



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO TÓXICO DEL  
FRUTO DE CODO DE FRAILE MEDIANTE  
MARCADORES ENZIMÁTICOS EN UN  
MODELO DE RATÓN**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

**LORENZO ANTONIO TORRES BARRIENTOS**

DIRECTOR DE TESIS: Q. CARLOS SALVADOR VALADEZ SÁNCHEZ

ASESOR DE TESIS: M. en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR  
PRESENTE.

Comunico a usted que el alumno TORRES BARRIENTOS LORENZO ANTONIO  
con número de cuenta 40109134-6 de la carrera de Q. F. B.  
se le ha fijado el día 07 del mes de Mayo de 2012 a las 15:00 hrs.,  
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes  
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	Q. F. J. ESTELA VALENCIA PLATA	
VOCAL	Q. CARLOS SALVADOR WALÁDEZ SÁNCHEZ	
SECRETARIO	M. en C. RODOLFO CARREÓN SÁNCHEZ	
SUPLENTE	DRA. RAQUEL RETANA UGALDE	
SUPLENTE	M. en C. MA. TERESA GRISELDA FUENTES LARA	

El título de la tesis que se presenta es: **Evaluación del Efecto Tóxico  
del Fruto de Codo de Fraile Mediante Marcadores Enzimáticos en un Modelo de Ratón**

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a 18 de abril de 2012.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ  
DIRECTOR

DIRECCIÓN

RECBI  
DIRECCIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES  
Y DE GRADO

W. B.   
DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRÍGUEZ  
JEFE DE LA UNIDAD DE Q. F. B.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco muy sinceramente a mi director de tesis, el Q. Carlos Salvador Valadéz Sánchez por toda la paciencia, el apoyo y toda la dedicación mostrada para la realización de este trabajo.

A mi asesor de tesis el M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez, por todo el apoyo brindado en este trabajo, la paciencia y el tiempo brindado.

Al Dr. Rubén Marroquín Juárez por todo el apoyo brindado, el asesoramiento, las revisiones y el tiempo dedicado a este trabajo de tesis, así como permitirme formar parte de su trabajo.

Al Q.F.B. Armando Ramírez González por su apoyo y asesoría en este proyecto.

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

A la M. en C. Abigail Aguilar Contreras por la clasificación de la muestra de codo de fraile. Jefa del herbario nacional Centro Médico Siglo XXI.

Al M. en C. Ricardo Calvillo Esparza por su asesoramiento en este proyecto

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

A los miembros del jurado:

Q.F.I. Estela Valencia Plata

Dra. Raquel Retana Ugalde

M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara

Ya que con sus observaciones, comentarios, sugerencias y tiempo dedicado a la revisión de este trabajo permitieron el enriquecimiento del mismo.

A mis compañeros de la facultad y amigos de laboratorio, por todas las experiencias agradables compartidas.

A esa gran institución que es la Universidad Nacional Autónoma de México y a mis profesores quienes me han forjado como un profesional en mis estudios de licenciatura.

## **DEDICATORIAS**

### ***A Dios.***

Gracias padre mío. Gracias porque, la FÉ y la FORTALEZA que me brindaste me permitieron salir adelante a lo largo de mi carrera, gracias por habitar en mi vida como un átomo de luz que nunca se apagó porque siempre estuviste cuando te necesité, gracias por los aciertos y desaciertos que tuve en mi estancia estudiantil, gracias por enseñarme a crecer espiritual, personal y profesionalmente, solo tú me has permitido llegar hasta donde me encuentro actualmente, gracias por permitirme concluir un círculo más en mi vida que es la titulación.

### ***A mis padres.***

Gracias a mi madre la Sra. María Juliana Barrientos Nava, que desde los cielos siempre me guiaste en un camino certero. Gracias a mi padre el Sr. Lorenzo Torres Martínez, gracias papá y mamá por ser mi máxima inspiración personal y profesional. Gracias por ser el pilar de mi vida, gracias por educarme de tal manera que los valores que me impusieron de niño siempre me permitieron crecer hasta el lugar que ustedes tanto soñaron.

### ***A mis hermanos y sobrinos***

A mis hermanos de sangre, Marisela Torres Barrientos, José A. Vázquez Tenorio. A mis sobrinos Ian Fernando y Ángelo Dante. Gracias por su incondicional apoyo y ayuda en todo momento.

### ***A mi familia y amigos***

A la familia Torres y la familia Barrientos, A mis amigos y hermanos Francisco Javier Caballero Soriano, José Emanuel Armas Pérez, todos y cada uno de ellos han creído siempre en mí, pues me han enseñado a crecer cada día de mi vida, de todo corazón les agradezco infinitamente.

A mi hermana Graciela, Teresita, Belén, Gina e Ignacio Saanza, que siempre corrigen mis pasos, me dan consejos, palabras de aliento y ánimo cuando más lo necesito.

A Paulina Barrientos García, que donde quiera que estés, te agradezco por los valores que me enseñaste, la tenacidad y el valor de salir adelante y en especial por ver ocupado un lugar en mi vida.

Finalmente agradecer a todas aquellas personas que faltaron por mencionar, pero que siempre creyeron en mí.

*Aunque pase por el más oscuro de los valles,*

*No temeré peligro alguno,*

*Porque tú, señor, estás conmigo;*

*Tu vara y tu bastón me inspiran*

*Confianza.*

*Salmo 23;4*

## CONTENIDO

<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b>	1
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>3.</b>	<b>MARCO TEÓRICO</b>	4
	3.1 Enfermedades cardiovasculares	4
	3.2 Obesidad	4
	3.2.1 Obesidad como problema de salud pública	5
	3.2.2 Posibilidades terapéuticas en la obesidad	6
	3.2.3 Fármacos empleados en la obesidad	7
	3.3 Los productos naturales como solución a un problema de obesidad	7
	3.4 Codo de fraile ( <i>Thevetia thevetioides</i> )	8
	3.4.1 Casos de intoxicación por codo de fraile	9
	3.4.2 Nombres comunes y características botánicas	9
	3.5 Toxicología	10
	3.5.1 Definición	10
	3.5.2 Métodos de evaluación toxicológica	11
	3.5.3 Modelos experimentales	12
	3.5.4 Procedimientos generales de evaluación toxicológica	12
	3.5.5 Ensayos de toxicidad	13
	3.5.6 Marcadores enzimáticos	14
<b>4.</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	15
<b>5.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	17
<b>6.</b>	<b>OBJETIVOS</b>	18
<b>7.</b>	<b>DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	19
<b>8.</b>	<b>MÉTODOS</b>	20
	8.1 Extracto acuoso del fruto de codo de fraile; Recolección e identificación	20
	8.2 Modelo de toxicidad aguda	20
	8.3 Índices hepático, cardiaco, esplénico y renal	21
	8.4 Técnicas histológicas	21
	8.5 Perfiles cardiaco, hepático y renal	21
	8.6 Fundamento de las técnicas empleadas para determinar marcadores y enzimas	22
	8.7 Determinación de nitritos	25
	8.8 Determinación de peroxidación lipídica (MDA), método de TBA (ácido tiobarbitúrico)	27
	8.9 Estudio estadístico	28
<b>9.</b>	<b>RESULTADOS</b>	29

9.1	Comportamiento	29
9.2	Resultados de los valores enzimáticos y marcadores	30
9.3	Resultados de los índices cardíaco, hepático, renal y esplénico	31
9.4	Disminución de peso en los ratones	31
9.5	Cortes histológicos	32
<b>10.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>34</b>
<b>11.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>37</b>
<b>12.</b>	<b>SUGERENCIAS</b>	<b>38</b>
<b>13.</b>	<b>ANEXO</b>	<b>39</b>
13.1	Reactivos, equipos y material	39
13.2	Tablas y graficas de curvas estándar	41
13.2.1	Determinación de nitritos	41
13.2.2	Determinación de peroxidación lipídica (MDA), Método de TBA (Acido tiobarbitúrico)	42
<b>14.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>43</b>

## ABREVIATURAS

AST	Aspartato aminotransferasa
ALT	Alanina aminotransferasa
CK-MB	Creatincinasa isoenzima
°C	Grados centígrados
G-6-PDH	Glucosa-6-Fosfatodeshidrogenasa
HK	Hexoquinasa
Kg	Kilogramo
LDH	Deshidrogenasa lactica
MDA	Malondialdehído
µg	Microgramo
µL	Microlitro
MDH	Malatodeshidrogenasa
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Normal
NAD	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma reducida
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato es un forma reducida
NED	N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato
nm	Nanómetros
PBS	Solución buffer de fosfatos
Rpm	Revoluciones por minuto
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TGO	Transaminasa Glutamicoxalacetica
TGP	Transaminasa Glutamicopiruvica
TMP	1,1,3,3-tetrametoxipropano
SNC	Sistema Nervioso Central
ADN	Acido desoxirribonucleico
i.v.	Intravenoso
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
s.c.	Subcutáneo
ECG	Electrocardiograma
BHT	Butilhidroxitolueno
NaCl	Cloruro de sodio

## 1. RESUMEN

Se evaluó el efecto tóxico del fruto de codo de fraile (*Thevetia thevetioides*), induciendo una intoxicación aguda (80 mg/Kg); a un grupos de ratones CD1 de 1 mes de edad y 20-30 g de peso, por administración oral.

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, los marcadores renales, Urea y Creatinina, y las enzimas cardiacas, CK-MB y LDH; así como el índice esplénico, hepático, renal y cardiaco 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 el índice esplénico, cardiaco, renal y creatinina, así como una disminución importante de peso para el grupo tratado (10 g). Por lo que los resultados obtenidos con las dosis manejadas no producen daño hepático, pero si afectan el bazo, riñón y corazón, produciendo microinfartos.

