



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias químicas

Evaluación de la permeabilidad e inhibición enzimática *in vitro* de los glicósidos cardiotónicos de la semilla de *Thevetia thevetioides*.

Tesis para optar por el título de Maestro en Ciencias químicas.

PRESENTA:

Simone Barbonetti

TUTOR:

Andrés Navarrete Castro

Facultad de Química, departamento de farmacia

MEXICO D.F., NOVIEMBRE 2014



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.



PRESE

Contenido

Indice de imagenes.....	IX
Indice de Cuadros	X
1 Introducción:	1
2 Marco Teorico	1
2.1 Familia Apocynaceae	1
2.1.1 <i>Thevetia</i> spp	1
2.1.2 <i>Thevetia thevetioides</i>	2
2.1.2.2 Distribución	3
2.1.3 Etnobotánica de <i>Thevetia</i> spp	3
2.1.4 Estudios sobre las actividades de <i>Thevetia</i> spp.....	4
2.1.5 Efectos adversos de la asunción de <i>Thevetia</i> spp.....	4
2.1.6 Estudios sobre la fitoquímica de <i>Thevetia</i> spp	5
2.2 Importancia de la absorción gastrointestinal.....	10
2.2.1 Fisiología Gastrointestinal	10
2.2.2 Estómago	12
2.2.3 Intestino grueso o colon.....	12
2.2.4 Intestino delgado.....	12
2.3 Métodos de estudio para la investigación de la absorción intestinal.....	17
2.3.1 Métodos in vivo	18
2.3.2 Métodos in vitro	19
2.4 Citocromo p450.....	21
2.4.1 Isoenzima CYP 1A2	23
2.4.2 Isoenzima CYP 2D6	23
2.4.3 Isoenzima CYP 3A4	23
2.5 Neurotransmisión colinérgica	24



2.5.1	Acetilcolinesterasa (AChE).....	25
2.5.2	Inhibición de la Acetilcolinesterasa	25
3	Planteamiento del problema.....	27
4	Hipótesis.....	27
5	Objetivos.....	28
5.1	Objetivo general	28
5.2	Objetivos específicos	28
6	Materiales y métodos.....	28
6.1	Materiales y equipos	28
6.1.1	Material vegetal.....	28
6.1.2	Sustancias:	29
6.1.3	Enzimas y líneas celulares:	29
6.1.4	Equipos:	29
6.1.5	Materiales consumibles.....	30
6.2	Métodos	30
6.2.1	Obtención de la fracción de thevetósidos:.....	30
6.2.2	Obtención de la fracción de thevetósidos hidrolizados:	30
6.2.3	Obtención de los ácidos grasos:	31
6.2.4	Identificación de los compuestos:.....	31
6.2.5	Determinación del contenido de metales pesados:.....	33
6.3	Ensayos farmacológicos.....	33
6.3.1	Prueba de inhibición de AcetilColinEsterasa	33
6.3.2	Prueba de inhibición de α -glucosidasa.....	33
6.3.3	Pruebas de inhibición de CYP 450.	34
6.3.4	Permeabilidad por CaCo-2.....	36
7	Resultados y discusión.....	41
7.1	Rendimiento de las fracciones.	41
7.2	Identificación de los glicosidos	41
7.2.1	Thevetina A.....	43
7.2.2	Thevetina B.....	44



7.2.3	Thevetina C.....	45
7.2.4	Acetilthevetina A.....	46
7.2.5	Acetilthevetina B.....	47
7.2.6	Acetilthevetina C.....	48
7.2.7	Nerifolina.....	49
7.2.8	Acetilnerifolina.....	50
7.2.9	Acetilperuvosido.....	51
7.3	Identificación de ácidos grasos.....	52
7.3.1	Determinación del contenido de metales pesados:.....	53
7.3.2	Prueba de inhibición de Acetilcolinesterasa.....	54
7.3.3	Pruebas de inhibición de α -glucosidasa.....	54
7.3.4	Pruebas de inhibición enzimáticas de citocromo P450.....	55
7.3.5	Prueba de viabilidad.....	57
7.3.6	Permeabilidad por células CaCo-2.....	58
8	Conclusiones.....	59
9	Perspectivas.....	59
10	Bibliografía.....	60
11	Anexos.....	65
	Leyenda de los aductos:.....	65





Lista de abreviaturas y acronimos

μg	Microgramo
μm	Micrometro
ABC	Transportador de cassette por enlace ATP
AChe	Acetilcolinesterasa
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
CaCo-2	Células cáncer de colon 2
cAMP	Adenosina Monofosfato Ciclico
Cm	Centímetro
Cofepris	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CYP	Citocromo
ESI	Ionización Electro Spray
<i>Et Al</i>	Y otros (<i>latín: et alili</i>)
EUA	Estados Unidos de America
GI	Gastro Intestinal
HBK	Humboldt, Bonpland y Kunth
HPLC	Cromatografía de líquidos de altas prestaciones
kDa	Kilo Dalton
Kg	Kilogramo
m	Metro
m/z	Relación masa/carga
MDR	Resistencia a múltiples fármacos
Min	Minuto
mL	Mililitros
mM	Milimolar
Mm	Milímetro
NaCaX	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
NaCaX	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
nm	Nanometro
p.f.	Punto de Fusión
PgP	Glicoproteína P
RFU	Unidades de fluorescencia relativa
SLC	Acarreador de solutos
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Periférico
<i>T.</i>	<i>Thevetia</i>
UA	Unidades de Absorbancia
UMA	Unidad Masa Atómica
USAI	Unidad de apoyo a la investigación
UV	Ultravioleta
α -GHY	α -glucosidasa



Indice de imagenes

Figura 1: Primera imagen de <i>Thevetia</i> publicada por André Thevet en "Singularidades de la Francia Antártica ", 1557	2
Figura 2: Pericarpio carnoso de <i>Thevetia thevetioides</i>	2
Figura 3: Endocarpio duro de <i>Thevetia thevetioides</i>	3
Figura 4: Estructura de Thevetina B	7
Figura 5: Estructura de digoxina y digitoxina.	8
Figura 6: funcionamiento de la Na ⁺ /K ⁺ ATPasa.	9
figura7: estructura macroscópica del tracto gastrointestinal	11
Figura 8: Organización general de las capas del tracto GastroIntestinal.	11
Figura 9: Estructura del epitelio del intestino delgado	13
Figura 10: Modelo estructural de PgP.	16
Figura 11: Fotografía microscópica de células CaCo-2 no diferenciadas (A) y diferenciadas (B)..	21
Figura 12: Contribución de los CYP450 al metabolismo de fase I de fármacos	22
Figura 13: estructura de una sinapsis colinérgica	25
Figura 14: Estructura de un pozo transwell.....	37
Figura 15: patrón de fragmentación de los azúcares de los thevetósidos (Thevetina B)	42
Figura 16: patrón de fragmentación de los azúcares de los thevetósidos acetilados (Acetilthevetina B).....	43
Figura 17: Patrón de fragmentación de thevetina A	44
Figura 18: Patrón de fragmentación de thevetina B	45
Figura 19: Patrón de fragmentación de thevetina C	46
Figura 20: Patrón de fragmentación de acetilthevetina A	47
Figura 21: Patrón de fragmentación de acetilthevetina B	48
Figura 22: Patrón de fragmentación de acetilthevetina C	49
Figura 23: Patrón de fragmentación de nerifolina	50
Figura 24: Patrón de fragmentación de acetilnerifolina	51
Figura 25: Patrón de fragmentación de acetilperuvosido	52



