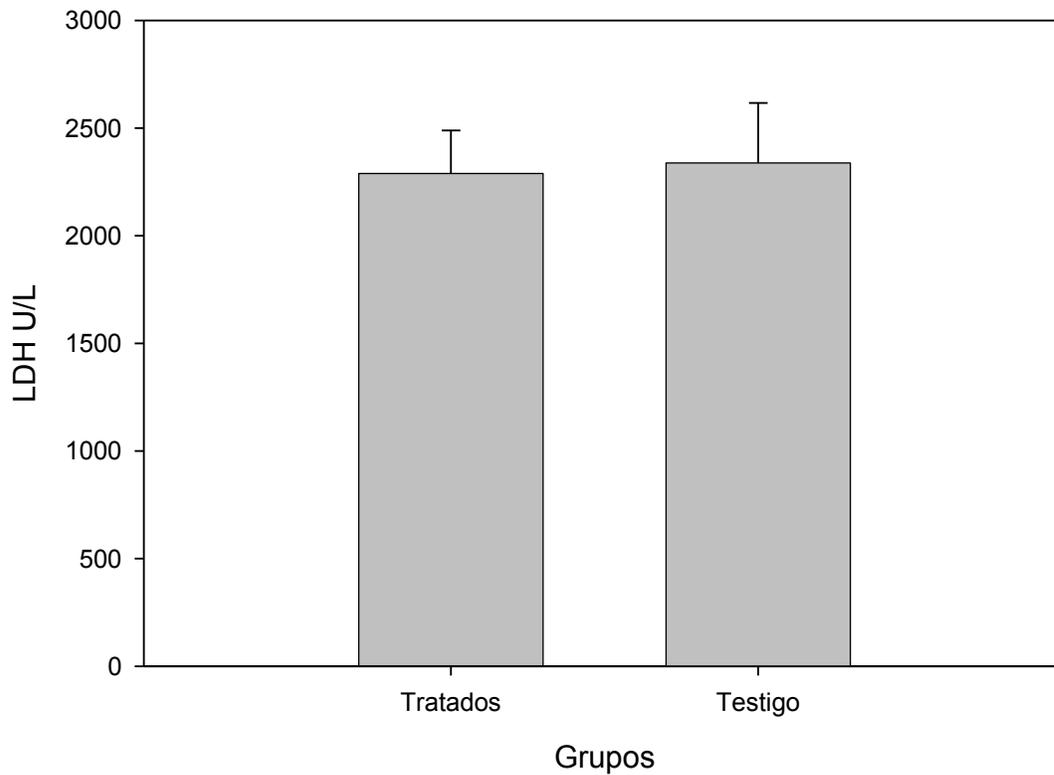


Gráfica 9. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de TGP del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	69.63	6.936	0.161
<b>Tratado</b>	59.33	3.651	

Cuadro 12. Comparación de medias de las concentraciones de TGP con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de LDH con respecto al tratamiento.

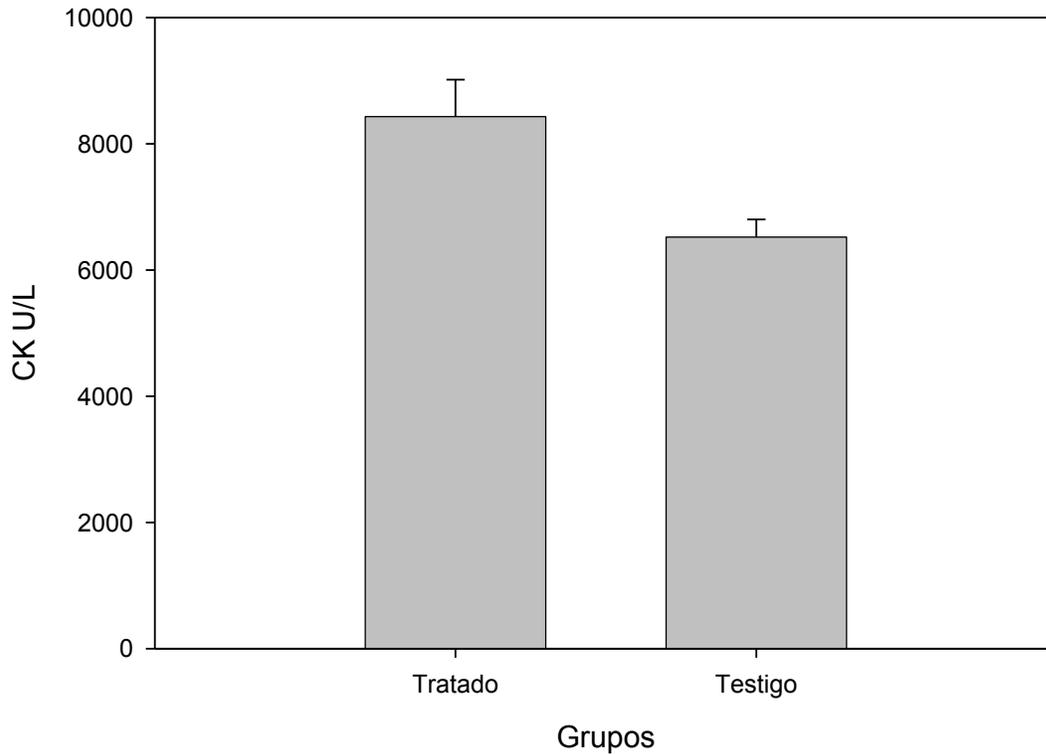


Gráfica 10. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de LDH del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	2337.63	278.582	0.888
<b>Tratado</b>	2289.27	199.047	

Cuadro 13. Comparación de medias de las concentraciones de LDH con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de CK con respecto al tratamiento.

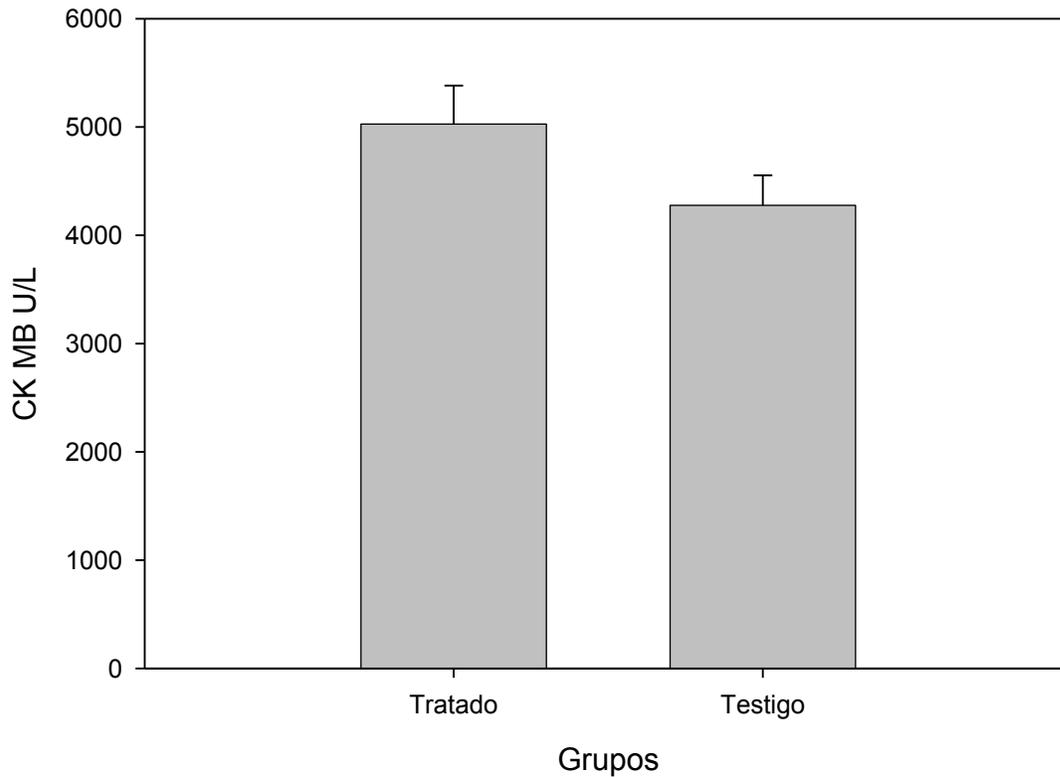


Gráfica 11. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de CK del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	6522.63	1095.003	0.105
<b>Tratado</b>	8431.40	583.584	

Cuadro 14. Comparación de medias de las concentraciones de CK con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de CK MB con respecto al tratamiento.