## 2. INTRODUCCIÓN

En México, desde tiempos prehispánicos se estableció una fuerte tradición en el uso de plantas medicinales, de tal forma que varias especies vegetales con fines terapéuticos constituyen un rasgo cultural de la sociedad mexicana.<sup>1</sup> Actualmente se tiene el registro de 1024 especies vegetales usadas con fines terapéuticos. Sin embargo la mayoría no poseen estudios químicos o farmacológicos que avalen las propiedades que se les atribuyen en la medicina tradicional. Esto explica porque en ocasiones los resultados obtenidos de su uso no sean satisfactorios.<sup>2</sup>

La obesidad constituye la principal manifestación de sobrepeso y está implicada en la aparición de las complicaciones que se presentan asociadas con la enfermedad. Estas consisten en un heterogéneo grupo de disfunciones clínicas que afectan el sistema cardiovascular, el corazón, el riñón y el hígado.<sup>3,4</sup>

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, entre otros.), sin ninguna supervisión médica poniendo en riesgo la salud e incluso la vida.<sup>4</sup>

Una de las especies mayormente utilizada como adelgazante es el codo de fraile, donde el fruto se usa para curar padecimientos bucales como el dolor de muelas y las caries, en su forma de semilla es utilizada por sus efectos, en el tratamiento de hemorroides, como antiparasitario, abortivo, anticarcinogénico, candidicida, antiviral, antifertilizante, cardiotónico.<sup>5</sup>

Por lo anterior con el objeto de evaluar el efecto tóxico del fruto de codo de fraile, se utilizó un modelo de ratón CD 1, encontrando que los ratones evaluados presentaron una severa toxicidad, generando un desorden fisiológico y daño en órganos diana del ratón, es importante considerar que los productos naturales juegan un rol muy importante en la salud si no se conoce la toxicidad de una

especie como es el codo de fraile que se comercializa de manera indiscriminada y sin la regulación sanitaria correspondiente.

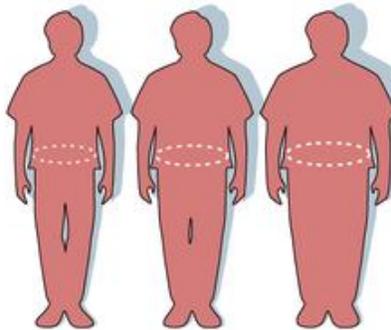
No existen datos recientes sobre un estudio toxicológico del fruto de codo de fraile, por esta razón esta investigación se centró en contribuir con más datos sobre esta especie.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares ocupan uno de los primeros lugares de mortalidad en México y el mundo, estos padecimientos producen alrededor de 70 mil fallecimientos al año, entre las que destacan la obesidad, insuficiencia cardíaca, accidente cerebro-vascular, enfermedad de la arteria coronaria, condición común, costosa, incapacitante y potencialmente mortal.<sup>1</sup>

Una enfermedad cardiovascular que afecta en mayor proporción a la población mundial es la obesidad (figura 3.1), enfermedad crónica de origen multifactorial que se caracteriza por la acumulación excesiva de grasa o hipertrofia general del tejido adiposo en el cuerpo.<sup>6</sup>



**Figura 3.1 Siluetas representando saludable, sobrepeso, y obeso. Tomado de: Haslam<sup>6</sup> 2005.**

#### 3.2 Obesidad

La obesidad forma parte de un síndrome metabólico siendo un factor de riesgo conocido, es decir predispone, para varias enfermedades, particularmente enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2, apnea del sueño, osteoartritis, así como algunas formas de cáncer, padecimientos dermatológicos y gastrointestinales.<sup>6</sup>

La mayoría de los tipos de obesidad y en muchos pacientes la etiología es múltiple. Una gran parte de esta afección se debe a la disfunción de otros órganos distintos al corazón, como los riñones y el hígado.<sup>7</sup>

En América latina, la prevalencia de la obesidad ha aumentado considerablemente en todos los grupos sociales, particularmente en aquellos de bajo nivel socioeconómico, las mujeres en edad reproductiva y los niños menores de 5 años.<sup>8</sup>

Los reportes de la Organización Mundial de la Salud, marcan que a nivel global existen unos 250 millones de personas obesas, es decir, un 7 % de la población mundial. En México el 31.8 % de la población mayor de 15 años, según informes de la OMS, 2009, presenta sobrepeso.<sup>4</sup>

### **3.2.1 Obesidad como problema de salud pública**

La obesidad es un gran problema de salud pública por el impacto que tiene en la calidad de vida en las etapas productivas de las personas y está alcanzando proporciones epidémicas en algunos países (Inglaterra, Estados Unidos, China, México, entre otros). La prevalencia de la obesidad en México, al igual que en el resto del mundo, se ha incrementado en forma importante en la última década y es considerada como un problema de salud pública e incluso es calificada como una epidemia.<sup>3</sup>

A partir de la primera mitad del siglo XX, han sucedido una serie de transiciones en el país. Antes, la población rural del país era del 75 al 80 % del total y la urbana era solo del 20 al 25 %. Para la mitad del siglo XX esta situación se había invertido y cuando mucho el 20 % de los habitantes del país aún vivían en zonas rurales. La urbanización conlleva a cambios en el estilo de vida, sobre todo en dos grandes variantes: la sedentarización de las actividades humanas y la segunda es en el patrón de alimentación en donde la obesidad está dada fundamentalmente por el estilo de vida.

El elevado crecimiento de padecimientos infecciosos como causas de muerte por los problemas crónicos degenerativos, está íntimamente relacionada con la obesidad en el perfil de salud de la población mexicana, dado que es un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 y algunos tumores malignos.<sup>9, 10</sup>

La obesidad en sí misma debe ser considerada una enfermedad y un factor de riesgo para numerosas enfermedades. Es uno de los factores de riesgo más importante para la hipertensión. La obesidad aumenta el tono simpático, lo que se traduce como aumento en la resistencia vascular. El aumento en el tono simpático incrementa la resistencia a la insulina. El aparato circulatorio es uno de los sistemas más afectados en los pacientes obesos por las repercusiones hemodinámicas derivadas del aumento de volumen y peso: Existen mayores requerimientos para el aumento en el gasto cardíaco, también pueden encontrarse disfunciones sistólica, diastólica, la enfermedad micro y macro vasculares contribuyen a la disfunción cardíaca izquierda.<sup>3, 11</sup>

Se trata de un problema de salud pública de gran magnitud, que tiene ya implicaciones económicas y sociales mucho más grandes que las sospechadas pero, aún más, su impacto en la salud del mexicano en el futuro mediano, con toda seguridad, será mayor. No hay duda de que el costo económico que implica una enfermedad como la obesidad, ocupa una gran proporción de los recursos dedicados a las campañas de salud.

### **3.2.2 Posibilidades terapéuticas en la obesidad**

En la actualidad el tratamiento médico de la obesidad tiene como objeto:

- a) La reducción del peso y no el de alcanzar una figura estereotipada, basada en una modificación de la conducta alimentaria.
- b) Aumentar la capacidad funcional del paciente.
- c) Prevenir o retrasar el deterioro de la función cardiovascular, mejorar la actividad de vida y prolongar la vida del paciente.

### **3.2.3 Fármacos empleados en la obesidad**

De particular utilidad, el tratamiento farmacológico de apoyo, en especial para reducir el apetito, puede determinar la diferencia. Los supresores del apetito tienen una clara indicación en pacientes con sobrepeso que va de 20 a 30 % y su administración debe ser continua. La mayoría son estimulantes y/o aumentan los niveles efectivos de serotonina. Algunas han sido retiradas del mercado por sus efectos colaterales en la esfera cardiológica y pulmonar, en especial las valvulopatías. En términos generales, no se recomienda el tratamiento farmacológico por más de un año y deben observarse las restricciones para su uso.<sup>12</sup>

Existe otra generación de medicamentos que bloquea la absorción de lípidos sin que afecte el vaciamiento gástrico o la motilidad vesicular. El Orlistat es un inhibidor selectivo de la lipasa gástrica y pancreática. La inhibición que produce bloquea la hidrólisis de los triglicéridos en la dieta y como consecuencia, la absorción de ácidos grasos y monoglicéridos previniendo la digestión y absorción de hasta 30 % de la grasa ingerida.<sup>13</sup>

### **3.3 Los productos naturales como solución a un problema de obesidad**

Por otra parte la población mexicana ha recurrido al uso de las plantas medicinales como una alternativa a la solución de sus problemas de obesidad, en México se ha acrecentado de manera alarmante, lo cual ha ocasionado que las personas recurran a este tipo de medicina alterna con tal de mejorar su apariencia y usen de manera indiscriminada esta práctica.

Desde tiempos prehispánicos se estableció una fuerte tradición en el uso de plantas medicinales, de tal forma que el uso de especies vegetales con fines terapéuticos constituye un rasgo cultural de la sociedad mexicana.<sup>14</sup>

La mala difusión o información con que los consumidores recurren a la medicina tradicional, entre otras cosas, ha ocasionado que la gente practique con mayor frecuencia esta actividad, generando que el empleo de estas tradiciones sean aplicados de manera indiscriminada ya sea en forma de cataplasma, infusiones o en forma de productos procesados y sin tomar en cuenta el alto riesgo que implica el consumo de los productos naturales para su salud.