Figura 26: Grafica de la inhibición de Acetilcolinesterasa por thevetósidos y neostigmina	54
Figura 27: Grafica de la inhibición de α -glucosidasa por thevetósidos y acarbosa.....	55
Figura 28: Grafica de la inhibición de CYP1A2 por thevetósidos	56
Figura 29: Grafica de la inhibición de CYP2D6 por thevetósidos	56
Figura 30: Grafica de la inhibición de CYP3A4 por thevetósidos	57

Indice de Cuadros

Cuadro 1: Glicosidos cardioactivos de <i>Thevetia spp</i>	5
Cuadro 2: ejemplos de sustratos, inductores y inhibidores de PgP (datos FDA 2006 ; Horn 2004).	17
Cuadro 3: Ejemplos de sustratos, inhibidores y inductores de CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4.....	22
Cuadro 4: Equipos de cromatografía CLAR-EM y condiciones ocupados por el análisis de las fracciones	31
Cuadro 5: Equipos de cromatografía CLAR-EM ocupados por el análisis de las fracciones.....	38
Cuadro 6: Condiciones cromatograficas del análisis de las fracciones	39
Cuadro 7: Rendimiento de los extractos de semillas de <i>Thevetia thevetioides</i>	41
Cuadro 8: datos de analisis de los acidos grasos de <i>T.thevetioides</i>	53
Cuadro 9: Concentraciones de thevetósidos encontradas en dirección A-B y B-A en ensayo por CaCo-2.	58



1 Introducción:

La obesidad y el sobrepeso representan unas de las condiciones patológicas más difundidas de la era contemporánea, estas condiciones están presentes de manera transversal en casi todos los países. Bajo esta situación los sistemas para adelgazar son uno de los negocios más remunerativos que existen en la actualidad.

Actualmente se encuentran en el mercado dos tipos de medicamentos para la pérdida de peso aprobados por Cofepris, los cuales actúan de manera diferente: los anorexígenos (ej. Sibutramina, retirada recientemente) y los inhibidores de la absorción de grasa (ej. Orlistat) (Galicia, 2002).

Sin embargo hay en el mercado más productos de origen natural que se venden por canales alternativos a las farmacias que prometen ayudar a bajar de peso. Mucha gente hace uso amplio de estos productos sin consultar con un médico que lo sugiera y sin considerar los posibles efectos adversos, debido a la difundida percepción de seguridad e inocuidad de los productos naturales.

Entre estos productos se ha resaltado en las noticias de los últimos 15 años el uso del “codo de fraile” (semilla de *Thevetia spp*), comercializado en muchas formas y productos en varios países de Latinoamérica. La popularidad de estas plantas se han manifestado más que en sus presuntas capacidades adelgazantes en sus efectos tóxicos, causando muchas hospitalizaciones por envenenamiento, obligando a la Cofepris (Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios) a prohibirlas en el 2005 (García, 2013).

No obstante las semillas de estas plantas son relativamente fáciles de conseguir en los mercados mexicanos y casos de envenenamientos involuntarios por gente que busca adelgazar siguen encontrándose con cierta frecuencia y son dados a conocer en los medios de comunicación. Relativamente poco se conoce acerca de estas plantas, sin embargo uno de los mecanismos de intoxicación es causado por inhibición de la bomba Na/K del corazón (Bandara, 2010), pero no se conocen con seguridad los mecanismos que llevan a muchas de las complicaciones y efectos adversos de la planta (diarrea, dolor de cabeza, insuficiencia de los riñones, vomito, funciones hepáticas alteradas, dolor y espasmo muscular).

Muchos de ellos (nausea, vomito, diarrea, anorexia, dolor de cabeza, dolor muscular, hepatitis) son efectos de los inhibidores reversibles de la enzima Acetil Colinesterasa (AChE) y de la



intoxicación por digoxina, por tal motivo en este trabajo se investigó si los compuestos activos de esta planta (glicósidos cardioactivos llamados thevetósidos) tienen efectos inhibitorios sobre AChE. De la misma forma se investigó si estos glicósidos son sustratos de la Glicoproteína P como lo es la digoxina. Por otro lado es frecuente la percepción de seguridad e inocuidad de los productos naturales sin tener cuenta de las posibles interacciones con otros medicamentos, por esta razón se decidió investigar también la interacción con Citocromo P450, una superfamilia de enzimas microsomales responsable del metabolismo de muchos xenobióticos. También se investigó la absorción de los glicósidos cardioactivos a través pruebas de permeabilidad por modelos intestinales in vitro utilizando células CaCo2 considerando que los glicósidos pudieran provocar la diarrea por su eliminación hacia el lumen del intestino



2 Marco Teorico

2.1 Familia Apocynaceae

La familia Apocynaceae es un grupo conformado por aproximadamente 1500 especies agrupadas en 180 géneros de gran importancia económica y medicinal; en su mayoría las plantas de esta familia son originarias de regiones con clima tropical y subtropical, y presentan hojas simples, opuestas, alternadas o en ventrículos, y algunos ejemplares presentan estipulas; los frutos pueden ser folículos o drupas, con o sin endospermo y presentan estrategias para la dispersión de los propágulos como alas o tricomios para su dispersión anemófila.

Los géneros más conocidos e importantes de la familia son: *Nerium* (adelfa), *Rauwolfia* (matacoyote), *Acokanthera* (contenente ouabaina), *Plumeria* (Sanjuacoche o Nikte) y *Thevetia* (Endress *et al.*, 2000).

2.1.1 *Thevetia* spp

Thevetia es un género de la familia de las Apocynaceas originario de las zonas tropicales y subtropicales de América, el género se encuentra como planta ornamental a lo largo de toda América y en el sureste de Asia.

El nombre del genero fue bautizado así en homenaje al monje francés André Thevet (1502-1590) quien describió por vez primera a la especie conocida ahora con el nombre de *Thevetia ahouai* (Figura 1) en Sudamérica (Pelt, 1999).

T. peruviana es la especie mas difundida pero hay muchos nombres que son comunes para las varias especies de *Thevetia*, entre los más conocidos son “Gorro de Napoleón” (Brasil), Árbol del suicidio (Sri Lanka, India y Filipinas) y “oleandro amarillo” (internacional).

En México los nombres tradicionales varían dependiendo del estado, los más comunes son “Yoyotl” y “codo (o hueso) de fraile”, pero se puede encontrar también bajo el nombre de “Yucacaca”, “calaverita” (Oaxaca), “Chavaquin” (Guanajuato), “narciso amarillo” (morelos), “cabrito” (Jalisco), “Akitz” (Yucatán), “Regajar” (Nayarit), huevos de gato, cobalonga o joyote (Bruneton, 2001 ; Rojas, 2009).



2.1.2 *Thevetia thevetioides*

Thevetia thevetioides (H.B.K) es la especie que tiene las flores y las semillas más grandes del género *Thevetia* aunque su cultivo por uso ornamental es menor respecto a la más difundida *Thevetia peruviana*.