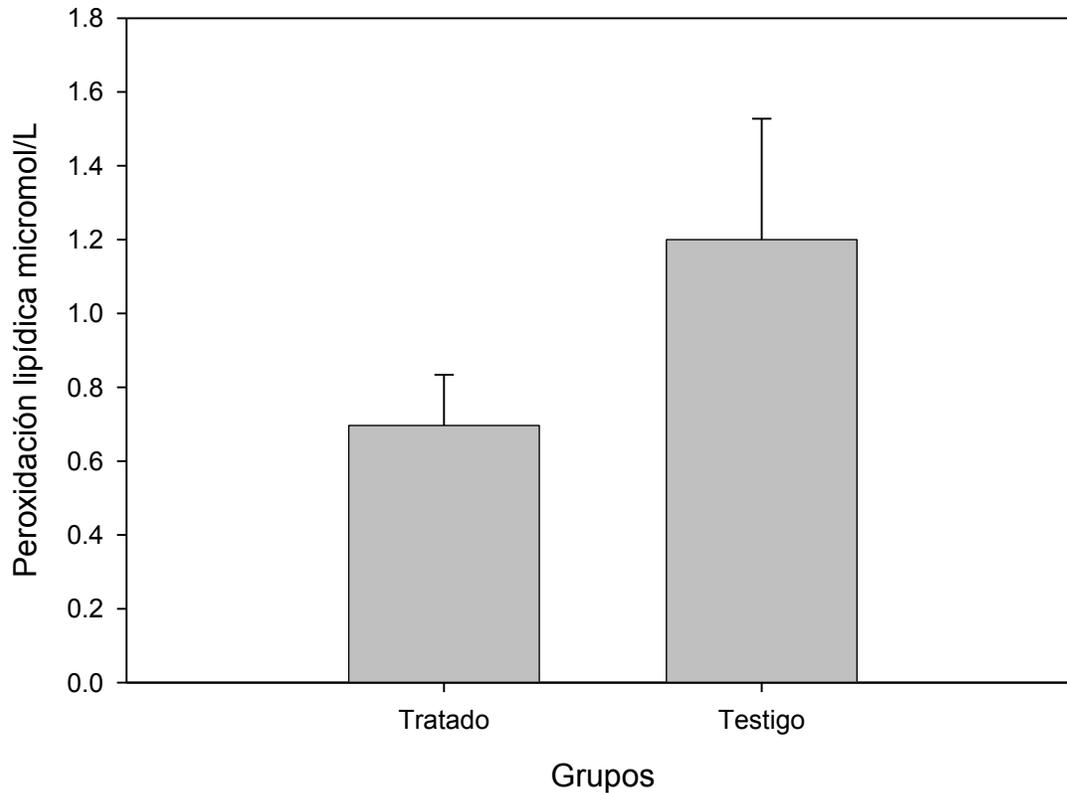


Gráfica 12. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de CK del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	4275.75	986.242	0.391
<b>Tratado</b>	5027.47	354.234	

Cuadro 15. Comparación de medias de las concentraciones de CK MB con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de peroxidación lipídica con respecto al tratamiento.

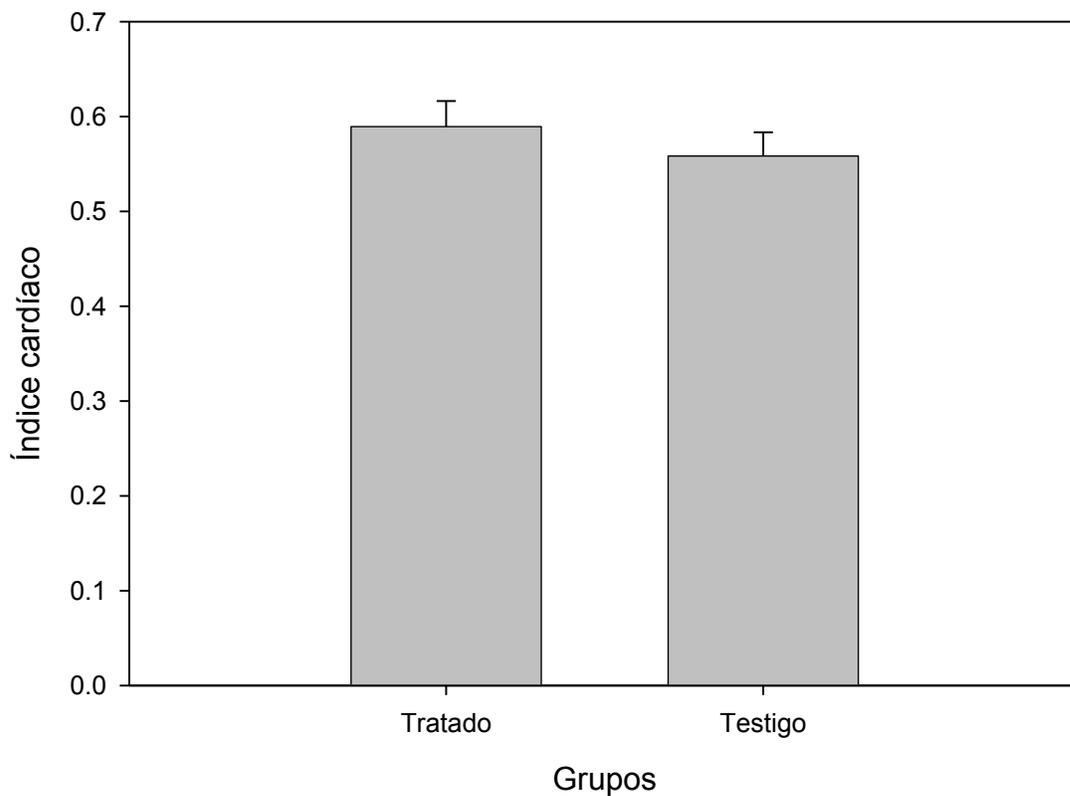


Gráfica 13. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de Peroxidación lipídica del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	1.200150	0.3274247	0.1
<b>Tratado</b>	0.696360	0.1376227	

Cuadro 16. Comparación de medias de las concentraciones de peroxidación lipídica con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de los índices cardiacos con respecto al tratamiento.

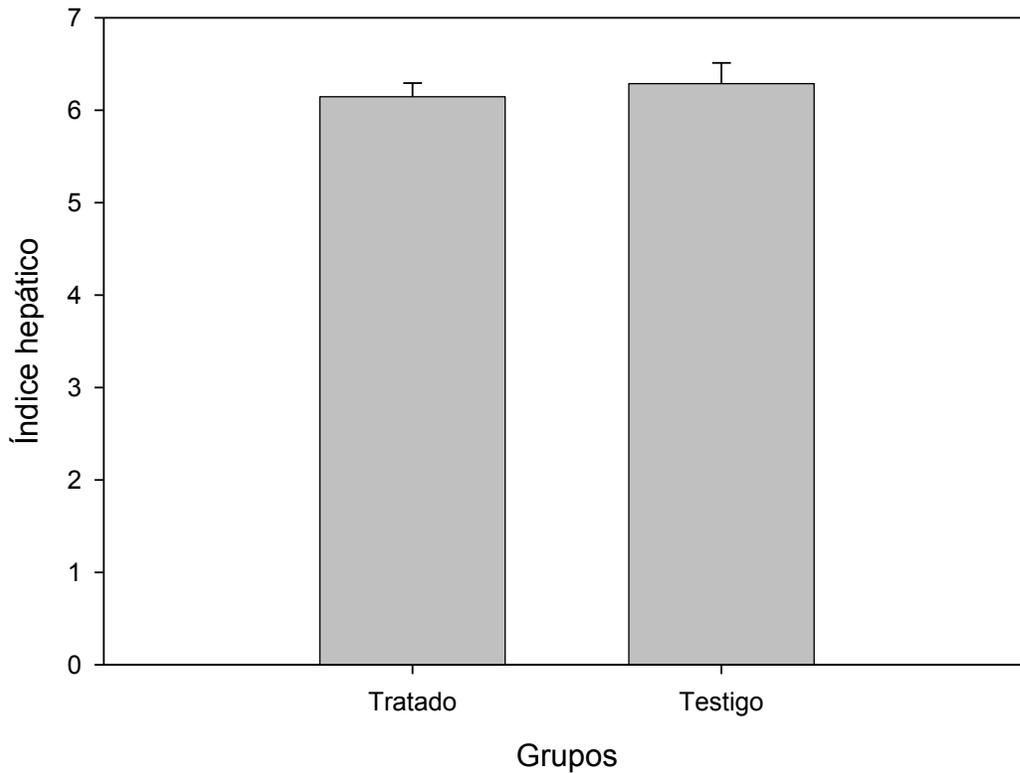


Gráfica 14. Muestra el valor de la media y el error estándar para los índices cardiacos del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	0.558375	0.0204934	0.447
<b>Tratado</b>	0.589347	0.0268543	

Cuadro 17. Comparación de medias de los índices cardiacos con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de los índices hepáticos con respecto al tratamiento.