La mayoría de los productos naturistas comercializados en el país no poseen estudios toxicológicos que avalen las propiedades que se les atribuyen en la medicina tradicional. Esto explica que en ocasiones los resultados obtenidos de su uso no sean satisfactorios.<sup>2</sup>

### **3.4 Codo de fraile (*Thevetia thevetioides*)**

El fruto de codo de fraile es una especie muy utilizada por la medicina tradicional ya que se emplea en el tratamiento de afecciones en la piel, se usa para curar padecimientos bucales como el dolor de muelas y las caries, en su forma de semilla es utilizada por sus efectos, en el tratamiento de hemorroides, como antiparasitario, abortivo, anticarcinogénico, candidicida, antiviral, pesticida, cardiotónico y más recientemente como tratamiento para bajar de peso; sin embargo hay evidencia de que esta especie contiene activos que actúan a nivel cardiaco provocando taquicardias y está siendo utilizada por gente mal informada con el objeto de controlar la obesidad a riesgo de sufrir, incluso, hasta la muerte.<sup>5,15</sup>

### 3.4.1 Casos de intoxicación por codo de fraile

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 codo de fraile, esta situación ha alarmado a las autoridades sanitarias; la COFEPRIS realiza operativos en mercados de todo el país con el fin de retirar los productos “milagro” que contienen como principio activo *Thevetia* y hace un llamado constante (aunque insuficiente) a la población para que no consuma dicha especie 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>16</sup>

*Thevetia thevetioides* es una especie toxica, sin embargo existen otras especies como la *Thevetia peruviana*, la *Thevetia nerifolia* y la *Thevetia Cervera*,<sup>38,39,40,41</sup> que reportan manifestaciones de toxicidad tan importantes como la estudiada en el presente trabajo.

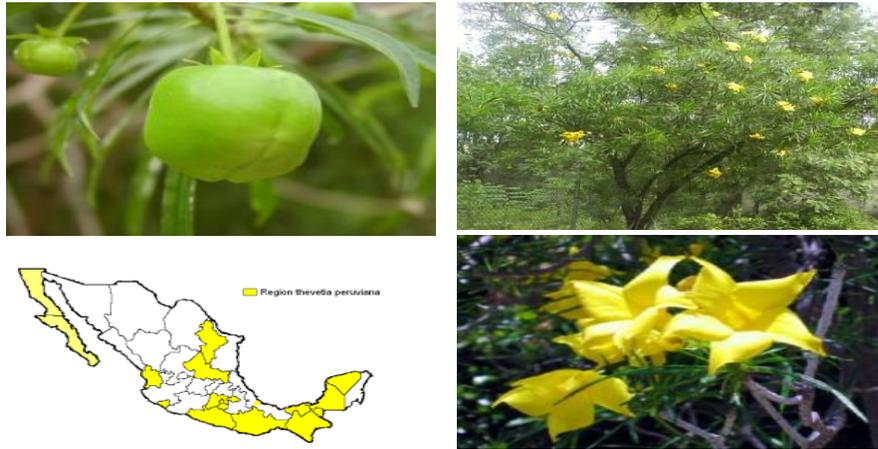
### 3.4.2 Nombres comunes y características botánicas

El codo de fraile tiene numerosos nombres comunes, en México los más conocidos son: Codo de fraile, gorro de obispo, yoyote, ayoyote, alcanfura, carnè, campanilla, cojòn de gato, chilca, flor de campana, guayapol, guayocule, venenillo, anís, chavaquìn, calaveritas, cobalonga, rejalgar, canchule.

La semilla y el fruto de codo de fraile proviene de árboles de entre 3 y 8 metros de altura (figura 3.2), con flores amarillas agrupadas en racimos, sus hojas con peciolo lineales-lanceoladas, de 6-14 cm de longitud, corola de color amarillo brillante.

El fruto es una drupa, subesférica u oblata en la juventud, posteriormente se vuelve oboveideo-deprimido y también leve comprimido, pedicelo grueso y rígido, hueso obtrulado en vista frontal, de color café claro de 4-5 cm de diámetro que contiene látex de color blanco. En forma silvestre se le encuentra con más frecuencia en las comunidades secundarias del bosque tropical caducifolio, menos

abundante entre la región primaria del bosque tropical caducifolio, y en la selva baja caducifolia de nuestro país.<sup>17, 1</sup>



**Figura. 3.2 Características botánicas del codo de fraile**

El codo de fraile es un extraordinario coctel de sustancias y principios activos todavía poco aprovechados por la medicina moderna, se han identificado al menos dieciocho compuestos químicos, algunos de estos componentes tienen demostrada actividad biológica, otras se encuentran todavía en su evaluación biológica y toxicológica.<sup>5</sup>

### **3.5 Toxicología**

#### **3.5.1 Definición**

La toxicología es el estudio de los agentes físicos y químicos que producen respuestas adversas en los sistemas biológicos cuando entran en contacto. Una forma sencilla de entender el nivel de riesgo potencial de una sustancia, será a través de la ecuación:

$$\textit{exposición} + \textit{toxicidad} = \textit{riesgo para la salud}$$

La exposición se refiere a la relación entre el tiempo y la concentración en el ambiente al que la persona estará siendo expuesta al agente de riesgo, mientras que la toxicidad es un factor inherente a cada producto que indica su capacidad de

provocar daños inmediatos o acumulativos en un ser vivo. La toxicidad es la capacidad intrínseca que posee un agente químico de producir efectos adversos sobre un órgano.<sup>18</sup>

### **3.5.2 Métodos de evaluación toxicológica**

Los métodos de evaluación de toxicidad pueden dividirse en dos categorías. La primera incluye aquellos ensayos diseñados para evaluar los efectos generales globales de los compuestos sobre los animales de experimentación. Cada uno de los ensayos de esta categoría difiere de los otros fundamentalmente en lo que concierne a la duración de la prueba y a la extensión con que los animales son críticamente evaluados en cuanto a la toxicidad general. Estos ensayos se designan como pruebas de toxicidad aguda, subcrónica y crónica.

La segunda categoría de ensayos incluye aquellas pruebas diseñadas para evaluar en detalle tipos específicos de toxicidad. Los ensayos generales prolongados y crónicos no detectan todas las formas de toxicidad, pero pueden poner de manifiesto algunas toxicidades específicas e indicar la necesidad de estudios más detallados.<sup>18, 19</sup>

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.

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, consiste en exponer a los 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.

### **3.5.3 Modelos experimentales**

Consideraciones prácticas en el diseño de modelos experimentales, demanda que el número de animales usados en experimentos de toxicología, 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 son empleadas para demostrar que una sustancia química es segura y para caracterizar los efectos tóxicos que una sustancia química puede producir.<sup>20</sup>

### **3.5.4 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.
- 2) Por estudios experimentales con animales y plantas.

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

- 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.)

### **3.5.5 Ensayos de toxicidad**

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.

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>20</sup>

Al final del ensayo toxicológico los animales deben ser sacrificados, para obtener la sangre y los tejidos para su análisis. La condición macroscópica y microscópica de los órganos y tejidos, el peso de los órganos principales deben ser registrados y evaluados, las mediciones químicas hematológicas se hacen antes, a la mitad y al término de la exposición. Estas mediciones incluyen: recuento leucocitario total, plaquetas, glucosa, calcio, potasio, urea, creatinina, TGO, TGP, LDH, CK-MB, entre otras.<sup>20</sup>

### **3.5.6 Marcadores enzimáticos**

Son exámenes para determinar la actividad de enzimas específicas en el cuerpo. Las enfermedades o defectos hereditarios pueden hacer que las enzimas dejen de trabajar o que sean menos activas. Los resultados de los exámenes se reportan como un porcentaje de la actividad enzimática normal.

Los métodos de evaluación buscan una forma de medir la toxicidad. Tales medidas se refieren a efectos relacionados con marcadores biológicos ó marcadores enzimáticos; por ejemplo, los cambios en los niveles de enzimas en la sangre pueden ser indicativos del daño en tejidos, tal es el caso de la Alanina aminotransferasa (ALT) ó TGP y Aspartato aminotransferasa (AST) ó TGO se utilizan para detectar daño en hígado. El uso de estas enzimas en el suero es un ejemplo medible del daño presente en este órgano.

En el caso del corazón, los cambios estructurales y alteraciones funcionales de miocardio pueden ser medidos indirectamente por ecocardiograma y electrocardiograma en combinación con pruebas de estrés. Los datos generados a partir de estas medidas pueden ser considerados marcadores biológicos; sin embargo en la clínica y la práctica experimental, los marcadores biológicos del corazón son medidos a partir de marcadores enzimáticos de daño al miocardio medidos a partir de muestras de sangre. La elevación de creatincinasa isoenzima (CK-MB) en suero se considera un marcador bastante específico de infarto agudo al miocardio.<sup>20</sup>

#### 4. 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, un ejemplo es el codo de fraile que es ingrediente de algunos de estos productos para bajar de peso, los cuales se anuncian por televisión: Capslim ®, Sin hambre ®, Redugrass ®, Total slim ® y Diet sen ®.<sup>4,16,21</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 obliga a buscar salidas fáciles como el consumo de extractos naturales tales como el tamarindo malabar (***Garcinia cambogia***), el guaraná (***Paullinia cupana***), la alfalfa (***Medicago sativa***), la piña (***Ananas comosus***), el té verde (***Camellia sinensis***), el Codo de fraile (***Thevetia thevetioides***), entre otros; que aunque tienen un efecto terapéutico, también contiene otras sustancias que pueden llegar a ser peligrosas para la salud.<sup>14</sup>

De acuerdo a la Comisión Federal Para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) México; en 2008 en la ciudad de Guadalajara Jalisco se registraron 16 casos de intoxicación y dos muertes por el consumo de codo de fraile, debido a que las empresas de productos “milagro” no advierten sobre los efectos secundarios ni la dosificación, que se pueden presentar evadiendo su responsabilidad con la leyenda “El uso de este producto es responsabilidad de quien lo consume”.

El empleo del fruto del codo de fraile como objeto del estudio en este proyecto deriva de la inquietud de conocer sus efectos tóxicos debido a las propiedades que se le atribuyen, siendo de interés realizar un ensayo de toxicidad aguda que

aporte las evidencias de carácter toxicológico y analizar por métodos enzimáticos si los activos presentes en el fruto de esta especie pueden causar lesiones en diversos órganos.

Debido a que no existen estudios toxicológicos referentes al fruto, se consideró necesario realizar estudios para conocer cuál es el grado y tipo de daño que puede provocar su administración, por lo que se planteo la siguiente pregunta de investigación.

¿Cuáles serán los efectos tóxicos del fruto de codo de fraile después de administrar dosis repetidas en un intervalo de tiempo determinado del extracto acuoso de esta especie en corazón, riñón bazo e hígado en un modelo de ratón?