2.1.2.1 Morfología

Es un arbusto que mide de 3 a 9 m de altura, el tallo es de color gris, las hojas son angostas y miden hasta 15 cm de largo y de 6 a 10 mm de ancho, son brillantes en el anverso y peludas en el reverso, este arbusto florece y fructifica principalmente en la época lluviosa, de junio a septiembre. La corola es de 8 a 9 cm de largo, de color amarillo, las flores son amarillas o con tonos anaranjados y aparecen en racimos que tienen pocas flores; los frutos carnosos son verdes,

globosos, de unos 4 cm de longitud, 3 de ancho y 3 de grueso y tienen un pericarpio carnoso (Figura 2) conteniendo un endocarpio duro, de forma casi triangular que en la madurez toma un color café claro (Figura 3), el número de semillas presente en cada endocarpio es variable de 1 hasta 4. (Martínez, 1999)

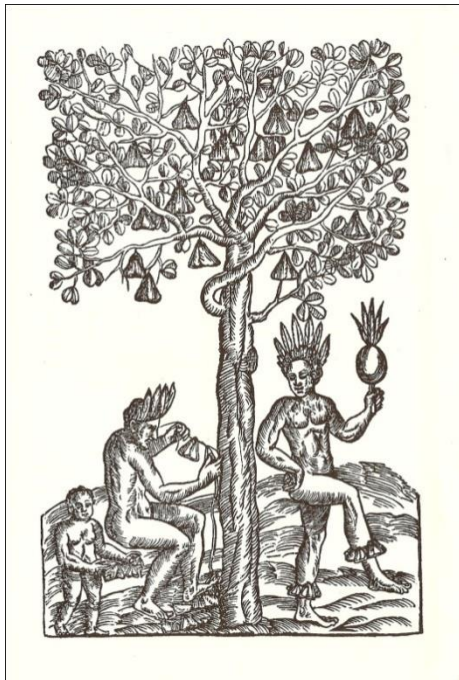


Figura 1: Primera imagen de *Thevetia* publicada por André Thevet en "Singularidades de la Francia Antártica", 1557



Figura 2: Pericarpio carnoso de *Thevetia thevetioides*



Figura 3: Endocarpio duro de *Thevetia thevetioides*

2.1.2.2 Distribución

T. thevetioides es una especie endémica del centro y sur de México, se encuentra en los estados de Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Michoacán, Estado de México, Morelos, Puebla, Guerrero, Oaxaca, Yucatán.

Crece en altitudes de 1900-2200 msnm en zonas con clima cálido, semicálido y templado, forma parte del bosque tropical caducifolio, bosque mesófilo de montaña, bosque espinoso, bosque de encino y de pino (Rosas, 2012)

2.1.3 Etnobotánica de *Thevetia spp*

Las hojas son empleadas para combatir padecimientos bucales como dolor de muelas y caries, el látex de la planta se utiliza para el tratamiento de la sordera y también para el tratamiento de afecciones cutáneas como barros, espinillas y para quitar las inflamaciones ocasionadas por las picaduras de alacrán (Argueta *et al.*, 1994).

Las semillas contienen una mayor concentración de glicósidos cardioactivos (thevetósidos) que las demás partes de la planta; estas sustancias son potencialmente fatales, por esta razón el uso medicinal reportado de las semillas es casi siempre externo, molidas y mezcladas en pomadas se emplean para el tratamiento de las hemorroides y en infusión para el tratamiento de tumores de la piel, barros, espinillas y picaduras (Villacis, 1978).

Hay uso reportado de la planta también para el tratamiento de dos “enfermedades culturales” como el mal de ojo y la mollera caída (Argueta *et al.*, 1994).

En la actualidad los usos más difundidos del codo de fraile son: para la pérdida de peso, comiendo un pequeño pedazo de semilla al día, y para cometer suicidio comiendo varias



semillas a la vez.

2.1.4 Estudios sobre las actividades de *Thevetia* spp

Mientras que en *T. thevetioides* sólo fue evaluada su actividad insecticida (McLaughlin *et al.*, 1980) y antitumoral *in vitro* (Galsky *et al.*, 1980), se han reportado muchos estudios sobre especies diferentes de *Thevetia*, principalmente *T. peruviana* o *T. nerifolia*, en las cuales se evaluó su actividad *in vitro* como inhibidor de la HIV-1 integrasa y transcriptasa inversa (Tewtrakul *et al.*, 2002), su efecto antiinflamatorio (Thilagavati *et al.*, 2010) y su actividad antifúngica (Gata-Gonçalves *et al.* 2003; Ambang *et al.* 2010).

Debido a un contenido de aceite del 40% (rosas, 2012) fueron evaluadas también su calidad como alimento para ganado (Atteh *et al.*, 1995; Ibiyemi *et al.*, 2002) y su potencial como fuente para obtener biocombustible (Balusami *et al.*, 2007, 2010; Kandasami *et al.*, 2011; Deka *et al.*, 2011). Pero la mayoría de los estudios son sobre sus efectos como veneno: su difusión a nivel social (Eddleston *et al.*, 1999), los síntomas del envenenamiento (Eddleston *et al.*, 2000) y las medidas necesarias para contrarrestarlo (Roberts *et al.*, 2006; De silva *et al.*, 2003; Peiris John *et al.*, 2008).

2.1.5 Efectos adversos de la asunción de *Thevetia* spp

Las síntomas comunes de un envenenamiento de moderada intensidad incluyen náusea, vómito, anorexia, dolor abdominal/muscular, diarrea, arritmias, hiperpotasemia (por disminución de actividad renal), el cuadro clínico de los pacientes envenenados por semillas de *Thevetia* es parecido al cuadro clínico de los pacientes con sobredosis de digoxina, en los envenenamientos más severos hay una fibrilación ventricular resistente al tratamiento con desfibriladores, mientras en los casos de moderada intensidad se presenta una prolongación del intervalo entre las fases P y R del electrocardiograma y en su progresión una disociación de la actividad atrio ventricular. (Eddleston *et al.*, 2000).

Los electrocardiogramas de la mayoría de los pacientes presentan anomalías en la conducción eléctrica en el nódulo sinoauricular (el “marcapasos” del corazón, controlado por el sistema autónomo).

Los análisis sanguíneos demuestran en todos los pacientes un nivel alto de K⁺, un porcentaje alrededor del 25% de los pacientes presentan un aumento del nivel de creatinina cinasa (indicador de daño muscular) y un aumento del nivel de glucosa, mientras porcentajes inferiores al 10% de los pacientes presentan niveles elevados de glutamil transferasa y aspartato transaminasa (indicador de daño hepático), creatinina y urea. El nivel de proteínas plasmáticas en todos los pacientes presenta niveles normales. (Eddleston *et al.*, 2000; Bandara *et al.*, 2010).



2.1.6 Estudios sobre la fitoquímica de *Thevetia spp*

No obstante el uso tradicional se refiera a varias especies de *Thevetia* la especie que fue estudiada más es *Thevetia peruviana* cuyas semillas contienen una alta cantidad de grasa (40.03 %), principalmente saturada, este porcentaje está formado principalmente por ácido Palmítico (30.26%), Butírico (20.95%), Esteárico (14.5%) y Oleico (10.1%) (Rosas, 2012). En estudios sobre la fitoquímica de las hojas y raíces de *Thevetia spp* se han encontrado numerosos compuestos, principalmente en formas de glicósidos, como son los monoglucósidos de los iridoides, llamados Thevesido y Theveviridosido y 4 derivados de los mismos (Abe *et al.*, 1995), 3 polihidroxidinormoterpenoides y apiosilglicosidos de los mismos (Abe *et al.*, 1996), 12 glicósidos de flavonoides entre los cuales destacan los que están constituidos por una aglicona de tipo flavanona (peruvianoside I y II) y flavonol (peruvianoside III) (Tewtrakul *et al.*, 2002) mientras en la flor se han encontrado los flavonoides kaempferol y quercetin-7-*o*-galactosido (Thilagavati *et al.*, 2010).