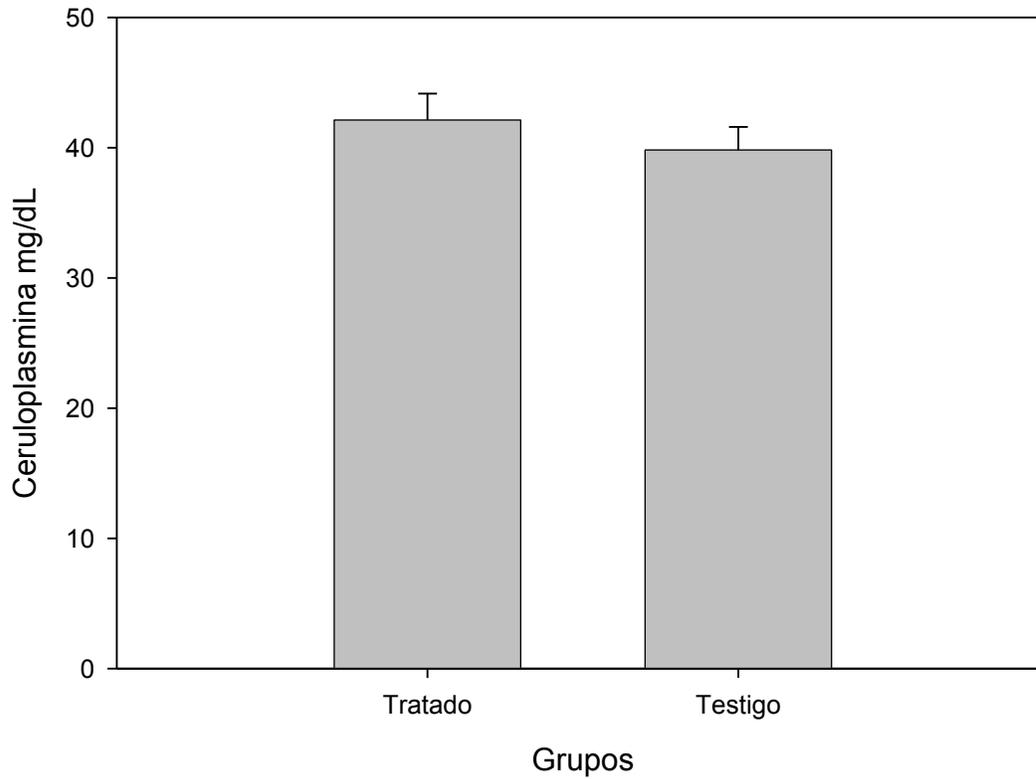


Gráfica 15. Muestra el valor de la media y el error estándar para los índices hepáticos del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	6.287438	0.2231002	0.589
<b>Tratado</b>	6.145907	0.1466150	

Cuadro 18. Comparación de medias de los índices hepáticos con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de ceruloplasmina con respecto al tratamiento.

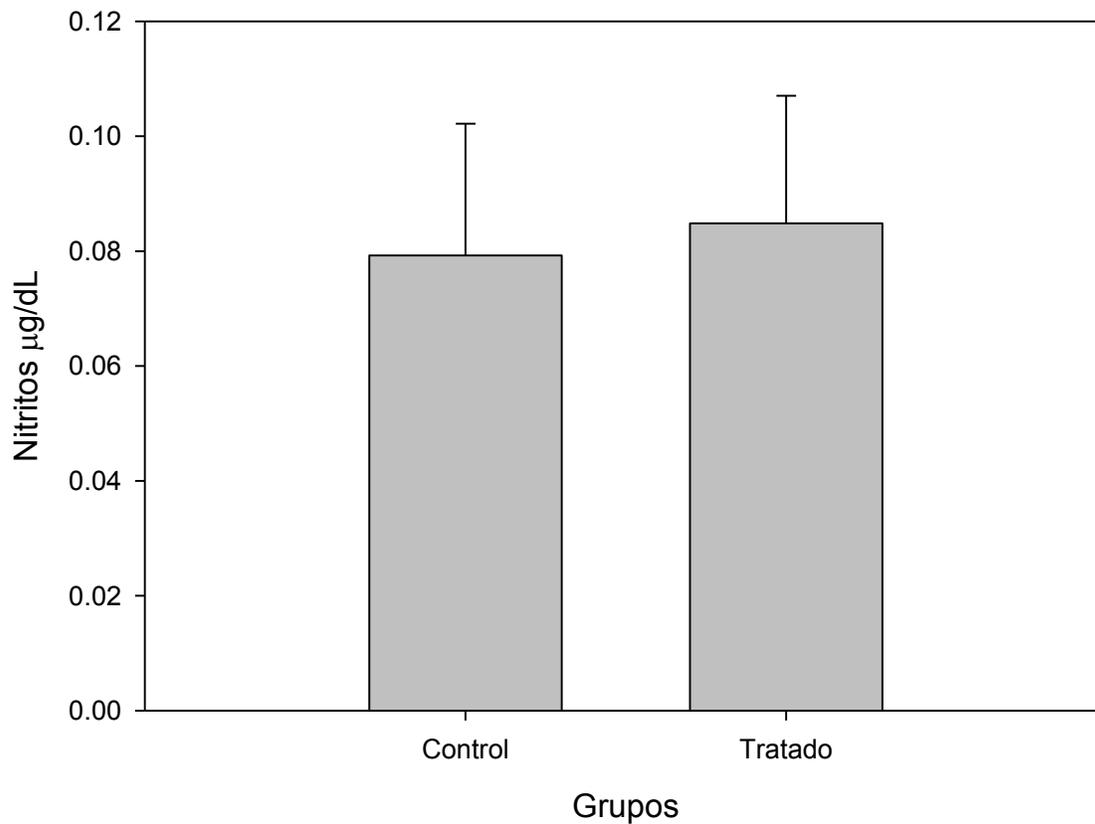


Gráfica 16. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de ceruloplasmina del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	39.825	2.05	0.630
<b>Tratado</b>	40.120	1.7636	

Cuadro 19. Comparación de medias de las concentraciones de ceruloplasmina con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de nitritos con respecto al tratamiento

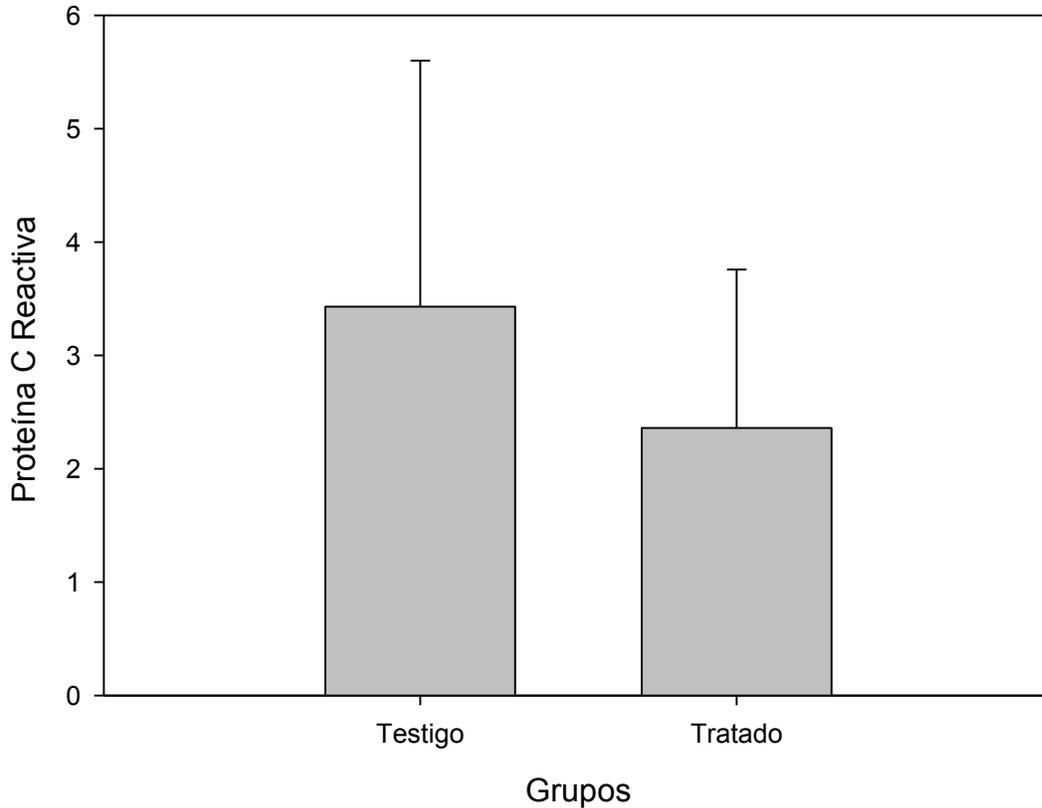


Gráfica 17. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de nitritos del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	0.079250	0.0229305	0.874
<b>Tratado</b>	0.084833	0.0221997	

Cuadro 20. Comparación de medias de las concentraciones de nitritos con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de T de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación de medias de las concentraciones de Proteína C Reactiva con respecto al tratamiento.