## **5. HIPÓTESIS**

Al administrar tres dosis de 80 mg/Kg del extracto acuoso del fruto de codo de fraile a un grupo de ratones CD1; serán capaces de producir daños a nivel de bazo, hígado, riñón y corazón con un aumento en la concentración de ALT, AST, LDH, CK-MB, urea, creatinina, nitritos y peroxidación lipídica.

## 6. OBJETIVOS

### General

- Evaluar los efectos tóxicos del extracto acuoso del fruto de codo de fraile, mediante marcadores enzimáticos en corazón, riñón e hígado en un modelo de ratón.

### Particulares

- Evaluar el daño cardíaco, hepático y renal, mediante la medición de la concentración de las enzimas Creatincinasa isoenzima (CK-MB) y Deshidrogenasa láctica (LDH) en corazón, Transaminasa glutamicoxalacetica (TGO) y Transaminasa glutamicopiruvica (TGP) en hígado, urea y creatinina en riñón, utilizado en suero de ratón.
- Determinar en el suero, nitritos como indicador de óxido nitroso por el método Griess, y valorar la concentración de MDA (peroxidación lipídica) mediante el método de ácido tiobarbitúrico (TBA).
- Evaluar el daño en bazo mediante el índice esplénico
- Realizar cortes histológicos de corazón para la observación de posibles zonas con necrosis.

## 7. DISEÑO EXPERIMENTAL

### Población de estudio

Ratones hembra CD 1 con peso promedio de 25-30 g divididas en dos grupos de 10 animales cada uno.

### Criterios de inclusión y exclusión

#### Inclusión

RATONES

Hembra

Sanos

25 a 30g

Sin manejo previo

#### Exclusión

Macho

Enfermos

Menor a 25g

Mayor a 30g

Utilizados previamente

Preñadas o gestantes

### Variables

#### Dependiente

Índice hepático, cardíaco, esplénico y renal

Perfil cardíaco, hepático y renal

Determinación de nitritos y peroxidación lipídica

#### Independiente

Tiempo de administración (Horas)

Días de administración

Concentración del extracto

## 8. MÉTODOS

### 8.1 Extracto acuoso del fruto de codo de fraile; Recolección e identificación.

1. Pesar 500 g de fruto de codo de fraile y colocar en un vaso de precipitado.
2. Agregar 1000 mL de agua y calentar durante 30 minutos manteniendo agitación constante.
3. Concentrar hasta sequedad el resto del extracto crudo para obtener un sólido que se empleará en el ensayo de toxicidad.

La *Thevetia thevetioides* (codo de Fraile) se colectó en el mes de junio, en la comunidad de Izúcar de Matamoros, Estado de Puebla; una muestra de la especie (fruto) fue depositada en el herbario del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), a la cual se le asignó un número de registro IMSSM 15 720 y fue autenticada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, jefa del herbario del IMSS.

### 8.2 Modelo de toxicidad aguda

Se siguieron los esquemas recomendados por la toxicología Casarett y Doull<sup>20</sup>

#### GRUPO TRATADO

- 1) Los ratones, se separaron aleatoriamente en 2 grupos de 10 animales, se sometieron a un ayuno previo de 16 horas, se marcaron individualmente, se pesaron y con la ayuda de una sonda gástrica (animal feeding needles, 20GX 11/2" Poper and sons. Inc. Newhyde Park NJ, USA) se les administró la dosis de 80 mg/Kg de peso en un volumen aproximado de 0.2 mL. La operación se repitió dos veces más, con intervalos de 2 horas. Los animales se observaron durante las siguientes 8 horas, para identificar efectos tóxicos (muertes, diarrea, salivación, Irritabilidad, ataxia, anestesia etc.). Esta observación se repitió por 5 días. Al terminar dicho periodo los animales fueron anestesiados previamente con éter y se sacrificaron por

medio del corte axial para colectar muestras de sangre con ayuda de tubos Eppendorf.

- 2) Posteriormente se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para la obtención de suero.

## GRUPO CONTROL

- 1) Se administro por sonda gástrica una dosis única de 0.2 mL de solución salina isotónica a 10 ratones hembra CD1 y se procedió a realizar el mismo procedimiento que al grupo tratado.

### 8.3 Índices hepático, cardiaco, esplénico y renal<sup>20</sup>

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

- Se pesó el órgano
- Posteriormente se realizó el siguiente cálculo

Índice =	Peso del órgano	X 100
	Peso del ratón	

### 8.4 Técnicas histológicas<sup>20,22</sup>

Las técnicas histológicas son 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.

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.

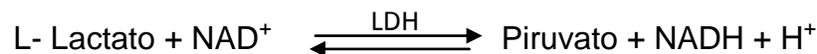
### 8.5 Perfiles cardiaco, hepático y renal

Para la evaluación de los perfiles cardiaco y hepático se emplearon cuatro determinaciones enzimáticas: LDH, CK-MB, AST, ALT, para la

evaluación renal se emplearon marcadores como la urea y creatinina, se realizaron de forma automatizada por el equipo 1 Lab 600 por medio de espectrofotometría en suero.

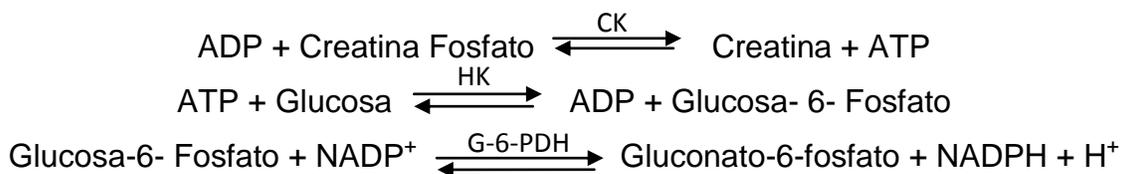
## 8.6 Fundamento de las técnicas empleadas para determinar marcadores y enzimas.

- **Lactato deshidrogenasa (LDH):** La reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría es la siguiente:



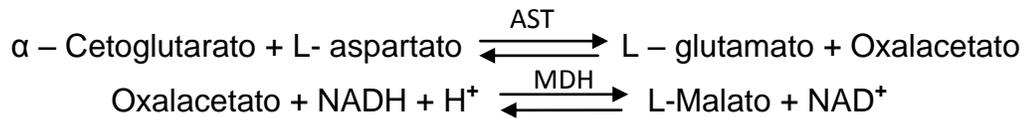
La lactato deshidrogenasa convierte el L-lactato en piruvato y NADH. El índice de incremento en absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm, debido a la formación del NADH, es proporcional a la actividad de la LDH.<sup>23,24</sup>

- **Creatincinasa isoenzima (CK-MB):** La reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría es la siguiente:



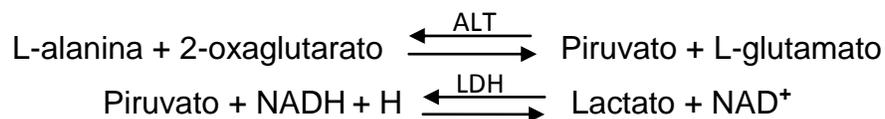
La CK cataliza la fosforilación reversible del ADP mas creatinafosfato para formar ATP y creatina. La enzima auxiliar hexoquinasa (HK) cataliza la fosforilación de la glucosa por el ATP formado, para producir ADP y Glucosa-6-Fosfato se oxida a Gluconato-6-fosfato con la producción acompañada de NADPH. La formación de NADPH, medida a 340 nm, es directamente proporcional a la actividad de CK-MB en suero.<sup>20,24</sup>

- **Aspartato aminotransferasa (AST):** La aspartato aminotransferasa (AST) es también conocida como transaminasa glutámico-oxalacética (TGO). La reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría es la siguiente:



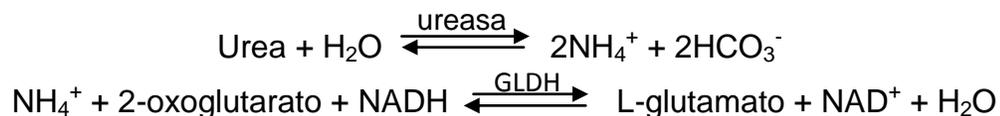
La AST cataliza la reacción de  $\alpha$ -cetoglutarato y L-aspartato a L-glutamato y oxalacetato, en la segunda reacción la malato deshidrogenasa (MDH) cataliza la oxidación del NADH a NAD<sup>+</sup>. El índice de reducción en absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm debido a la oxidación del NADH es proporcional a la actividad AST.<sup>24-27</sup>

- **Alanino aminotransferasa (ALT):** La alanino aminotransferasa (ALT) es conocida también con el nombre de transaminasa glutámico-pirúvica (TGP). La reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría es la siguiente:



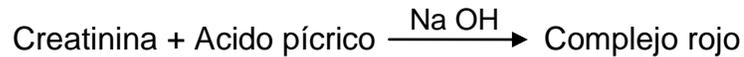
La ALT cataliza la conversión de L-alanina y 2-oxoglutarato a piruvato y L-glutamato, posteriormente la LDH cataliza la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. El índice de reducción en absorbancia de la mezcla de reacción a 340 nm debido a la oxidación de NADH es directamente proporcional a la actividad de ALT.<sup>24-27</sup>

- **Urea:** La reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría es la siguiente:



La ureasa cataliza la conversión de urea y agua a amoníaco y bicarbonato, posteriormente la glutamato deshidrogenasa cataliza la oxidación de NADH a NAD<sup>+</sup>. 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 concentración de nitrógeno presente en la urea de la muestra.<sup>24,26,28</sup>

- **Creatinina:** La reacción que se emplea para su determinación por espectrofotometría es la siguiente:



La metodología colorimétrica basada en la reacción de la creatinina con ácido pícrico en condiciones de alcalinidad dan como producto de reacción un complejo color rojo resultante que es directamente proporcional a la concentración de creatinina en la muestra. El color es cuantificado a 510 nm.<sup>24,27,28</sup>