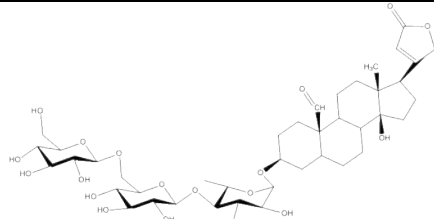
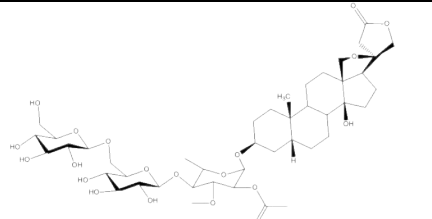
Algunos autores (Rojas, 2009; Zibbu & Batra, 2011; Rosas, 2012; Sowjanya *et al.*, 2013) hablan de la presencia de alcaloides en la planta entera y especialmente en las raíces, pero los análisis de los trabajos que citan son genéricos, se refieren a trabajos de análisis proximal o las referencias se encuentran incompletas.

2.1.6.1 Glicosidos cardioactivos

Los compuestos más estudiados de *Thevetia* son los glicósidos cardioactivos (thevetósidos) que se han encontrado en toda la planta (Abe *et al.*, 1992) sin embargo, son las semillas la principal fuente y forma de ser consumidos (Chen & Chen, 1934; Kolsh *et al.*, 2010).

En el Cuadro 1 se resumen las estructuras de los thevetósidos encontrados en *Thevetia spp*. Estos estudios se han hecho principalmente sobre *Thevetia peruviana* y, con excepción de nerifolina y acetilnerifolina (McLaughlin *et al.*, 1980), nunca se ha reportado su presencia en *Thevetia thevetioides*.

Cuadro 1: Glicosidos cardioactivos de *Thevetia spp*

thevetin A (Kolsh <i>et al.</i> , 2010)		Acetilthevetina C (Kolsh <i>et al.</i> , 2010)	
--------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------



Acetilthevetina A (Kolsh <i>et al.</i> , 2010)		Nerifolina (McLaughlin <i>et al.</i> , 1980)	
Thevetina B (Kolsh <i>et al.</i> , 2010)		Acetilnerifolina (McLaughlin <i>et al.</i> , 1980)	
Acetilthevetina B (Kolsh <i>et al.</i> , 2010)		Peruvoside (Villa <i>et al.</i> , 2011)	
Thevetina C (Kolsh <i>et al.</i> , 2010)		Ruvoside (Campos Paniagua, 2009)	

La estructura de los thevetósidos difiere de la estructura de los digitálicos por la estructura de la porción glicosídica más que por la aglicona. Los azúcares de los glicosidos de *Thevetia* son dos (Figura 4), la gentobiosa (también conocido como disacárido de amigdalosa) de fórmula $C_{12}H_{22}O_{11}$ compuesto por dos unidades de D-glucosa unidas a través de un enlace $\beta(1\rightarrow6)$ glicosídico y la thevetosa (monosacárido de fórmula $C_7H_{14}O_5$) que se encuentra acetilado en posición 2' en las formas acetiladas de los thevetósidos.

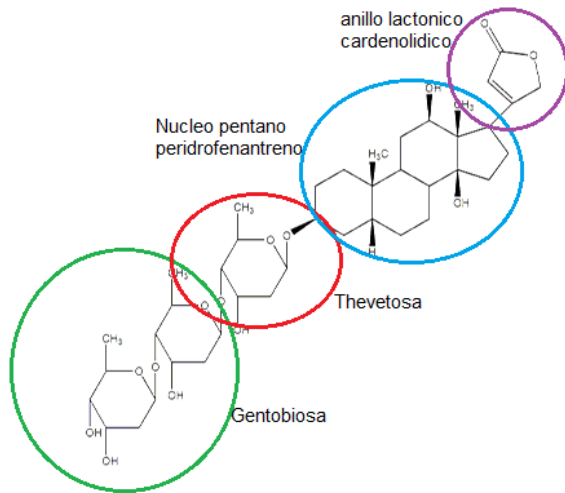


Figura 4: Estructura de Thevetina B

2.1.6.2 Glicósidos cardioactivos de *Digitalis spp* (digitálicos)

Estos compuestos vienen de las plantas del genero *Digitalis* (principalmente *D.lanata* y *D.purpurea*), familia Plantaginaceae, en México conocidas como “dedalera” y fueron los primeros compuestos descubiertos para el tratamiento de las fallas cardíacas congestivas (William Withering, 1785).

Los thevetósidos tienen mucha similitud con los digitálicos por estructura (por ejemplo la aglicona de Thevetina B es la misma de digitoxina) y efecto, estos compuestos son muy estudiados y ofrece una pauta para entender más el efecto de los compuestos obtenidos en este trabajo.

Los digitálicos son glicósidos cardioactivos, potentes fármacos cardiovasculares con un bajo índice terapéutico y una alta incidencia de complicaciones iatrogénicas.

Digoxina es el compuesto más utilizado en terapéutica y se prescribe para el control de la frecuencia, la fibrilación auricular, taquicardia e insuficiencias cardíacas congestivas (Kinlay, 1995).

Los digitálicos son cardenólidos, glicósidos cuya aglicona presenta un núcleo Ciclo pentano perhidrofenantreno y un anillo lactónico insaturado de 5 miembros (Figura 5).

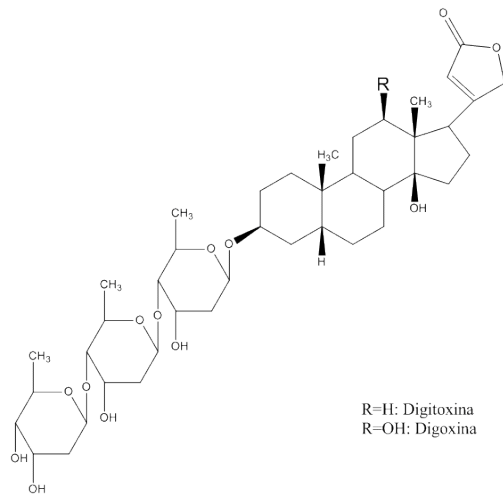


Figura 5: Estructura de digoxina y digitoxina.

2.1.6.2.1 Farmacocinética

La absorción por vía oral de los digitálicos puede variar según la estructura, Digoxina tiene valores de biodisponibilidad entre 65%-80% y una vez en el torrente sanguíneo los glicósidos se distribuyen ampliamente en los tejidos, teniendo la posibilidad de pasar la Barrera hematoencefálica (Sugimoto *et al.*, 2011) se distribuyéndose en el Sistema Nervoso Central (Batrakova *et al.*, 2001).

Digoxina tiene un escaso metabolismo, dos terceras partes se expulsan por los riñones en forma inalterada y tiene una vida media de 36-40 horas en pacientes que no tengan alteraciones de las funciones renales (Marcus *et al.*, 1964).

2.1.6.2.2 Farmacodinámica

Todos los digitálicos que se han estudiado tienen efecto inhibitor de la $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPasa}$ (Lingrel & Kuntzweiler, 1994) (Figura 6).