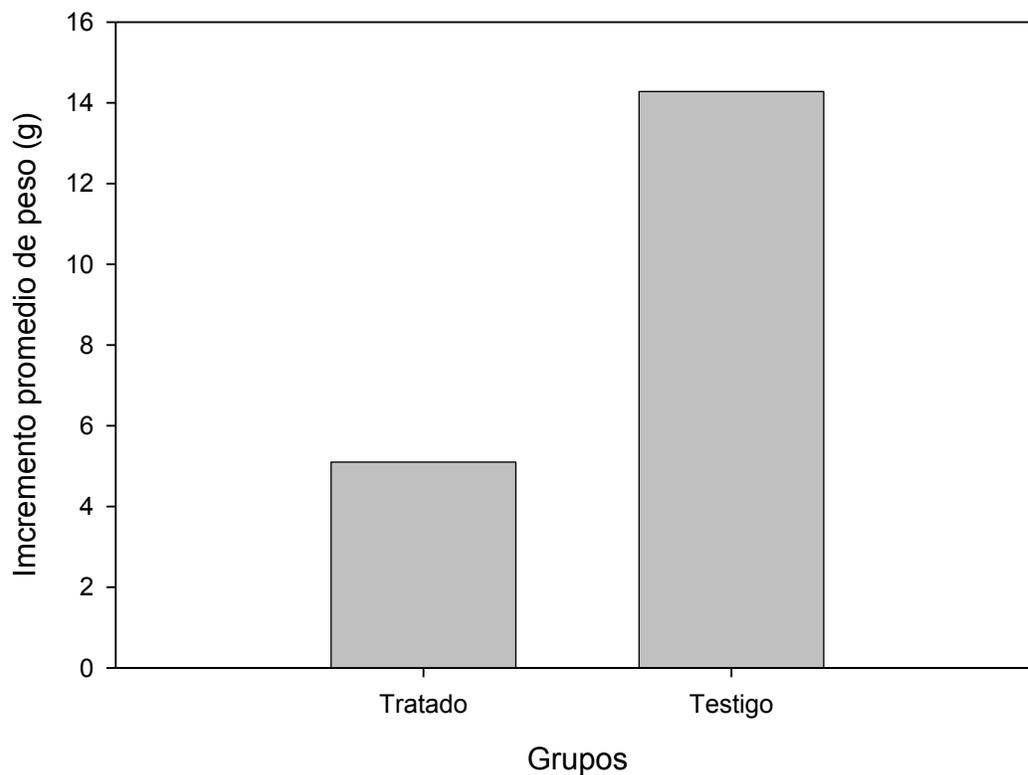


Gráfica 18. Muestra el valor de la media y el error estándar para los niveles de proteína C reactiva del grupo tratado y el grupo control.

<b>Grupo</b>	<b>Media</b>	<b>Error</b>	<b>Significancia</b>
<b>Testigo</b>	3.43	2.36	0.511
<b>Tratado</b>	2.36	1.397	

Cuadro 21. Comparación de medias de las concentraciones de proteína C reactiva con respecto al tratamiento, analizados mediante la prueba de t de Student sin diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), con una confianza del 95%.

Comparación del incremento de peso entre el grupo Testigo y el grupo Tratado.



Gráfica 19. Muestra la cantidad de peso que aumentaron ambos grupos al término del estudio.

<b><i>Grupo</i></b>	<b><i>Incremento promedio de peso (g)</i></b>
<b>Testigo</b>	14.21
<b>Tratado</b>	5.1

Cuadro 22. Comparación del incremento de peso entre el grupo Testigo y el grupo Tratado.

### 11.3 COMPORTAMIENTO



Figura 2. Comportamiento normal de ratones CD1. Se trata del grupo testigo.



Figura 3. Ratón del grupo testigo que presenta heridas en el lomo debido al comportamiento territorial de los ratones machos CD1.



Figura 4 y 5. Ratones CD1 tratados con el extracto de *Thevetia peruviana*, se muestran postrados después de 20 minutos de la administración.

#### 11.4 CORTES HITOLÓGICOS

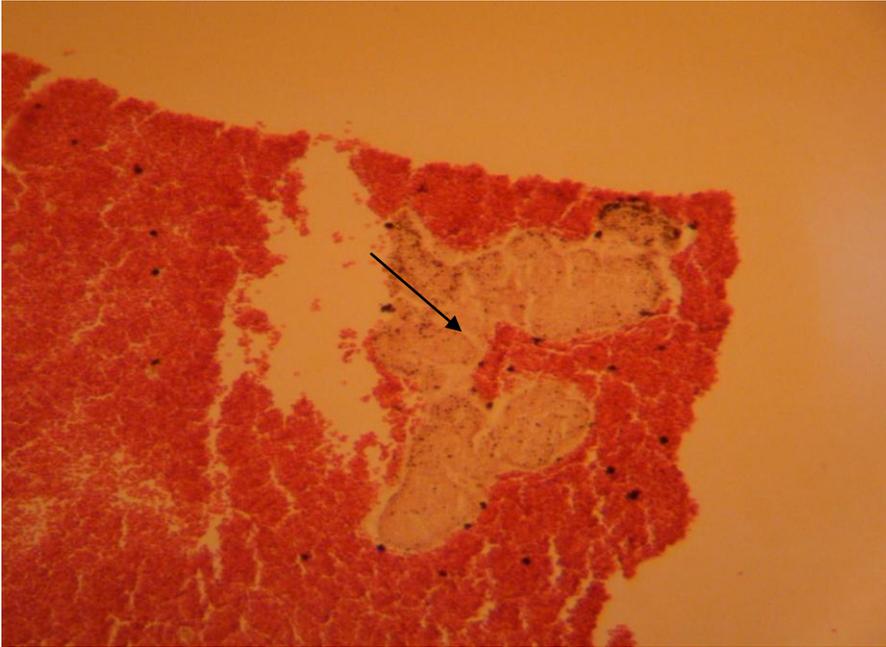


Figura 6. Zona de necrosis en fibras musculares cardiacas

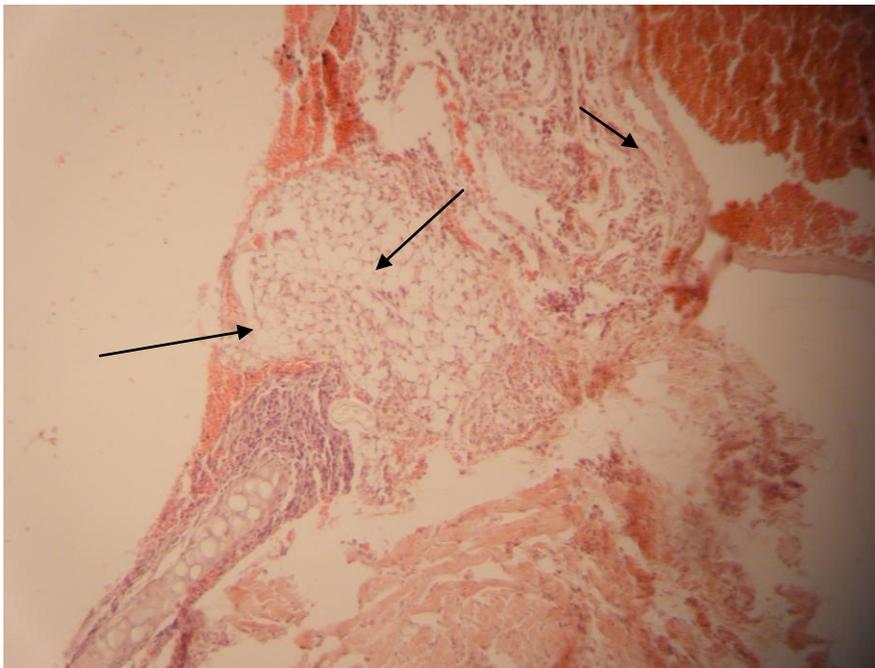


Figura 7. Se muestran zonas de infiltración leucocitaria con predominio en la zona del endocardio