- **Peroxidación lipídica:** La peroxidación lipídica es un proceso complejo, en el cual los ácidos grasos no saturados en los fosfolípidos de las membranas celulares son atacados por radicales que provocan la abstracción de un hidrógeno, formándose hidroperóxidos que son de difícil medición por degradarse rápidamente. No obstante, la lipoperoxidación constituye el patrón de oro cuando se trata de probar la función de los radicales libres en algún tipo de daño celular, una forma de medirla es a través del malondialdehído (MDA), que reacciona con el ácido tiobarbitúrico, formándose un color susceptible de ser medido directamente.<sup>29,30</sup>
- **El óxido nítrico (NO):** La cuantificación de NO<sup>+</sup> es difícil en medios biológicos, debido a su corta vida media (de 6 a 10 segundos) y a sus bajas concentraciones y por eso se cuantifican sus metabolitos estables: Nitrito y Nitrato. El Nitrito es el único producto estable resultante de la auto oxidación del NO<sup>+</sup> el procedimiento adecuado para la determinación de nitritos es por el método de Griess. Este método complementado con desproteinización y reducción de nitratos a nitritos en presencia de NADPH-reductasa puede ser aplicado para la medición de los niveles de NO<sup>+</sup> en los fluidos del cuerpo humano (suero, orina, líquido cefalorraquídeo).<sup>31,32,33</sup>

## 8.7 Determinación de nitritos<sup>34,35</sup>

100 µL de la muestra de suero se desproteinizó precipitando proteínas con sulfato de zinc. La determinación de nitritos se realizó mediante la técnica de Griess, previamente en las muestras se redujeron los nitratos a nitritos, mediante el uso de cadmio plateado con sulfato de cobre. Se usó nitrito de sodio a una concentración de 2 µg/mL, para realizar una curva patrón.

### Plateamiento del cadmio

- 1) En 30 tubos de 13 X 100 mm se colocarán 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 reactivos

- 1) Reactivo de sulfanilamida  
Disolver 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL de ácido acético al 15 %
- 2) Reactivo de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato (NED)  
Disolver 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato en 150 mL de ácido acético al 15 %.

### 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 formará 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 placa 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) La **tabla 1.** representa la curva de calibración con un estándar de nitrito de sodio (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

<b>Tabla 1.</b> Curva de calibración		
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 $\mu\text{L}$ del sobrenadante	700
Adicionar 50 $\mu\text{L}$ de sulfanilamida. Incubar 10 minutos		
Adicionar 50 $\mu\text{L}$ de reactivo de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato (NED). Incubar 30 minutos		
Leer a 540 nm		

- 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.

### 8.8 Determinación de peroxidación lipídica (MDA). Método de TBA (ácido tiobarbitúrico)<sup>36</sup>

#### Procesamiento de la muestra

- 1) Se colectaron 100  $\mu\text{L}$  de la muestra del plasma de cada ratón en tubos Eppendorf
- 2) Se les agregaron 10  $\mu\text{L}$  de Butilhidroxitolueno (BHT) 2 mM.
- 3) Se diluyó el plasma 1:5 con Fosfato de sodio dibásico (PBS) (100  $\mu\text{L}$  de plasma en 400  $\mu\text{L}$  de PBS).
- 4) Se tomaron 400  $\mu\text{L}$  de plasma con 50  $\mu\text{L}$  de Butilhidroxitolueno (BHT) 12.6 mM y 400  $\mu\text{L}$  de ácido orto fosfórico 0.2 M.
- 5) Se mezclaron en el vórtex por 10 segundos, y se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de TBA 0.11M/L y se mezclarán de nuevo con vórtex.
- 6) La **tabla 2**. Ilustra cómo se realizó la curva estándar de MDA, para sacar las concentraciones de MDA y así reportar la peroxidación lipídica en suero de ratón.

<b>Tabla 2.</b> Curva estándar de malondialdehido (MDA)					
TUBO	MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	TMP ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ( $\mu\text{L}$ )	TBA ( $\mu\text{L}$ )	AGUA ( $\mu\text{L}$ )
Blanco	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	50	600	200	150
6	2.8	70	600	200	130
7	4	100	600	200	100

### 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 µL de n-butanol y 100 µL de solución saturada de cloruro de sodio (NaCl) y se agitaron vigorosamente por 30 segundos.
- 3) Se centrifugaron a 5000 rpm por 1 minuto, y se transfirieron 500 µL de la fase de n-butanol a una celda.
- 4) Se realizó la lectura a 535 nm y a 572 nm, para con ello corregir la absorción.

### **8.9 Análisis estadístico<sup>37</sup>**

Se propuso realizar el análisis estadístico de los resultados mediante el Paquete Estadístico para las Ciencias Sociales (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS) versión 11.5, para ambiente Windows y la prueba estadística de comparación usada fue la t-Student, basada en el número de observaciones, la media, y la desviación estándar que nos permitió identificar la existencia de las diferencias significativas entre el grupo control y el grupo con tratamiento, con una confianza al 95%.

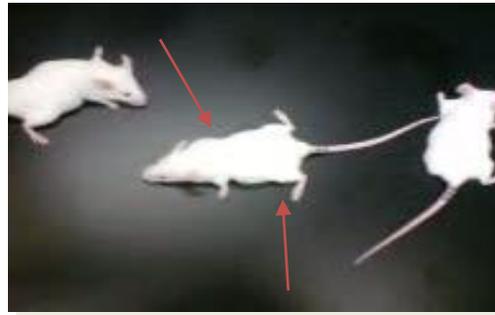
## 9. RESULTADOS

### 9.1 Comportamiento

A los 15 minutos de la primera administración (80mg/Kg) los animales desarrollaron dificultad respiratoria y taquicardia que llegaba a durar hasta una hora (figura 9.1), posterior a las dos horas de la primera administración se aplicó la segunda dosis observando que los animales desarrollaron irritabilidad, dificultad respiratoria y problemas en la marcha (figura 9.2).



**Figura 9.1** Ratón CD1 tratado con el extracto frutal de codo de fraile, se muestra con taquicardia y dificultad respiratoria.



**Figura 9.2** Ratones CD1 del grupo tratado que muestran, irritabilidad, dificultad respiratoria y problemas en la marcha.

En la tercera dosis de aplicación los ratones mostraron disminución de la actividad física, atonía muscular, taquicardia y dificultad respiratoria (figura 9.3), el resto del día su comportamiento fue modificado, ya que se mostraban agotados y permanecían la mayor parte del tiempo sin actividad física. El grupo control (figura 9.4), no presentó cambio alguno en comparación con el grupo tratado.



**Figura 9.3** Ratones CD1 tratados, se muestran con taquicardia, dificultad respiratoria, ataxia y sedación.



**Figura 9.4** Comportamiento normal de ratones CD1. Se trata del grupo control.

Los animales se mantuvieron por rutina de observación por cuatro días más después de la administración del extracto, por lo que al segundo día los animales se observaban agotados, con disminución de actividad física y permaneciendo la mayor parte del tiempo dormidos con poco o nulo consumo de alimento, al tercer día su comportamiento fue modificado mostrando menos signos de toxicidad y con deseos de consumir alimento, al cuarto y quinto día de observación los animales ya no mostraban signos de toxicidad aparentemente.

Al término del quinto día de ensayo los animales se pesaron y sacrificaron para proceder a obtener la sangre y los órganos (corazón, hígado, riñón y bazo) de los grupos testigo y tratados para su posterior análisis.

## 9.2 Resultados de los valores enzimáticos y marcadores

Al evaluar los resultados obtenidos en relación al comportamiento enzimático encontramos que la TGO y la TGP disminuyeron, la HDL y la urea aumentaron y la CK-MB se mantuvo sin cambios con respecto al testigo. Todos los parámetros permanecieron sin mostrar diferencias estadísticamente significativas (cuadro 9.1); al analizar la concentración de creatinina se observó que esta fue significativamente mayor con respecto al testigo, así mismo los valores de MDA y nitritos se encuentran elevados mostrando un valor de p limítrofe.

**Cuadro 9.1** Valores promedio de los parámetros evaluados entre el grupo testigo y control.

Enzimas y Marcadores	Unidades	Grupo Testigo.	Grupo Tratado.
TGO	U/L	241.8 ± 81.3	213.1 ± 17.3
TGP	U/L	54 ± 11.5	46.7 ± 3.12
LDH	U/L	1613.9 ± 367.5	2220.7 ± 132.8
CK-MB	U/L	8060.8 ± 1133.2	8098.40 ± 1535.9
Urea	mg/dL	44.1 ± 1.3	48.9 ± 2.0
Creatinina	mg/dL	0.37 ± 0.015	0.43 ± 0.015 *
MDA	µmol/L	3.49 ± 0.75	5.59 ± 0.67
Nitritos	µg/dL	1.13 ± 0.14	1.56 ± 0.44

Valores en promedio n=10 +/- EE (Error Estándar)

\*Prueba t-student p<0.05

### 9.3 Resultados de los índices cardíaco, hepático, renal y esplénico

Al evaluar los resultados obtenidos en relación a los índices cardíaco, hepático, renal y esplénico, encontramos que el índice hepático del grupo tratado disminuyó con respecto al grupo testigo mostrando un valor de p limítrofe sin diferencias estadísticamente significativas (cuadro 9.2); al analizar los índices cardíaco, renal y esplénico del grupo tratado se observó que estos fueron significativamente menores con respecto al grupo testigo.