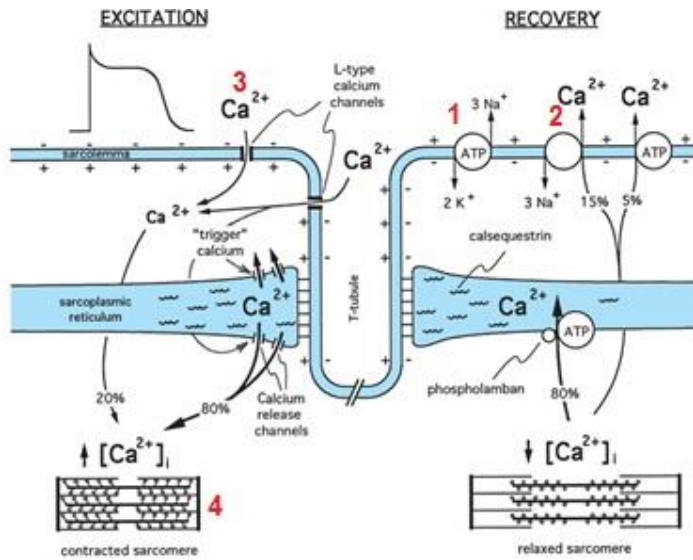


Figura 6: funcionamiento de la Na^+/K^+ ATPasa.

La inhibición de esta ATPasa es responsable del efecto terapéutico de los digitálicos (efecto inotrópico positivo) y también de una porción importante de la toxicidad de los mismos. El aumentada contracción del sarcómero cardiaco mediada por digitálicos pasa a través de estos eventos:

- 1) Inhibición de la Na^+K^+ ATPasa y aumento de la concentración de Na^+ adentro del sarcolema.
- 2) Con el aumento de Na^+ se obtiene la reducción de la expulsión de Ca^{2+} por la NaCaX (intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$) y aumento de la concentración de Ca^{2+} .
- 3) Este cambio en el potencial del tejido activa los canales de Calcio voltaje dependientes que permiten la entrada de Ca^{2+} a través del sarcolema.
- 4) Combinación de troponina con Ca^{2+} que permite la formación del complejo de actina que lleva a la contracción del sarcómero.

Los digitálicos afectan a todos los tejidos excitables, incluido el musculo liso y el sistema nervioso central.

El tracto gastrointestinal es el más afectado por los digitálicos luego del corazón, por efecto directo e indirecto (a través del SNC), los efectos incluyen anorexia, nausea, vomito y diarrea. El SNC es afectado por estimulación eléctrica del nervio vago y de la Zona Gatillo Quimiorreceptora que incluyen algunos de los efectos sobre el tracto gastrointestinal (Nausea, vomito, diarrea), desorientación, disturbios visuales y alucinaciones (Trevor et al., 2009).



2.2 Importancia de la absorción gastrointestinal

La absorción de un fármaco está influenciada por muchos factores fisiológicos, pero también depende de la solubilidad, tamaño de la partícula, lipofilidad, pKa etc.

Las moléculas solubles en lípidos penetran la membrana directamente a través de la porción lipoproteica. Los poros acuosos dan a las membranas epiteliales libre permeabilidad al agua a los iones monovalentes y a solutos hidrofílicos de tamaño molecular pequeño como la urea. Los acarreadores en la membrana transportan sustancias solubles en agua a través de los lípidos, interactuando con el soluto para darle temporalmente solubilidad en las grasas.

El transporte de fármacos y otras sustancias directamente a través de los lípidos o canales acuosos es llamado difusión pasiva. La transferencia de moléculas polares, mediada por acarreadores es llamada difusión facilitada o en algunos casos, transporte activo.

La inmensa mayoría de los fármacos de uso clínico son administrados oralmente y deben cruzar esta barrera antes de alcanzar la circulación sistémica y ejercer su efecto terapéutico en el sitio donde se requiere su acción.

De aquí que las características de la barrera gastrointestinal son de considerable importancia.

La velocidad de difusión depende del coeficiente de reparto de la sustancia que difunde entre el material de la membrana y el fluido de los alrededores. Por lo tanto la composición lipídica de la membrana es un factor importante para la difusión.

El análisis de los lípidos a partir de las membranas microvellosas de la rata tiene una gran variedad de lípidos químicamente diferentes.

El coeficiente de reparto de un fármaco se determina usando modelos de sistemas de reparto en los cuales los lípidos de la membrana son remplazados por disolventes orgánicos los cuales son parcialmente miscibles con el agua.

Sin embargo no hay una clara correlación entre el coeficiente de reparto y la velocidad de absorción. La correlación depende del disolvente orgánico seleccionado y no existe un solo disolvente especial que pueda dar resultados 100% comparables con la mezcla compleja de los lípidos intestinales (Yu, 1996; Gibaldi, 1991).

2.2.1 Fisiología Gastrointestinal

Los principales componentes del tracto Gastrointestinal son el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso o colon (Figura 7).

La estructura del tracto gastrointestinal varía mucho de una región a otra, aunque existen rasgos comunes en la organización general del tejido (Figura 8) que fundamentalmente está compuesto por la mucosa, la submucosa y la capa muscular externa.

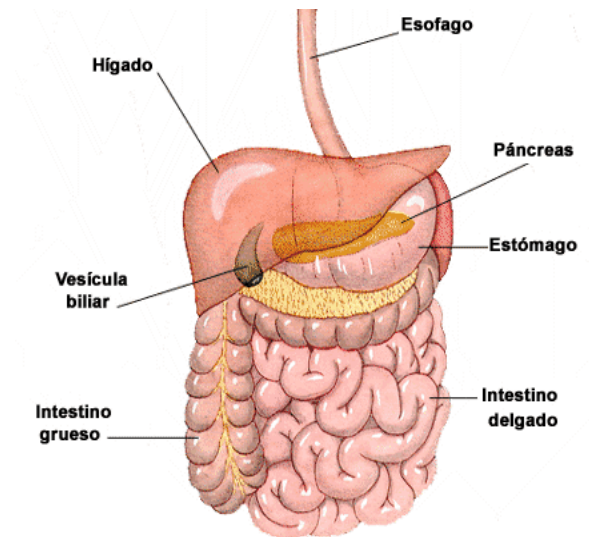


Figura7: estructura macroscópica del tracto gastrointestinal

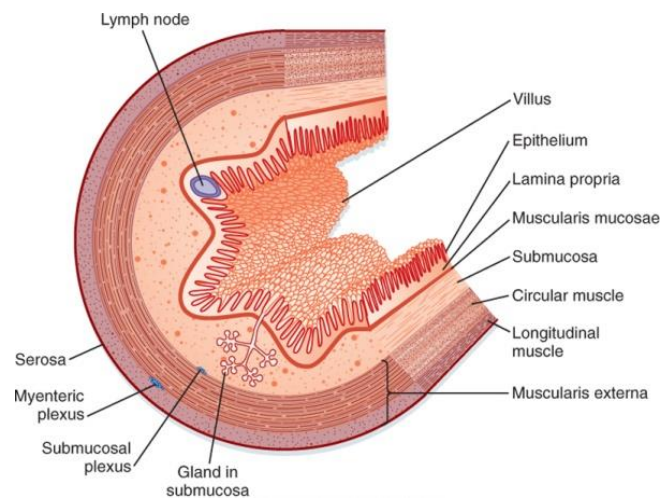


Figura 8: Organización general de las capas del tracto GastroIntestinal.

La mucosa está formada por el epitelio, la lámina propia, la capa muscular de la mucosa y la serosa. El epitelio es una capa única de células especializadas que reviste la luz del tracto gastrointestinal cuya naturaleza varía mucho de una parte a otra del tracto digestivo. La lámina propia está formada sobre todo por tejido conjuntivo laxo que contiene colágeno y fibrillas de elastina, es rica en diversos tipos de glándulas y posee ganglios linfáticos y capilares. La capa más interna y delgada del músculo liso intestinal es la capa muscular de la mucosa, cuyas contracciones provocan pliegues y crestas.