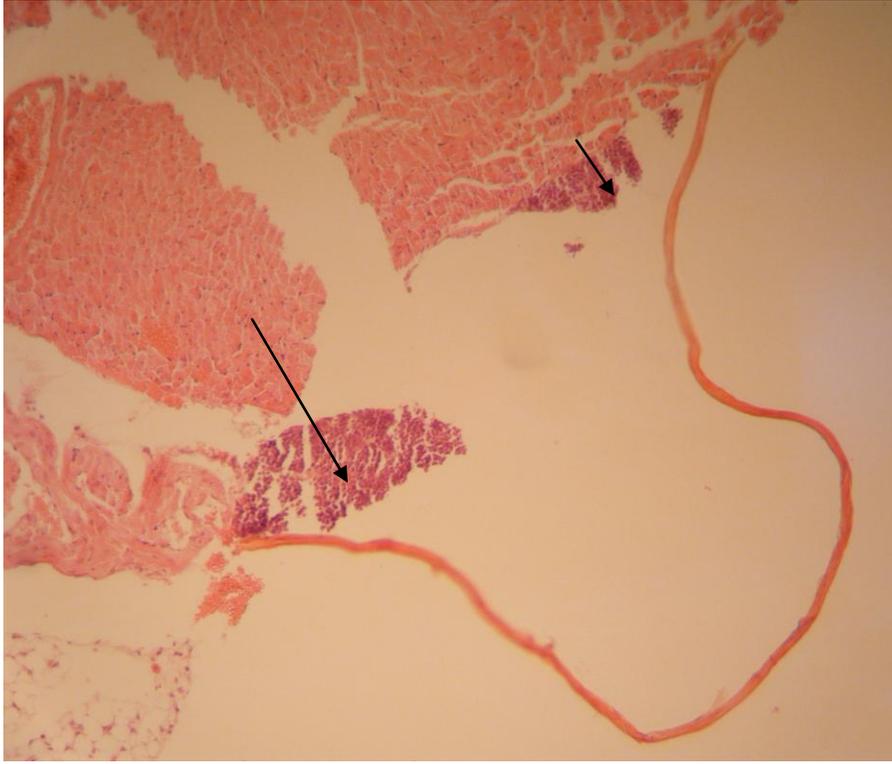


Figura 8. Zonas de infiltración leucocitaria con predominio en zonas del miocardio