**Cuadro 9.2** Comparación de medias de los índices de cada órgano entre el grupo testigo y control.

Órganos	Unidades	Grupo Testigo.	Grupo Tratado.
Índice Cardíaco	g	0.5153 ± 0.01512	0.4366 +/- 0.01227 *
Índice Hepático	g	6.3957 +/- 0.26436	5.9273 +/- 0.16689
Índice Renal	g	1.2030 +/- 0.04711	1.0625 +/- 0.01991 *
Índice Esplénico	g	0.4116 +/- 0.01941	0.2870 +/- 0.01974 *

Valores en promedio n=10 +/- EE (Error Estándar)

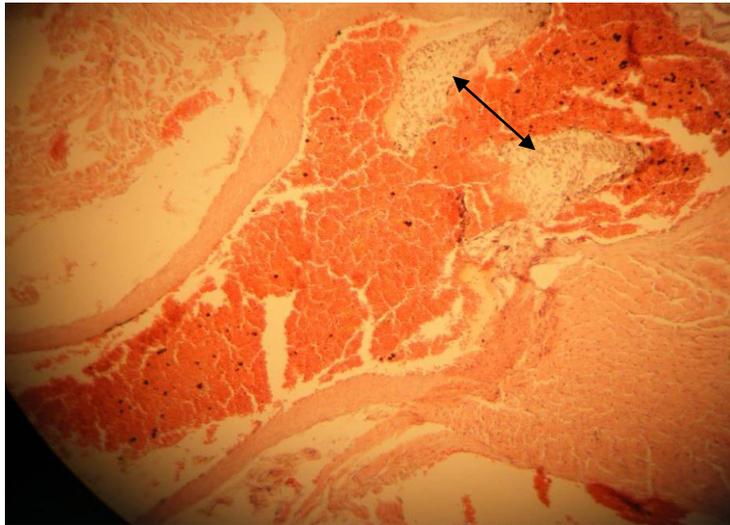
\*Prueba t-student p<0.05

### 9.4 Disminución de peso en los ratones

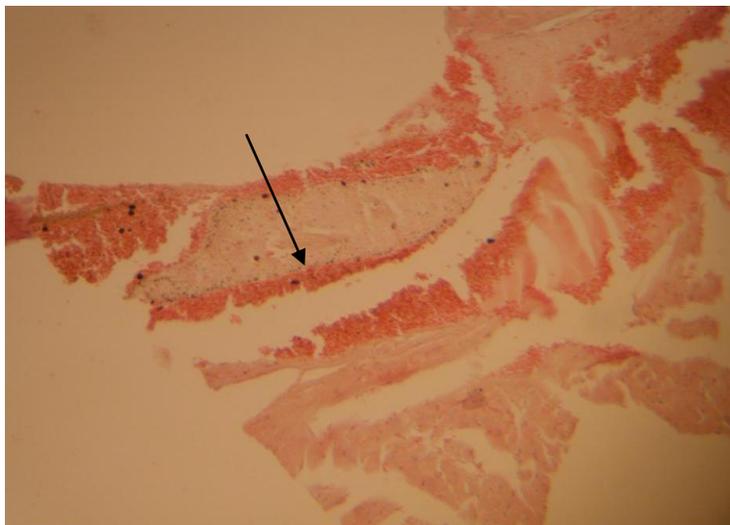
Al final del experimento, los animales tratados mostraron una pérdida de peso promedio de -10g, con respecto al peso inicial. Mientras que los animales del grupo testigo aumentaron un promedio de 3.5 g.

## 9.5 Cortes histológicos

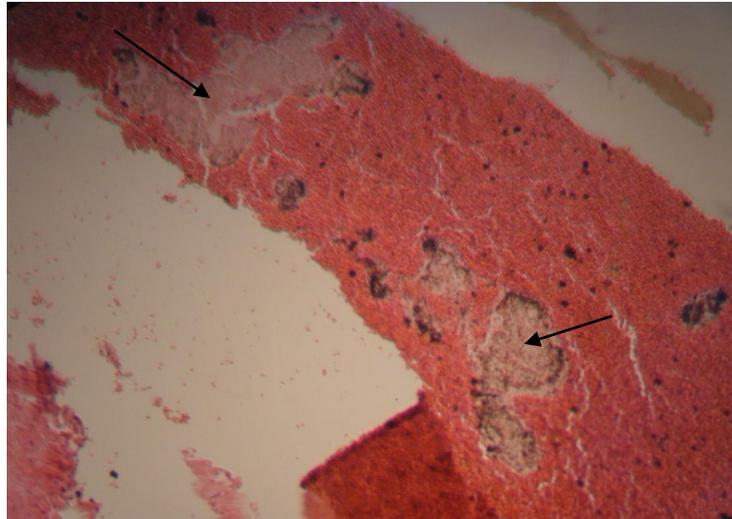
Los ensayos de toxicidad aguda normalmente se apoyan en el examen histológico de los tejidos y órganos principales para detectar anomalías (Figura 9.5-9.8). A partir de estas observaciones, por lo general se obtiene información más específica sobre los acontecimientos que condujeron a los diversos criterios de valoración, los órganos diana implicados proporcionan una sugerencia sobre el posible mecanismo de toxicidad a un nivel relativamente fundamental.



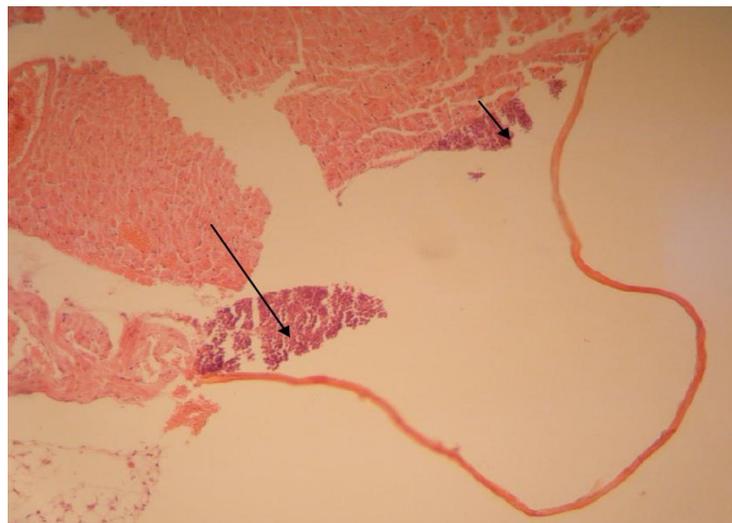
**Figura 9.5** Corte histológico en miocardio observando la presencia de necrosis en el mismo, representada por las flechas.



**Figura 9.6** Corte histológico observando la presencia de necrosis en el miocardio.



**Figura 9.7** Las zonas señaladas marcan la presencia de zonas afectadas por la presencia de necrosis en fibras musculares cardíacas



**Figura 9.8** La zona señalada muestra infiltración leucocitaria con predominio en las zonas del miocardio

## 10. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Como se puede observar en la **tabla 10.1**, los resultados obtenidos de la ***Thevetia thevetioides***, se encontró que el extracto acuoso frutal presenta toxicidad que afectan el organismo de ratones CD1, así como también en órganos como el riñón, el corazón y el bazo.

PARÁMETROS ANALIZADOS	Especie estudiada en la tesis	Especies estudiadas por diferentes autores		
	<i>Thevetia thevetioides</i>	<i>Thevetia peruviana</i> <sup>38, 39</sup>	<i>Thevetia nerifolia</i> <sup>40</sup>	<i>Thevetia cervera</i> <sup>41</sup>
ESPECIE ANALIZADA O INTOXICADA				
Ratones CD1 hembras	✓	✗	✗	✗
Ratas albinas macho	✗	✓	✗	✗
Rata de tejado	✗	✗	✓	✗
Humanos	✗	✓	✗	✓
<b>TIPO DE EXTRACTO Y PARTE ANALIZADA DEL ÁRBOL</b>				
Acuoso/ Fruto	✓	✗	✗	✗
Metanólico/ Semilla/ Corteza	✗	✓	✗	✗
Semilla molida	✗	✗	✓	✓
<b>TIEMPO Y DOSIS DE ADMINISTRACIÓN</b>				
3 Dosis 80mg/Kg /2 h/1 día	✓	✗	✗	✗
Ingesta de 1 semilla en humanos/1 día	✗	✓	✗	✓
1 Dosis 20 y 30% del total de una semilla/10 días	✗	✓	✓	✗
1 Dosis 100mg/Kg/10 días	✗	✓	✗	✗
<b>VÍA DE ADMINISTRACIÓN</b>				
Oral	✓	✓	✓	✓
<b>SIGNOS Y SÍNTOMAS DE TOXICIDAD</b>				
Ataxia, parálisis de las extremidades, taquicardias	✓	✓	✓	✗
Nauseas, vomito, diarrea, dolor abdominal, dilatación de las pupilas, convulsiones	✗	✓	✗	✓
Temblores, colapso y muerte	✗	✓	✓	✗
<b>DAÑO A NIVEL RENAL</b>				
Aumento de creatinina	✓	✗	✗	✗
Aumento de nitrógeno ureico	✗	✗	✓	✗
Patología glomerular	✗	✗	✓	✓
Necrosis renal	✗	✗	✓	✓

<b>DAÑO A NIVEL CARDIACO</b>				
Necrosis en fibras musculares cardiacas	✓	✗	✗	✗
Necrosis en miocardio	✓	✗	✗	✗
Aumento de TGO y LDH	✗	✗	✓	✗
<b>DAÑO A NIVEL ESPLENICO</b>				
Atrofia esplénica	✓	✗	✗	✗
<b>DISMINUCION DE PESO EN ORGANOS</b>				
Corazón, riñón y bazo	✓	✗	✗	✗
Órganos reproductivos	✗	✓	✗	✗
<b>DIFERENCIA DE PESO CORPORAL</b>				
Disminución de peso	✓	✗	✓	✗
Sin diferencia en peso	✗	✓	✗	✗

✓ Similitudes entre *Thevetia thevetioides* y otras especies

✗ Diferencias entre *Thevetia thevetioides* y otras especies

Comparando el daño a nivel renal con las diferentes especies de *Thevetia*, se observa que el fruto de *thevetioides* presenta daños con atrofia renal indicada por el aumento en la concentración de creatinina, mientras que *nerifolia* y *cervera*<sup>40,41</sup> son dos especies que reportan daños a nivel renal, lo cual se observa por el aumento en la concentración de nitrógeno ureico, necrosis a nivel renal y la patología glomerular. Como se puede notar hay similitudes entre estas tres especies presentando patologías a nivel renal las cuales se evaluaron con marcadores biológicos, cortes histológicos o por diferencia de peso en el órgano.