La submucosa está formada principalmente por tejido conjuntivo laxo con colágeno y fibrillas de elastina. En algunas regiones hay glándulas submucosas. Los mayores troncos nerviosos y vasos



sanguíneos de la pared intestinal se hallan en la submucosa.

La capa muscular externa está formada por el músculo circular (interno), músculo longitudinal y está cubierta por la serosa, sus contracciones tienen la función de mezclar y desplazar el contenido de la luz intestinal a lo largo del tracto gastrointestinal (Barne & Levy, 2001).

2.2.2 Estómago

La superficie del estómago es más limitada porque carece de microvellosidades, además las uniones entre las células epiteliales son firmes y esto hace que el estómago sea un órgano de escasa absorción. Sin embargo, y a pesar de las características antes mencionadas en el estómago se pueden absorber pequeñas cantidades de ácidos débiles y moléculas pequeñas como el alcohol (Schanker, 1957; Hogben, 1957; Le, 2014).

2.2.3 Intestino grueso o colon

La superficie del colon al igual que la del estómago es bastante limitada porque carece de pliegues circulares y vellosidades, de manera tal que la mucosa tiene un aspecto liso. Entre las criptas se encuentra un número elevado de células caliciformes que le permite una rápida renovación del epitelio cuyas células se encuentran más apretadas que las del intestino delgado. Las condiciones de pH (7.0) adentro del colon son diferentes con respecto al intestino delgado, el pH es ligeramente más ácido que en el íleon (7.5) (Evans, et al., 1988) debido a la presencia de flora bacteriana capaz de fermentar fibras con productos como acetato, butirato, propionato y CO₂ (Miller, 1996) y el contenido de agua es inferior debido a la absorción necesaria a la formación de heces (Yuasa, 2008).

El intestino grueso es una zona importante para la absorción de iones Na⁺ y Cl⁻ y puede servir como zona de absorción por medicamentos administrados en formas farmacéuticas de liberación retardadas (ej. ácido 5-Aminosalicílico, Mebeverina), y medicamentos que tienen una absorción muy lenta (Prasad *et al.*, 2011).

2.2.4 Intestino delgado

El intestino delgado con su longitud de 5 metros promedio representa tres cuartas partes de la longitud del tubo digestivo en el hombre y se divide en tres partes, la más proximal es el duodeno (5% de longitud del intestino delgado), luego sigue el yeyuno (40% de longitud) y lo más distal es el íleon (55% de longitud).

El ambiente del intestino delgado varía entre el pH 6 del duodeno y el pH 7.4 del íleon y es el sitio más importante para la absorción de los fármacos en el tracto gastrointestinal, debido a la presencia de un gran número de acarreadores y a la estructura de los enterocitos organizados en microvellosidades, su superficie total suma alrededor de 250m² (Fallingborg, 1999; Berne &



Levy, 2001).

2.2.4.1 Células epiteliales del intestino delgado

Las células epiteliales sirven como barrera entre los compartimentos luminal y tisular, son la principal barrera para la absorción de los fármacos administrados oralmente, cada célula epitelial está unida a su vecina por estructuras conocidas como uniones estrechas. Los enterocitos son las células epiteliales del intestino, tienen forma cilíndrica y una terminación apical, hacia el lumen del intestino, conocida con el nombre de borde en cepillo constituida por microvillosidades de la membrana plasmática. Las microvillosidades son las responsables de la gran extensión del área del intestino delgado y contienen enzimas digestivas que terminan el proceso de digestión y facilitan la absorción (Figura 9).

Abajo del borde de cepillo hay mitocondrias que suministran a la célula la energía oxidativa necesaria para el transporte activo de sustancias a través del epitelio intestinal y entre los enterocitos se encuentran las células caliciformes productoras de moco (Muñoz, 2001).

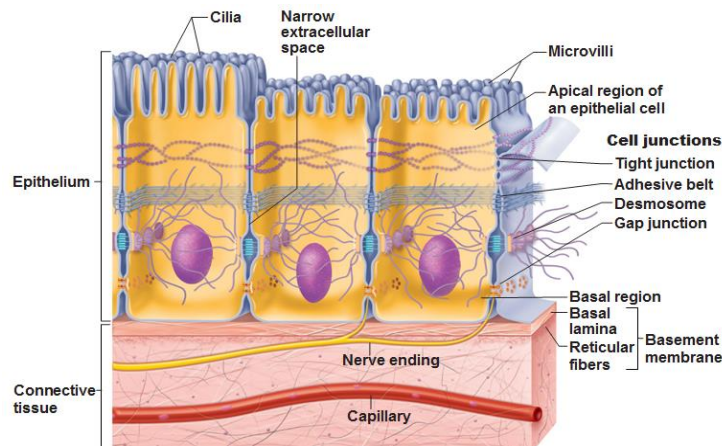


Figura 9: Estructura del epitelio del intestino delgado

2.2.4.2 Enzimas del intestino delgado

En la mayoría de los casos, las células que revisten el tubo digestivo no pueden absorber los nutrientes tal como llegan con la alimentación. La digestión consiste en los procesos de escisión de las moléculas ingeridas en otras de tamaño inferior mediante reacciones catalizadas por enzimas de las secreciones gastrointestinales o de la superficie luminal del tubo digestivo. El objetivo de estos procesos es obtener unidades de tamaño adecuado para ser absorbidas a través de la luz del tracto gastrointestinal.

La digestión de las proteínas en el intestino delgado requiere de proteasas y peptidasas (ej. tripsina, quimotripsina y carboxipeptidasa) que se obtienen en forma inactiva del jugo



pancreático y se activan por medio de enzimas como la enterocinasa. Esto permite tener en el intestino delgado pequeños péptidos (de dos a cuatro unidades de aminoácidos) y aminoácidos simples que serán absorbidos por los enterocitos a través de transportadores específicos.

El citosol de los enterocitos contiene peptidasas que permiten hidrolizar los péptidos y obtener los aminoácidos simples que alcancen el torrente de la sangre.

Los carbohidratos se adquieren principalmente en la dieta en forma de polisacáridos (amilopectina, glucógeno), disacáridos (sacarosa, maltosa, lactosa) y monosacáridos (glucosa, fructosa), su absorción es posible sólo en la forma de monosacáridos.

Los polisacáridos son atacados por las α -amilasas de la saliva en la boca y por las del jugo pancreático en el duodeno así que llegan al intestino delgado en forma de oligosacáridos y disacáridos donde las enzimas encargadas de la digestión son específicas por el tipo de enlaces. Las principales oligosacaridasas del intestino delgado son la lactasa (divide lactosa en glucosa y galactosa), la sacarasa (divide la sacarosa en glucosa y fructosa), la α -dextrinasa (o isomaltasa, rompe los enlaces α 1-6 en los puntos de ramificación) y la α -glucosidasa (rompe los enlaces α 1-4 terminales de los malto oligosacáridos liberando glucosa).

Estas enzimas tienen una distribución máxima en el borde de cepillo del yeyuno proximal y van disminuyendo a lo largo del resto del intestino delgado (Berne & Levy, 2001).

2.2.4.2.1 α -Glucosidasa

Las glucosidasas son un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces glicosídicos de carbohidratos complejos como oligosacáridos, polisacáridos y glucoconjugados cuyo resultado son monómeros de glucosa en forma de hemiacetal.

La α -Glucosidasa se encuentra en el contorno del intestino delgado, donde se realiza el último paso de la digestión de los carbohidratos e hidroliza oligosacáridos y disacáridos que poseen α -D-glucosa terminal con enlaces 1 \rightarrow 4 glicosídicos liberando α -D glucosa.