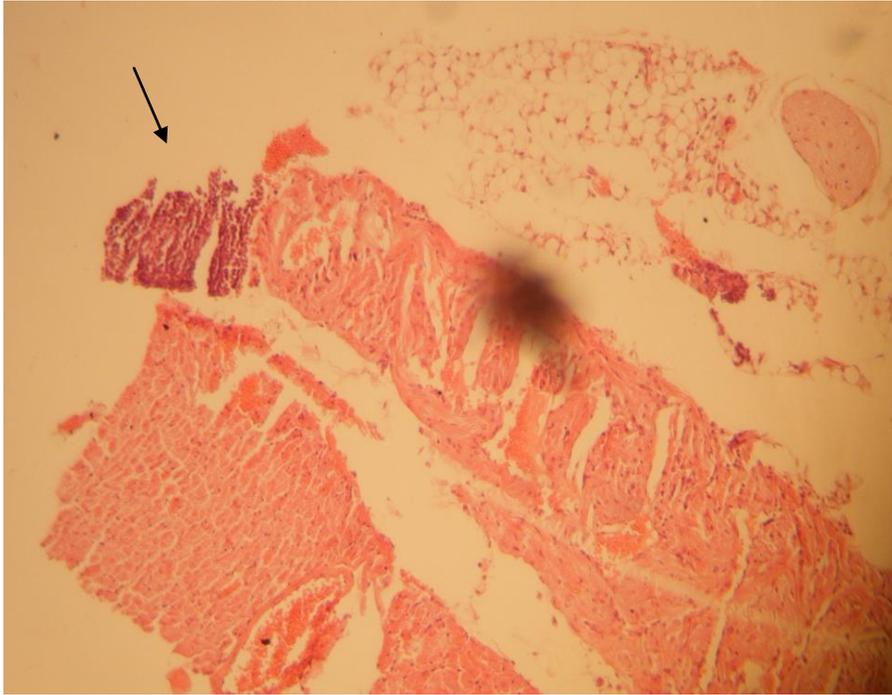


Figura 9. Zona de infiltración leucocitaria con predominio en zona del miocardio

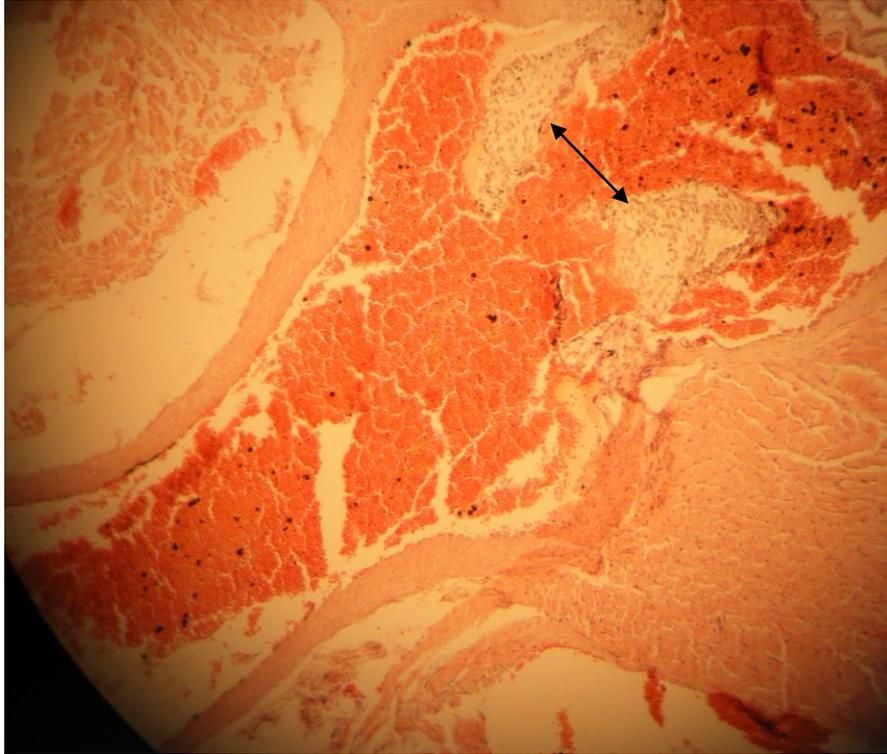


Figura 10. Presencia de necrosis en el miocardio

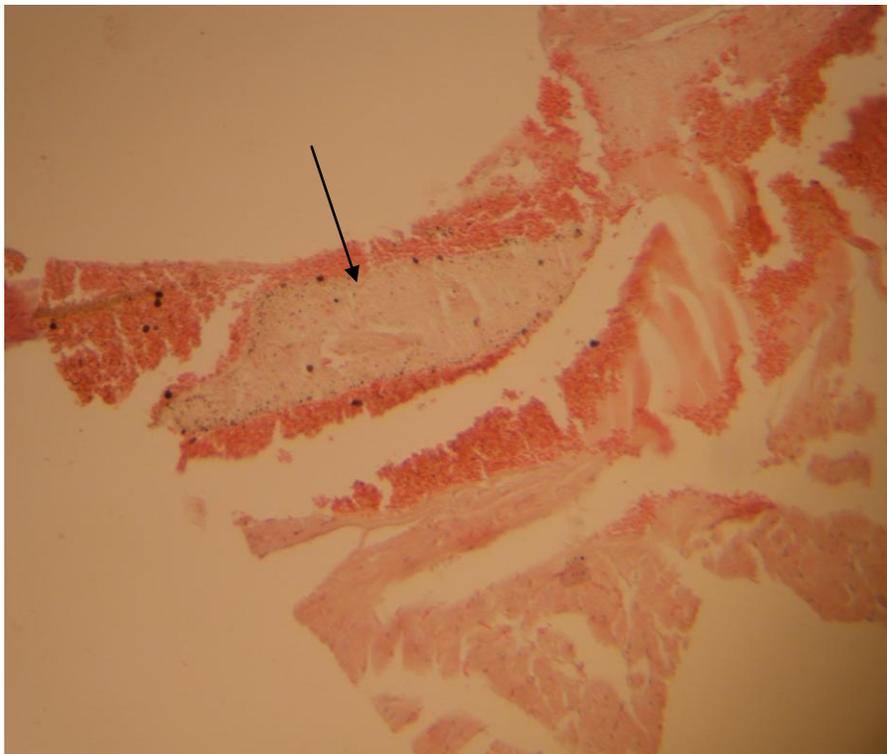


Figura 11. Presencia de necrosis en el miocardio

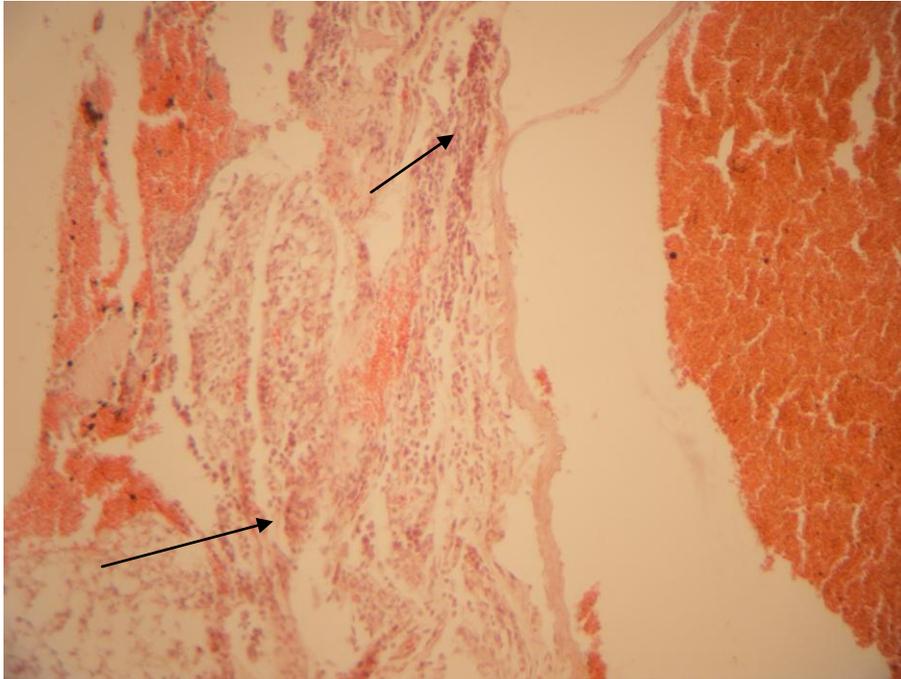


Figura 12. Zonas de infiltración leucocitaria con predominio en el endocardio

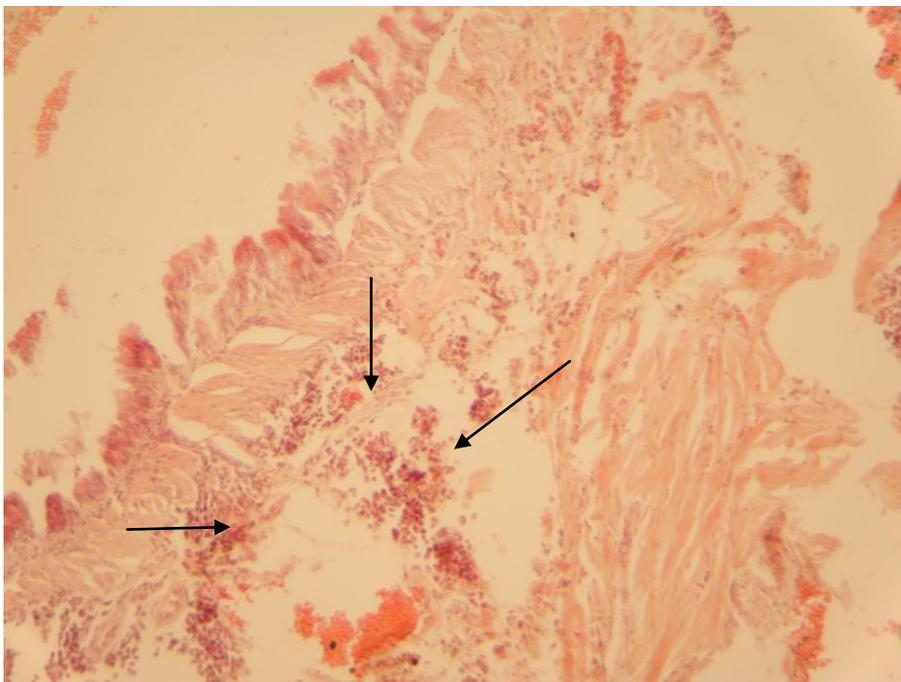


Figura 13. Zonas de infiltración leucocitaria con predominio en el endocardio

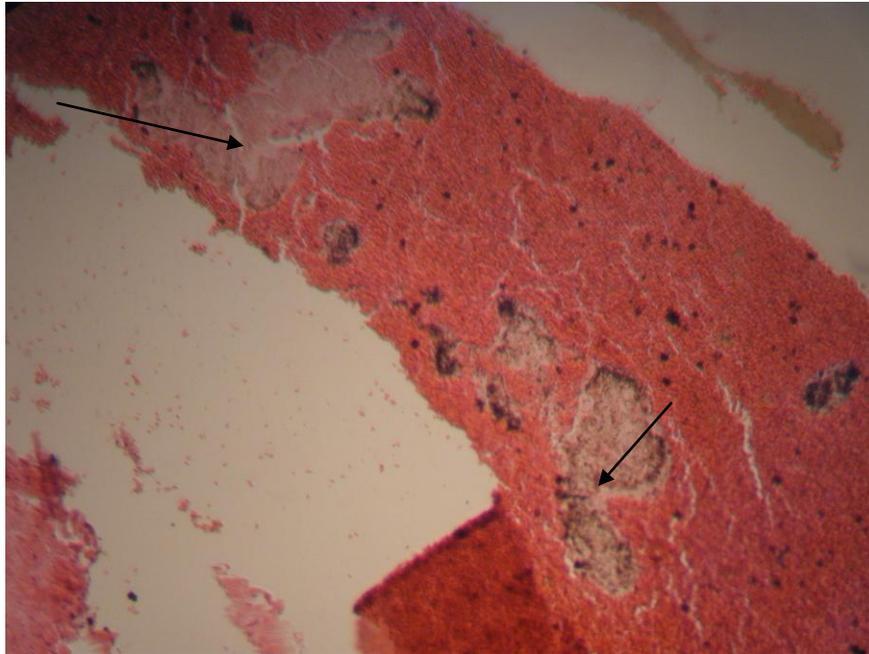


Figura 14. Zonas de necrosis en fibras musculares cardiacas

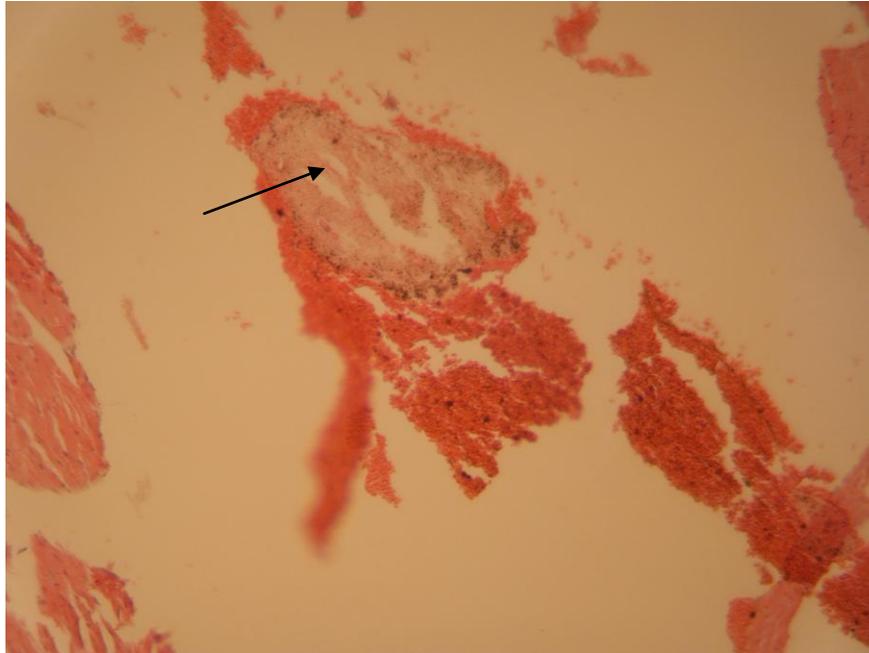


Figura 15. Zona de necrosis miocárdica

## 12.0 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Se realizó un análisis comparativo de medias a través de la prueba de t de Student con una confianza al 95% ( $\alpha= 0.05$ ) para cada una de las determinaciones.

En la determinación de ceruloplasmina se pudo observar que ésta se encuentra más elevada en los animales tratados con la planta en comparación al grupo testigo de ambos estudios, para el ensayo agudo (gráfica 6) se halló diferencia significativa entre los dos grupos, lo cual nos indica que los ratones tratados con *Thevetia peruviana* sufrían procesos inflamatorios; en cambio, en el ensayo subcrónico (gráfica 16) no existió diferencia significativa; dicho fenómeno se debe a que como la Ceruloplasmina es una proteína de fase aguda, sus concentraciones se elevan casi inmediatamente en el momento en que se está produciendo un proceso inflamatorio, y para el caso del ensayo subcrónico como la determinación de ceruloplasmina se realizó después de un mes del estudio, sus valores disminuyeron; probablemente si la valoración se hubiera realizado en las primeras semanas del ensayo, dichas concentraciones estarían significativamente elevadas en comparación con el grupo testigo.