Comparando el comportamiento a nivel cardiaco entre *thevetioides* y *nerifolia* coinciden en el daño que generan al corazón. Ya que *nerifolia*<sup>40</sup> es analizada por vía enzimática presentando aumento en la concentración de TGO y LDH, mientras que en *thevetioides* no se observó el aumento en la concentración de TGO y LDH, solo se observó la presencia de necrosis y de atrofia del órgano, las cuales creemos que se generaron por las dosis administradas del extracto acuoso frutal de *thevetioides* afectando la reparación celular e inhibiendo las enzimas responsables de daño a nivel cardiaco como la TGO, la LDH y la CK-MB.

El daño a nivel esplénico observado por la toxicidad del fruto de *thevetioides* se manifiesta por la reducción del peso en este órgano, definido como atrofia esplénica, a pesar de que no se han realizado estos estudios con otras especies

de **Thevetia** a nivel esplénico, **thevetioides** demuestra ser una especie que afecta varios órganos como el bazo, riñón y corazón.

La disminución de peso en órganos representa un daño a nivel patológico. Ya que en un estudio realizado a **peruviana**<sup>39</sup> registran, que no hay una reducción de peso significativa en el cuerpo de las ratas estudiadas, pero si una reducción significativa en el peso de los órganos reproductores en el estudio de espermatogénesis que realizaron. Mientras que en el estudio que se le realizó a **thevetioides** si se observó una disminución en el peso de varios órganos como el corazón, riñón y bazo, lo cual implica una reducción en el peso corporal de los ratones. Por otro lado, la especie **nerifolia**<sup>40</sup> también reporta una disminución significativa en el peso corporal de ratas.

Es importante tomar en cuenta el tipo de extracto, las partes analizadas del árbol y el género botánico ya que estas diferencias determinan el grado de toxicidad.

Como se puede observar el género **thevetia** presenta severos daños en ratones CD1, ratas albinas y ratas de tejado en órganos, lo cual es muy similar o comparable en la sintomatología con humanos, donde se produjo la muerte<sup>38</sup>. Se deben tomar medidas de precaución e informar sobre este tipo de estudios ya que este tipo de plantas se utilizan frecuentemente en la medicina alternativa tradicional y productos milagro.

## 11. CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio demostraron la toxicidad del extracto acuoso frutal de codo de fraile en el ensayo agudo provocando alteraciones significativas en los parámetros evaluados, al conjuntar todas las pruebas se determinó la presencia de daños a nivel cardiaco, renal y esplénico.

De acuerdo a las manifestaciones observadas en los animales de experimentación se sospecha de un daño en sistema nervioso central por la ataxia y la dificultad respiratoria.

Al administrar una dosis de 80 mg/Kg de peso del extracto acuoso de fruto de codo de fraile cada 2 horas tres veces al día resulto ser efectivo como reductor de peso.

Es importante considerar los efectos tóxicos evaluados, ya que existen productos naturales que contienen sustancias nocivas que pueden llegar a ser peligrosas para los consumidores y desencadenar más efectos dañinos para la salud, que beneficios.

Por todo lo anterior no se recomienda el uso del fruto de ***Thevetia thevetioides***.

Este trabajo contribuyó al conocimiento del campo toxicológico del fruto de codo de fraile, en particular de ***Thevetia thevetioides***, ya que actualmente no existe un estudio de esta especie.

## 12. SUGERENCIAS

- Realizar estudios de intoxicación subcrónica y crónica, ya que como se observó en los resultados, los marcadores como el óxido nítrico y peroxidación lipídica comenzaron a elevarse, esto nos indica que probablemente al aumentar el tiempo de ingesta se podrá observar daño por presencia de radicales libres.
- Realizar ensayos de aclaramiento de creatinina o inulina con la finalidad de evaluar la función renal y obtener resultados más concretos.
- Realizar estudios fitoquímicos, ya que como se observó en los resultados, las enzimas LDH y CK-MB no aumentaron significativamente, a pesar de la presencia de necrosis en corazón, esto nos indica que muy probablemente algún metabolito del fruto este inhibiendo el proceso enzimático.
- Realizar el estudio con un mínimo de 30 animales experimentales para tener resultados concluyentes de acuerdo a los esquemas recomendados por la toxicología Casarett y Doull.
- Difundir a la población mexicana sobre el riesgo que tienen, al consumir algunos productos naturales.
- Realizar estudios toxicológicos en diferentes partes del árbol ya que cada parte puede tener diferentes concentraciones y por lo tanto diferente toxicidad.

## 13. ANEXO

### 13.1 REACTIVOS, EQUIPOS Y MATERIAL

Reactivo	Marca
Acido acético	EM Science
Acido clorhídrico	
Acido ortofosfórico	
Acido tiobarbitúrico (TBA)	Sintetizado en el laboratorio de orgánica por el M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez. FES Zaragoza
Acido sulfúrico	J.T. Baker
Agua destilada	Theissier
Cadmio metálico	Técnica Química S.A
Cloruro de amonio	J.T. Baker
Cloruro de sodio	Hycel de México
2,6-Di-trebutil-4 metil fenol (BHT)	Sigma Aldrich
Fosfato de sodio dibásico (PBS)	J.T. Baker
N-Butanol	J.T. Baker
N(1 naftil)-etilendiaminodihlorhidrato (NED)	Merck
Nitrito de sodio	Mellinckrodot
Sulfato de cobre	Técnica Clínica
Sulfato de zinc	Hycel de México
Sulfanilamida	Merck
1,1,3,3 Tetrametoxipropano (TMP)	Aldrich
Sulfanilamida	Merck

Equipo	Marca
Agitador Rocker	Rocker Platform Bellco Glass
Agitador Vortex genie	Scientific Industries
Baño María	Precisión
Baño de tejidos	Tissue FLDAT Bath Les. Boy
Balanza analítica	Mettler H33AR
Bascula para animales	OHAUS
Centrifuga para Eppendorf	HERMYLE Z 233 M-2
Centrifuga	Hamilton BelVan Guard V 6500
Congelador	Reico
Espectrofotómetro	JENWAY 6305 UV/VIS
Estufa	Shel Lab
Histoquinete	Wax Bath Type E7606

1 Lab 600	
Micropipeta 5-40 µL	Finnpipette-Lab systems
Micropipeta 10-100 µL	Labpette-Labnet
Micropipeta 100-1000 µL	BIOHT Proline
Microscopio	ZEISS Primo Start
Micrótopo	Leicon RM 2025
Pipeta automática	Finnpipette-Lab systems
Refrigerador	Twist aire-MABE

<b>Material</b>	
Tubos Eppendorf	
Gradilla	
Matraz Erlenmeyer	125 mL, 1000 mL
Pipeta graduada	1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL
Matraz aforado	100 mL, 250 mL
Matraz bola 24/40, 14/23	50 mL, 100 mL, 500 mL
Vaso de precipitado	100 mL
Tubos de ensayo	13 X 100
Pinzas de tres dedos	
Pipeta Pasteur	
Placa de agitación y calentamiento	
Papel parafilm	
Soporte universal	
Reóstato	
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

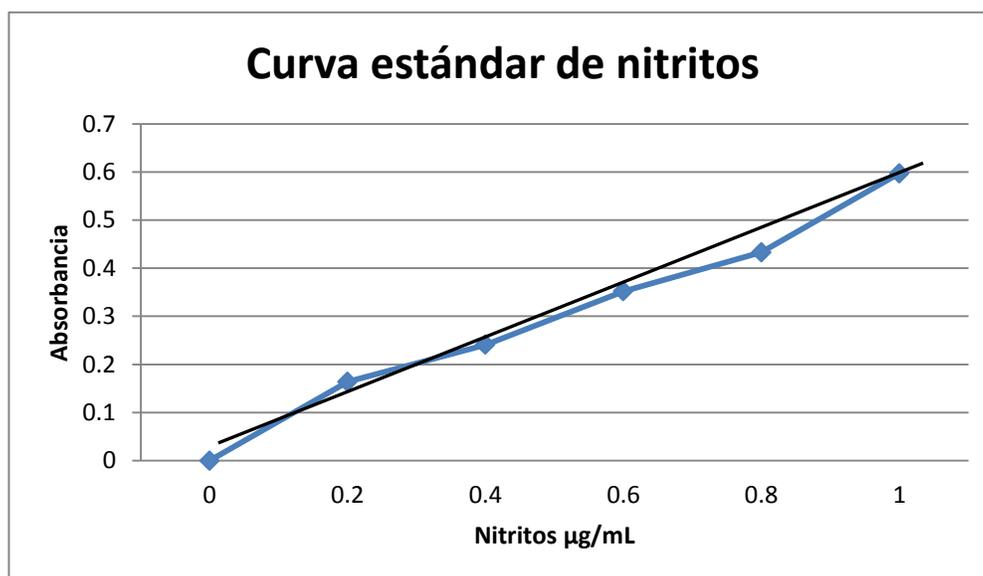
- Ratones hembra CD1 (25 - 30 g)
- Suero de ratón
- Extracto de *Thevetia thevetioides*.