Existen varias familias de α -glucosidasa diferenciadas por el mecanismo de hidrólisis, las de *Saccharomyces cerevisiae* son de las familias GH 13 y GH 31 (Flores, 2013; Kuriki, 1999).

2.2.4.2.2 Inhibidores de α -glucosidasa

La liberación de α -D-glucosa en el intestino delgado es de vital importancia para continuar con el metabolismo de los carbohidratos, así que la inhibición de la actividad de α -glucosidasa es un paso clave en el tratamiento de algunos tipos de enfermedades como la diabetes mellitus de tipo 2 y en las terapias para bajar de peso (Wolever, 1997).

El uso de fármacos que inhiben la actividad de las α -glucosidasas es útil para retrasar la liberación de glucosa proveniente de la dieta y por ende su absorción a nivel intestinal



produciendo una importante disminución del pico postprandial de glucosa en sangre. Los inhibidores de α -glucosidasa ocupados en la terapia de la diabetes son principalmente acarbosa, miglitol y voglibosa y ofrecen la posibilidad de detener la progresión de esta enfermedad y pueden ser ocupados para el tratamiento de condiciones prediabéticas (Moorthy, 2012)

Los efectos secundarios de estos medicamentos son principalmente diarrea y flatulencia debido a la presencia de residuos no hidrolizados de hidratos de carbono que pueden causar aumento de la presencia de agua en el lumen del intestino y fermentación por la flora bacteriana (Lebovitz, 1997).

2.2.4.3 Transportadores del intestino delgado

Las proteínas transportadoras pueden dividirse en transportadores de eflujo y de influjo, los primeros son de la familia de los ATP-binding Cassette (ABC) y los segundo de la familia de los solute_carrier (SLC). Estas dos familias de transportadores regulan el influjo de los xenobióticos a través de las membranas celulares y su expresión y actividad en las membranas basales y apicales del epitelio son determinantes para la biodisponibilidad y absorción de los fármacos, de consecuencia por sus efectos terapéuticos y tóxicos.

Las familias de transportadores de influjo SLC presentes en el intestino delgado son SLC15 (sustratos: Ampicilina, amoxicilina), SLC22 (sustratos: metformina, quinina, verapamilo) y SCL0 (sustratos: indometacina, ouabaina, atorvastatina) mientras las familias de transportadores de eflujo ABC son ABCB (sustratos: verapamilo, digoxina, propranolol), ABCC (sustratos: vinblastina, morfina, furosemida) y ABCG (sustratos: topotecano, cimetidina, ofloxacina) (Russel, 2010).

2.2.4.3.1 Glicoproteína P

El concepto de resistencia a los fármacos se empezó a notar en 1907 por el Dr. Paul Ehrlich, que en sus estudios sobre compuestos de Arsenico para la cura de la sífilis, notó una resistencia de los parásitos (*Treponema pallidum*) al Salvarsán, el fármaco que hasta ese entonces era el fármaco de elección para esa enfermedad. Desde ese entonces se empezaron a buscar estrategias para evitar este problema y a caracterizar preferentemente el mecanismo de resistencia a los fármacos.

Las primeras hipótesis sobre la existencia de la Glicoproteína P fueron formuladas en el 1974, cuando en experimentos sobre células de ovarios de hámster resistentes a algunos fármacos se notó que la presencia de cianuro (inhibidor de la producción de energía) sensibilizaba las células a los fármacos, es decir, no podía transportarlos al exterior, mientras que cuando el cianuro era lavado y eliminado de la célula, el metabolismo normal se restauraba y la célula una vez más lo expulsaba. Esto afirmaba que el sistema de expulsión de los fármacos estaba relacionado con un



transporte dependiente de ATP (Till & Ling, 1974).

Se seleccionaron fenotipos de las células resistentes que expresaban una alteración de la membrana y se clasificaron como MDR (Multi Drug Resistance) (Carlsen *et al.*, 1976). Estudios de marcaje de superficie celular y electroforesis revelaron que esas células en sus membranas expresaban un único componente que aparentemente contenía carbohidratos y que no se observa en las células originarias que no expresaban resistencia.

A través de estudios de incorporación metabólica de precursores de hidratos de carbono y proteína y de proteólisis selectiva, este componente demostró ser una glicoproteína de membrana de peso alrededor de 170 kDa cuya presencia se correlacionaba cuantitativamente con el grado de quimiorresistencia de la célula y disminución de la permeabilidad de un amplio número de fármacos aparentemente no correlacionados entre ellos (Estrada, 2014).

Esta glicoproteína fue purificada por la primera vez en 1979, nombrada Glicoproteína P y su presencia en las membranas celulares fue relacionada con la expresión del gen MDR-1 que fue secuenciado y clonado en 1986 (Ueda *et al.*, 1986).

2.2.4.3.2 Características de la Glicoproteína P

La glicoproteína P (PgP) es una proteína transmembranal de 170kDa codificada por el gen MDR1, sobreexpresada en los fenotipos MDR, la cual posee 12 segmentos transmembranales así como dos dominios intracitoplasmáticos de unión a moléculas de ATP y tres sitios de glicosidación (Figura 9).

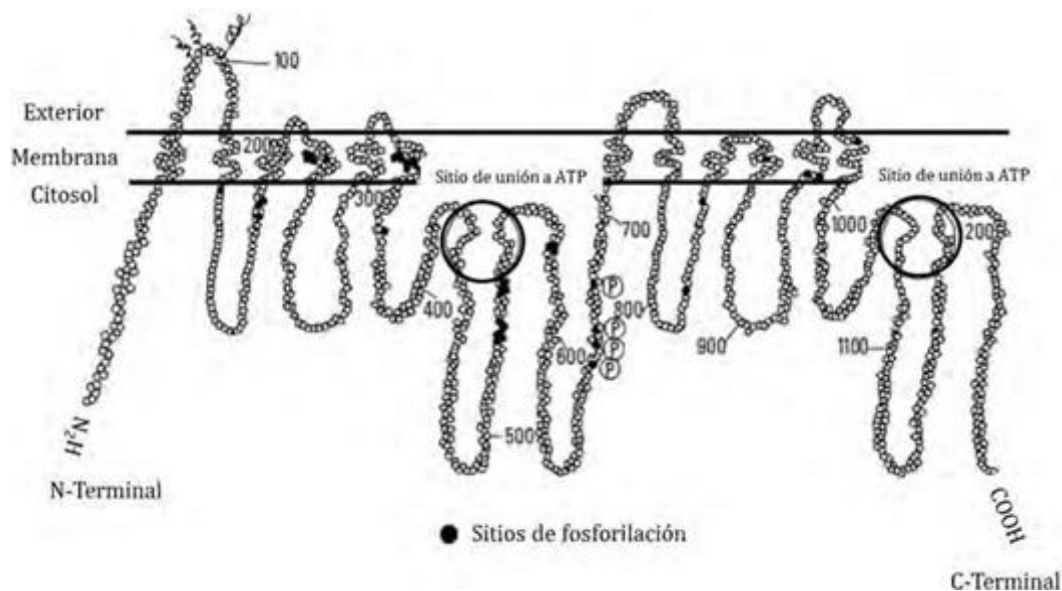


Figura 10: Modelo estructural de PgP.



La Pgp pertenece a la superfamilia de bombas de eflujo ABC (ATP-binding cassette) y funciona como un transportador dependiente de energía que expulsa desde el interior de la célula un amplio rango de sustratos estructuralmente y funcionalmente diversos. Estas interacciones, con compuestos estructuralmente diversos, sugieren diferentes entornos químicos de sus múltiples sitios de unión.