En lo referente al caso de la determinación de la proteína C reactiva para el estudio de intoxicación subcrónica (gráfica 18), se esperaba que las concentraciones de ésta se elevaran de manera significativa en los ratones tratados con la *Thevetia peruviana*, debido a que en el ensayo de intoxicación aguda se encontró diferencia significativa en la prueba de ceruloplasmina, que, al igual que la proteína C reactiva, es un indicador de procesos inflamatorios, pero como sabemos que estas dos son proteínas de fase aguda, sus concentraciones se elevan en el momento inmediato al daño, en razón de que la proteína C reactiva se valoró al finalizar el ensayo subcrónico, es comprensible que su valores hayan disminuido.

Para las determinaciones de las enzimas TGO, TGP y LDH tanto en el ensayo agudo como en el subcrónico no se encontró diferencia significativa entre el grupo control y el tratado, lo que si se observa es que los niveles de estas tres enzimas se encuentran más elevados en los animales testigos. Al tomar en cuenta los valores del índice hepático para el ensayo subcrónico (gráfica 15) podemos decir que no hay presencia de daño en el hígado.

En lo que se refiere a las determinaciones de CK y CK-MB (gráfica 4 y 5) en el ensayo agudo no se encontró diferencia significativa entre los grupo; para el caso del ensayo subcrónico (gráfica 11 y 12) a pesar de que no hay diferencia significativa, los valores de ambas enzimas se encuentran más elevadas en el grupo tratado con la planta en comparación al grupo control. Estas determinaciones conjuntamente con el índice cardiaco, nos indican la ausencia de daño en este órgano, pero al observar los cortes histológicos de corazón pudimos ver que estaban presentes algunas zonas de necrosis en miocardio y endocardio al igual que infiltraciones leucocitarias, lo que nos hace concluir que las enzimas valoradas no sirven para señalar microinfartos.

En las determinaciones de peroxidación lipídica (gráfica 13) y nitritos (gráfica 17), no existe diferencia significativa entre los grupos, esto muestra que no se producen modificaciones en los valores de los radicales libres como consecuencia de la administración de la planta, por lo que el daño que presentaron los animales no fue debido a esto.

En los ensayos de toxicidad posterior a la administración se suele observar a los animales para poder visualizar efectos secundarios que se pudieran ocasionar por el consumo de la planta en estudio. Para el ensayo agudo a los 15 minutos de la administración se presentaba taquicardia que llegaba a durar hasta una hora, el resto del día su comportamiento fue modificado, ya que se mostraban agotados y permanecían la mayor parte del tiempo acostados. En el caso del ensayo agudo a los 15 minutos de la administración los animales tratados mostraban taquicardia, esta les duraba hasta una hora; el resto del día se mostraban muy cansados, por lo cual permanecían acostados la mayor parte del tiempo. A los 15 días comenzaron a sufrir temblores debajo de los ojos y en la mandíbula, también se observó que la taquicardia ya no era tan fuerte y su duración era menor que al inicio del estudio, esto nos indica que los ratones llegaron a tener un proceso de tolerancia a la dosis de 50 mg/ Kg del extracto de la *Thevetia peruviana*, estos efectos secundarios se mostraron durante el resto del ensayo; un día antes de sacrificar a los ratones, un espécimen mostró temblores generalizados, ataxia, taquicardia severa y problemas en la marcha. En el grupo control, los ratones presentaron heridas en la espalda debidas a que los animales empleados fueron machos y estos son muy territoriales, por lo cual se atacan al estar mucho tiempo enjaulados. Este comportamiento no se observó en el grupo tratado, ya que la taquicardia los agotaba y el resto del día se encontraban durmiendo.

En lo que respecta al efecto adelgazante el ensayo agudo, al finalizar el estudio el grupo control subió de peso, mientras que el grupo tratado tuvo una disminución de peso importante (10 g), esto nos indica que una dosis única de 100 mg/ Kg tiene efecto adelgazante. Para el ensayo subcrónico se observó que el grupo tratado al inicio del estudio comenzó a perder peso de manera muy rápida, pero al llegar los 15 días del ensayo, los animales fueron recuperando el peso perdido. Al finalizar el estudio ambos grupos habían aumentado de peso, pero en el caso del grupo tratado el aumento de peso fue menor que en el grupo control. Esto nos indica que una dosis diaria de 50 mg/ Kg no tiene una acción adelgazante.

Al conjuntar todas las pruebas podemos determinar que el efecto adelgazante no es efectivo en personas que emplean una dosis fija por un tiempo largo, ya que se lleva a cabo un proceso de tolerancia a la dosis empleada; también podemos indicar que la planta produce más efectos dañinos que beneficiosos para la salud por lo que no se recomienda su uso.

## 13.0 CONCLUSIONES

El efecto adelgazante de la *Thevetia peruviana* es conocido ampliamente y su uso indiscriminado ha causado diversos problemas en la población que consume la infusión de esta planta por lo que se concluye que se logró inducir una intoxicación aguda y subcrónica con el extracto de *Thevetia peruviana* en un modelo animal con ratones CD1; se pudo determinar la presencia de un proceso inflamatorio agudo con la ayuda de las determinaciones de ceruloplasmina y PCR en ambos estudios.

Con las determinaciones de las enzimas CK, CK-MB y LDH conjuntamente con el índice cardiaco no se logró valorar la presencia de las zonas de necrosis del tejido cardiaco, así como las infiltraciones leucocitarias, por lo cual la realización de los cortes histológicos de corazón resultaron de suma importancia en este estudio para valorar el daño de dicho órgano.

Con los valores obtenidos de las enzimas AST, ALT y el índice hepático podemos concluir que no existe daño en hígado debido a la administración de *Thevetia peruviana*.

Así mismo se observó que no existe daño celular por la presencia de radicales libres con base a los resultados obtenidos en las determinaciones de nitritos y peroxidación lipídica.

Se constató que en los animales empleados en el ensayo subcrónico se produce un fenómeno de tolerancia, ya que al consumir constantemente la misma dosis por un período prolongado el efecto va disminuyendo.

Por otra parte los grupos tratados con la planta *Thevetia peruviana* mostraron una modificación en su comportamiento normal, disminuyendo su actividad física.

## **14.0 SUGERENCIAS**

- Realizar estudios de intoxicación crónica, ya que como se observó en los resultados, las enzimas hepáticas comenzaron a elevarse, esto nos indica que probablemente al aumentar el tiempo de ingesta se podrá observar daño hepático.
- Determinar perfil renal, para valorar el estado del riñón.
- Estudios teratogénicos
- Efectos antiparasitarios
- Considero importante que el estudio de plantas utilizadas con fines terapéuticos debe tener mayor difusión y continuidad para mantener a la población informada sobre el beneficio y daño relacionado al empleo de cada una de las plantas medicinales.

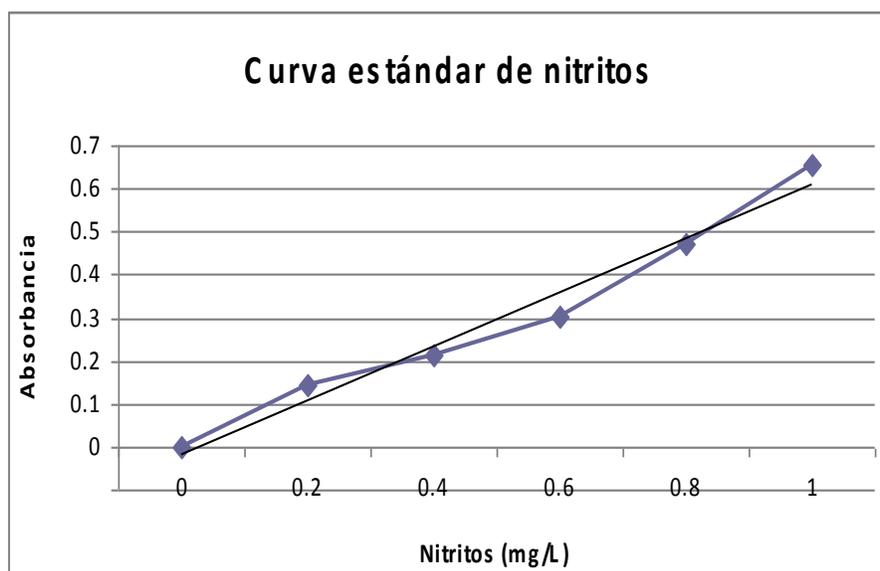
## 15.0 ANEXO

### 15.1 Tablas y Graficas de curvas estándar

#### 15.1.1 Determinación de Nitritos

Tubo	Estándar (μL)	Agua destilada (μL)	Absorbancia	Concentración
1	0	900	0	0
2	100	800	0.143	0.2
3	200	700	0.231	0.4
4	300	600	0.301	0.6
5	400	500	0.471	0.8
6	500	400	0.657	1.0