## 13.2 Tablas y Graficas de curvas estándar

### 13.2.1 Determinación de Nitritos

Tubo	Estándar ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	Absorbancia (nm)	Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	0	900	0	0
2	100	800	0.164	0.2
3	200	700	0.241	0.4
4	300	600	0.352	0.6
5	400	500	0.433	0.8
6	500	400	0.597	1.0

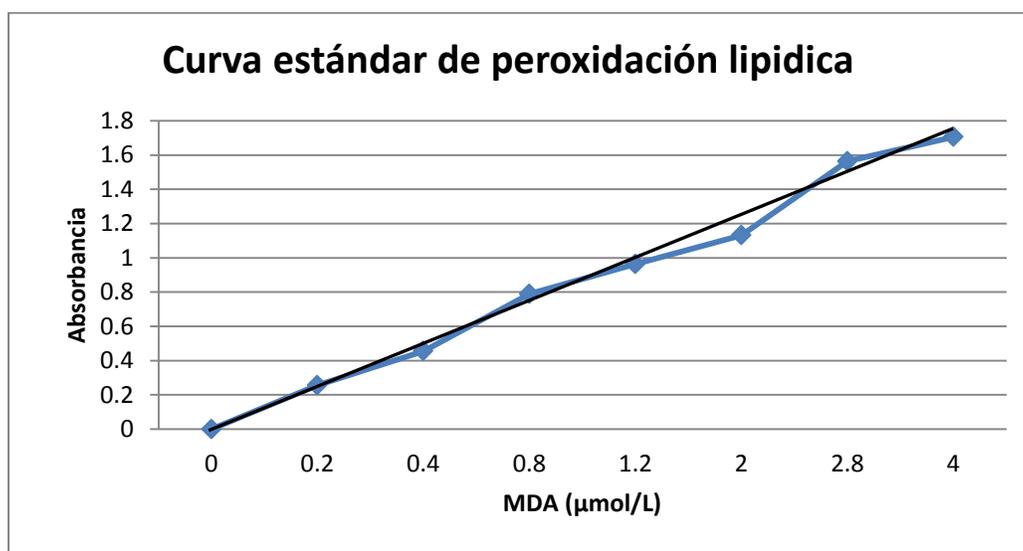
**Cuadro 13.1** Curva patrón. Concentración del estándar 2  $\mu\text{g/mL}$  de Nitrito de sodio



### 13.2.2 Determinación de Peroxidación Lipídica (MDA). Método de TBA (Ácido Tiobarbitúrico)

Tubos	MDA ( $\mu\text{mol/L}$ )	TMP ( $\mu\text{L}$ )	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ( $\mu\text{L}$ )	TBA ( $\mu\text{L}$ )	Agua ( $\mu\text{L}$ )	Absorbancia (nm)	Concentración ( $\mu\text{mol/L}$ )
Blanco	0	0	600	200	200	0	0
1	0.2	5	600	200	195	0.256	0.2
2	0.4	10	600	200	190	0.456	0.4
3	0.8	20	600	200	180	0.789	0.8
4	1.2	30	600	200	170	0.964	1.2
5	2.0	50	600	200	150	1.132	2
6	2.8	70	600	200	130	1.564	2.8
7	4.0	100	600	200	100	1.706	4

**Cuadro 13.2** Curva patrón. Concentración del estándar de MDA para peroxidación lipídica.



## 14. REFERENCIAS

1. Martínez M. Las plantas medicinales de México. 6ª ed. México D.F. Botero; **1996**; p.73-76.
2. Jiménez M., Ruiz R., Navarro A., Hernández J.M., Reyes R. Plantas usadas en México para curar la diarrea (estudio químico y bacteriológico). Rev Cubana Quím. **2000**;13(2):4-22.
3. Chiprut R., Castellanos U.A., Sánchez H.C., Martínez G.D., Cortéz M.E., Conde O.P. "La Obesidad en el Siglo XXI. Avances en la etiopatogenia y tratamiento". Gaceta Médica de México. **2001**;137(4):323-334.
4. COFEPRIS alerta ante productos para bajar de peso [serial online]. **2009** [citado 2010 Aug 26] Available from: <http://www.eleconomista.com>
5. Rojas A. M. Notas fitoterapéuticas. Mitos y realidades sobre el codo de fraile. Tlahui-Medic. México **2002**; 4;1.
6. Haslam D., James W. «Obesity». Lancet **2005**;366(9492):1197–1209.
7. Sunyer P. Process obesity. criteria and classification. Nutr. Soc. **2000**;59(4):505-509.
8. Hernández B., Cuevas N.L., Shamah L.T., Monterrubio E.A., Ramírez S.C., García F.R., Rivera J.A., Sepúlveda A.J. "Factores asociados con sobrepeso y obesidad en niños mexicanos de edad escolar: resultados de la Encuesta Nacional de Nutrición 1999". Salud Pública de México. **2003**;45(4):1-8.
9. González B.J. "Obesidad: problema de salud pública en México". Nutrición Clínica. **2002**;5(4):213-218.
10. Gómez D.H. Vázquez M.J.L., Fernández C.S. "Obesidad en adultos derechohabientes del IMSS. Encuesta Nacional de Salud 2000". Revista Médica del IMSS. **2004**;42(3):239-245.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-174-SSA1-1998, Para el manejo integral de la obesidad.
12. Herber D. Pharmacology in the treatment of obesity; Clinical Cornerstone. Excerpta Medica Inc. **1999**;2(3):33-42.

13. Orlistat for Obesity. The medical letter **1999**;41(18):55-56.
14. Anwarul H.G., Atta-ur-Rahman. Perspective paper: Trends in ethnopharmacology. **2005**;100:43-49.
15. Órgano informativo de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala 8<sup>a</sup> Época N° 187 Abril 25 de **2002**.
16. Senado de la República. Dictamen con punto de acuerdo en relación con la venta y consumo de suplementos alimenticios. Gaceta del Senado. **2008**; 26.
17. Aguilar L., Zolla C. Plantas Tóxicas de México. IMSS, México DF **1982**.
18. Loomis T. A. Fundamentos de Toxicología. Acribia, Zaragoza **1982**.
19. Lu. F.C. Toxicología básica. Riesgos por exposición a sustancias tóxicas. Harla, México DF **1992**.
20. Klaassen C.D. Toxicology. The basic science of poisons. 7th edn. New York: Mc Graw Hill. Medical Publishing Division; **2008**: p.485, 699, 1103.
21. González A. Peña M. Pérez A. Díaz 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.
22. Técnicas histológicas. [Serial online]. **2009** [citado 2011 Sep 21] Available from: <http://www.dermato101.com.ar/tecnica.pdf>
23. Desidrogenase Latica\_ESP.pdf [serial online]. **2009** [citado 2011 Sep 21] Available from: <http://www.biotechnicaltda.com>
24. Kaplan L.A., Pesce A.J. Técnicas de laboratorio. Fisiopatología–Métodos de análisis. Teoría, análisis y correlación. México: panamericana; **1986**.
25. Gilberto A. M. Interpretación clínica en el laboratorio. Mexico: Panamericana; **2006**.
26. Richard J., Donald C., Cannon M.D., James W. Química clínica y principios técnicos tomo 2, **1980**;2:880-884.
27. Salgado A., Vilardell M. Manual clínico de pruebas de laboratorio. **1996**: 40-41, 84-89.
28. Bishop M.L., Edward P.F. Química clínica. Principios, procedimientos y correlaciones. Madrid: Mc Graw-Hill; **2007**.

29. Bucala R., Cerama A. Advanced glycosylation: Chemistry Biology and implication for diabetes and aging, *Adv pharmacology*. **1992**:231-234.
30. Stites P.D., Terr I.A. *Inmunología básica y clínica*. México: Manual Moderno; **1994**.
31. Centelles J.J., Esteban C. Imperial S. Óxido nítrico, un gas tóxico que actúa como regulador de la presión sanguínea. *OFFARM*. **2004**;11(23).
32. Suarez M.P.J. Liberación de óxido nítrico inducida por el flujo sanguíneo. *Arch Inst. Cardiol. Mex*. **2000**;70:197-202.
33. Robbins S.L., Vinoy K., Ramzi S. C. *Patología estructural y funcional*. México: Interamericana-Mc Graw- Hill; **2000**.
34. Green L.C., Wanger D.A., Glogowski J., Skipper P.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. "Analysis of nitrite, and nitrate in biological fluids". *Rev. Anal. Biochem*. **1982**;126:131-138.
35. Guevara I., Iwanejko J., Dembi A., Pankiewicz J., Wanat A., Anna P., Bek I.G., Bartu's S., Malczewska-Malec M., Szczudlik A. "Determination of nitrite/ nitrate biological material by the simple Griess reaction". *Rev. Clin. Chem*. **1998**;274:177-188.
36. Nie F., Afshari M., Mojtahedi A., Mostafalou S., Zamani M.J., Larijani B., Abdollahi M. "Total antioxidant capacity and levels of epidermal growth factor and nitric oxide in blood and saliva of insulin-dependent diabetic patients". *Rev. Arch. of medical Research*. **2005**;36:376-381.
37. Ferrán A.M. *SPSS para Windows. Programación y análisis estadístico*. Madrid: McGraw-Hill; **2008**.
38. Omolara O.O., Samuel A.I. "Extractability of *Thevetia peruviana* glycosides with alcohol mixture" *African J. of Biotechnology*. **2007**;6(18):2166-2170.
39. Gupta. R., Kachhawa J.B., Gupta R.S., Sharma A.K., Sharma M.C., Dobhal M.P. "Phytochemical evaluation and antispermatogenic activity of *Thevetia peruviana* metanol extract in male albino rats" *Hum. Fertil. (Camb)*. **2011**;14(1):53-9.
40. Pahwa R., Chatterjee V.C. "The toxicity of yellow oleander (*Thevetia nerifolia* juss) seed kernels to rats" *Vet. Hum. Toxicol*. **1990**;32(6):561-4.

41. Small K.K., Sahu H.K., Kar M.K., Palit S.K., Kar B.C., Sahu C.S. "Yellow oleander (*Thevetia cerbera*) poisoning with jaundice and renal failure" J. Assoc. Physicians. **1989**;37(3):232-3
42. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration: Guidance for industry Q3C-Tables and list. [serial online]. **2003** [citado 2011 Feb.3] Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance/UCM073395>.