Cuadro 23. Curva patrón. Concentración del estándar 20mg/dl de Nitrito de sodio

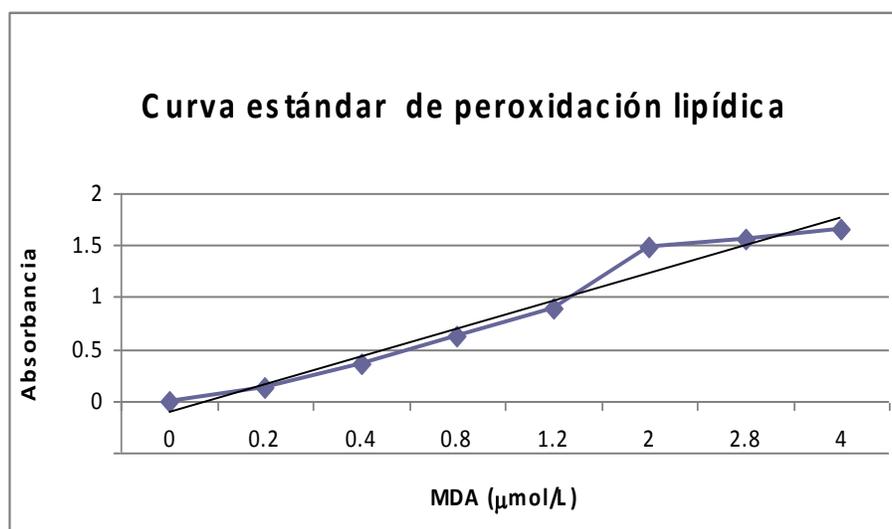


Gráfica 20. Curva estándar de nitritos

#### 15.1.2 Determinación de Peroxidación Lipídica (MDA). Método de TBA (Ácido Tiobarbiturico)

Tubos	MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	TMP ( $\mu\text{L}$ )	$\text{H}_3\text{PO}_4$ ( $\mu\text{L}$ )	TBA ( $\mu\text{L}$ )	Agua ( $\mu\text{L}$ )	Absorbancia	Concentración
B	0	0	600	200	200	0	0
1	0.2	5	600	200	195	0.133	0.2
2	0.4	10	600	200	190	0.364	0.4
3	0.8	20	600	200	180	0.622	0.8
4	1.2	30	600	200	170	0.892	1.2
5	2.0	50	600	200	150	1.488	2.0
6	2.8	70	600	200	130	1.564	2.8
7	4.0	100	600	200	100	1.659	4.0

Cuadro 24. Curva patrón. Concentración del estándar de MDA para peroxidación lipídica.



Gráfica 21. Concentraciones estándar de MDA para peroxidación lipídica

## 16.0 REFERENCIAS

- 1) COFEPRIS alerta ante productos para bajar de peso [serial online]. 2009 [cited 2009 Aug 26] Available from: [www.eleconomista.com](http://www.eleconomista.com)
- 2) Martinez M. Las plantas medicinales de México. 6ª ed. México: Ediciones Botero; 1967; pp.73-76.
- 3) Gonzalez Aular, Peña M, Perez Agreda, Diaz M. Intoxicación por la administración de tabletas de *Thevetia peruviana* como tratamiento para bajar de peso: presentación de un caso. Rev. Toxicol. 2003; 20: 221-223.
- 4) Senado de la Republica.Dictamen con punto de acuerdo en relación con la venta y consumo de suplementos alimenticios. Gaceta del Senado. 2008; 26.
- 5) Margni R. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. Quinta edición. Buenos Aires: Panamericana; 1996; pp. 435.
- 6) Verganulle N. The inflammatory response. Drug development research. 2003; 59: 375- 381
- 7) Proceso inflamatorio [serial online] Available from: <http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>
- 8) Roitt IM, Delves PJ. Inmunología. Fundamentos. Decima edición. Argentina: Editorial Médica Panamericana;2003: p. 2-9,17, 282-286.
- 9) Parslow T, Stites D, Terr A, Imboden J. Inmunología básica y clínica. Decimal edición. México: Editorial el manual moderno;2002: pp. 29-32
- 10) Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. Quinta edición. México: Editorial Mac Graw Hill; 2004: pp. 231.
- 11) Regeiro GJR, López LC, González RS, Martínez NE. Inmunología. Biología y patología del sistema inmune. Tercera edición. Madrid: Editorial panamericana; 2003: pp.131.
- 12) Roderick NM, Mac Sween, Whaley K. Patología de Muir. 13 a edición. México: Editorial Interamericana- Mc Graw Hill; 1995: pp. 92-121.
- 13) Aaronson PI, Ward PT. El sistema cardiovascular en esquemas. Editorial Ars. España: Medica; 2001: pp. 1-2, 22-28, 34.
- 14) Espino J. Introducción a la cardiología. Decimo tercera edición. México: El manual moderno;1997: pp. 23-57.
- 15) Ruesga Z, Eugenio A. Cardiología.México: Editorial el manual moderno; 2005: pp.9-23, 63-69.
- 16) Romeshan Sunthareswaran. Lo esencial en sistema cardiovascular. Curso- crash- De Mosby. Madrid: Editorial Harcourt Brac;1999: pp.3-30.
- 17) Masnatta LD, Fischer PA. Marcadores de estrés oxidativo. Rev. Fed Arg Cardiol. 2003; 32: 177- 183.
- 18) Ortega JC. Síndromes coronarios agudos en las eras de las troponinas. Medicina intensiva. 2003; 23(8): 538-40.
- 19) Higashida B. Ciencias de la salud. Cuarta edición. México: Mc Graw Hill; 2001: p. 155-156.
- 20) Das D, Trapyal N, Goswami SK, Fox PL, Mukhopadhy CK. Regulation of ceruloplasmin in human hepatic cell by redox active copper: identification of a novel AP-1 site in the ceruloplasmin gene. Biochem J.2007; 402: 135-141.
- 21) Martínez S, Tecles F, M. Parra d, Cerón JJ. Proteínas de fase aguda: conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinara. AN. VET. 2001; 17: 97-114.
- 22) Yapur VM, Bustos FM, Gonzalez AS, Negri GA. Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa. Acta de bioquímica clínica Latinoamericana. 2007 3(41): 347- 351.

- 23) Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. Inmunología. Inmunología de la memoria. Quinta edición. Editorial Mac Graw Hill, México, 2004: pp.152-224, 371.
- 24) [Bautista JJavier](#). Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo. Gac Méd Méx. 2004; 140: 28-30.
- 25) Geo B, Janet B, Stephen M. Microbiología medica de Jawetz, Melnick, Adelberg. 22ª edición. México: El manual moderno; 2002: pp.252-264.
- 26) Kenneth JRC. Ryan GRK, Ray CG. Microbiologia medica. Cuarta edición. Toronto: Mc Graw Hill; 2005: pp.314-316.
- 27) Lehninger L. Bioquímica. Las bases moleculares de la estructura y función celular. 2ª ed. Barcelona, España: Ediciones Omega. S. A; 1995: pp.161-185.
- 28) Centelles JJ, Esteban C, Imperial S. Óxido nítrico, un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. OFFARM. 2004, 11(23).
- 29) Suarez MPJ. Liberación de óxido nítrico inducida por el flujo sanguíneo. Arch Inst. Cardiol. Mex. 2000, 70: 197-202.
- 30) Robbins S L, Vinoy K, Ramzi S C. Patología estructural y funcional. México: Interamericana-Mc Graw- Hill; 2000.
- 31) Bucala R, Cerama A. Advanced glycosilation: chemistry. Biology and implication for diabetes and aging, Adv pharmacology. 1992:231- 34.
- 32) Stites PD, Terr IA. Inmunología básica y clínica. México: Editorial manual moderno; 1994.
- 33) [www.portalesmedicos.com](http://www.portalesmedicos.com)
- 34) [www.biotechnicaltda.com](http://www.biotechnicaltda.com)
- 35) Klaassen CD Toxicology. The basic science of poisons. Seventh edition. New York: Mc Graw Hill. Medical Publishing Division; 2008: pp.485, 699, 1103.
- 36) Técnicas histológicas. [Serial online]. Available from: [www.dermato101.com.ar/tecnica.pdf](http://www.dermato101.com.ar/tecnica.pdf)
- 37) histológicas. [Serial online]. Available from: [www.elergonomista.com](http://www.elergonomista.com)
- 38) Técnicas histológicas. [Serial online]. Available from: [servet.uab.es/histologia/docencia/.../T1index.html](http://servet.uab.es/histologia/docencia/.../T1index.html)