La sobreexpresión de la Pgp en células tumorales provoca la expulsión de fármacos anticancerígenos lipofílicos y anfipáticos lo que disminuye su concentración intracelular evita que los mismos ejerzan su actividad citotóxica. Es por esta razón que sus inhibidores son utilizados como coadyuvantes de las terapias antitumorales (Thomas & Coley, 2003).

La Pgp se encuentra expresada en condiciones normales en varios tejidos tales como el intestino delgado, el colon, barrera hematoencefálica, testículos y placenta donde sirve como barrera para la absorción de xenobioticos y para permitir su expulsión.

Su importancia terapéutica se debe también a la amplia variedad de sustratos que abarca que pueden limitar la biodisponibilidad y la absorción de medicamentos (Cuadro 2).

Cuadro 2: ejemplos de sustratos, inductores y inhibidores de Pgp (datos FDA 2006 ; Horn 2004).

Sustratos	Inhibidores	Inductores
Propranolol	Claritromicina	Rifampicina
Digoxina	Ciclosporina	Hierba de San Juan
Digitoxina	Ketoconazol	Carbamazepina
Loperamida	Quinidina	Ácido retinoico
Vinblastina	Verapamilo	Fenobarbital

2.3 Métodos de estudio para la investigación de la absorción intestinal

Los métodos más comúnmente utilizados para estudiar la absorción intestinal de los fármacos se clasifican en dos grandes categorías: métodos *in vivo* y métodos *in vitro*.



2.3.1 Métodos *in vivo*

Los métodos *in vivo* miden la aparición de un agente dado en los compartimentos corporales o fluidos, especialmente sangre y orina, después de la administración oral y/o miden la desaparición de un agente dado a partir del tracto gastrointestinal.

2.3.1.1 Métodos *in situ*

El término latino *in situ* significa “en el lugar” y se refiere a métodos de investigación que se enfocan en un órgano específico mientras se encuentra todavía en el organismo completo, a diferencia de *in vitro* donde el órgano se aísla del cuerpo del cual hace parte.

Los dos métodos de absorción mayormente ocupados en estudios con animales pertenecen a esta categoría y son la modificación de los métodos de perfusión y de asa cerrada.

2.3.1.1.1 Método de perfusión

Aunque el método de perfusión ha sido usado en algunos estudios de absorción de fármacos en realidad tiene varias desventajas relacionadas con el mantenimiento del animal en completa anestesia y al mismo tiempo asegurar (con equipos externos) la circulación o recirculación del fluido de perfusión y mantener al animal y al fluido calientes.

Otra desventaja es que esta técnica considera absorbido un fármaco que desaparece del flujo sanguíneo sin tomar en cuenta la cantidad del mismo que se puede unir al tejido intestinal, puede quedar atrapada en el interior celular etc. (Rabinowitz, 1971)

2.3.1.1.2 Método de asa cerrada

El método de asa cerrada reduce los problemas asociados con el método de perfusión citados anteriormente.

Este método se puede aplicar en animales grandes y pequeños para la cual se requiere administrar intraperitonealmente un anestésico de acción larga adecuado.

Con un diseño apropiado esta técnica puede ser usada para estudiar la velocidad, grado y los mecanismos de absorción lo más cercano a lo fisiológico.

Sus ventajas son la posibilidad de investigar la absorción de manera independiente del tiempo de vaciamiento estomacal o tiempo de paso intestinal, la comparación de las diferentes secciones del tracto GI y la posibilidad de separar los efectos de la circulación entero hepática. (Gibaldi *et al.*, 1991 ; Suzuki *et al.*, 1993)



2.3.2 Métodos *in vitro*

La elaboración de diversas técnicas *in vitro* ha aumentado considerablemente los conocimientos sobre la absorción intestinal en los últimos años. En las investigaciones *in vitro* las preparaciones no están sujetas al flujo sanguíneo, de manera que la situación llega a ser excepcionalmente clara y las muestras para el análisis son fáciles de obtener.

Además, las preparaciones dependen del mantenimiento y de la vitalidad del órgano o tejido por lo cual en muchos casos es suficiente mantenerlo en contacto con un líquido de composición adecuada y oxigenado.

Ya que la medida de transporte sólo se puede realizar cuando el soluto permanece en su estado inicial a través de los procesos de transferencia, cualquier unión del soluto a componentes tisulares puede ser una fuente de error considerable.

Las ventajas de estos métodos son que permiten aislar los factores involucrados en el transporte y así poder sacar conclusiones juntando los distintos resultados (Rabinowitz, 1971).

2.3.2.1 Técnicas *ex vivo*

De las técnicas *ex vivo* posiblemente la más utilizadas la de saco intestinal invertido, esta técnica simple permite la estimación a grosso modo de las funciones secretoras o de absorción.

En este procedimiento, segmentos pequeños del intestino son invertidos, llenados con un fluido y cerrados en ambos extremos; los segmentos son suspendidos en la misma solución que ocupa el interior del saco intestinal.

Esta inversión permite la adecuada oxigenación de la superficie mucosal, eliminando el elaborado aparato requerido para circular líquido a través del lumen, necesario en las técnicas *in vivo*.

La preparación retiene mucho de la estructura normal intestinal incluyendo células reguladoras nucleares. Se asume que el líquido y el soluto aparecen en el lado serosal por difusión desde el espacio intersticial y tejidos subepiteliales después de moverse desde el lado mucosal dentro y fuera de la célula epitelial. Por lo tanto las concentraciones del material que aparecen en el lado serosal se interpretan como una aproximación del mecanismo por el cual el material abandona o es expulsado de la célula epitelial.

El cuidado del órgano es importante, y debido a la hidratación del tejido en condiciones experimentales, el aumento de agua tisular dificulta la integridad estructural del saco intestinal que pierde integridad estructural después de 1 hora de incubación a 37°C. (Yumoto, 1999)

2.3.2.2 Cultivos celulares

Las células epiteliales cultivadas, especialmente líneas continuas, excluyen factores introducidos



por las células endocrinas, células nerviosas (o nervios finales) y células inmunes que están presentes en el tejido aislado.

Una línea cultivada que sólo contiene un tipo celular sirve como un mejor modelo para el estudio de los mecanismos de transporte.

Se ha demostrado que algunas líneas celulares son capaces de exhibir de manera permanente y espontánea o bajo condiciones de cultivo particular características de diferenciación de enterocitos maduros o células secretoras de moco y propiedades funcionales que son específicas del epitelio transportador (Muñoz, 2001).

2.3.2.2.1 CaCo-2

La línea celular CaCo-2 (Cáncer Colon 2) fue obtenida de un adenocarcinoma colorectal humano de un hombre de etnia caucásica de 72 años (hoja informativa de ATCC) y fue establecida en cultivo en 1974 por el Dr. Jorgen Fogh, pero fue hasta 1983 cuando se observó que las células sufren espontáneamente una típica diferenciación enterocítica bajo condiciones estandarizadas de cultivo (Pinto *et al.*, 1983).

La diferenciación enterocítica de las células caco-2 presenta varias características morfológicas y funcionales específicas (Figura 10)

Las células no están diferenciadas cuando el crecimiento es exponencial, el inicio de la diferenciación ocurre en la confluencia (cuando las células detienen su división) y es total dentro de los 20 días. No obstante que esta línea celular fue obtenida por células de colon, comparte las características de las células del intestino delgado, en el cual las células de las criptas intestinales que proliferan no están diferenciadas y la diferenciación ocurre durante la migración desde las criptas a las vellosidades de células que no se están dividiendo.

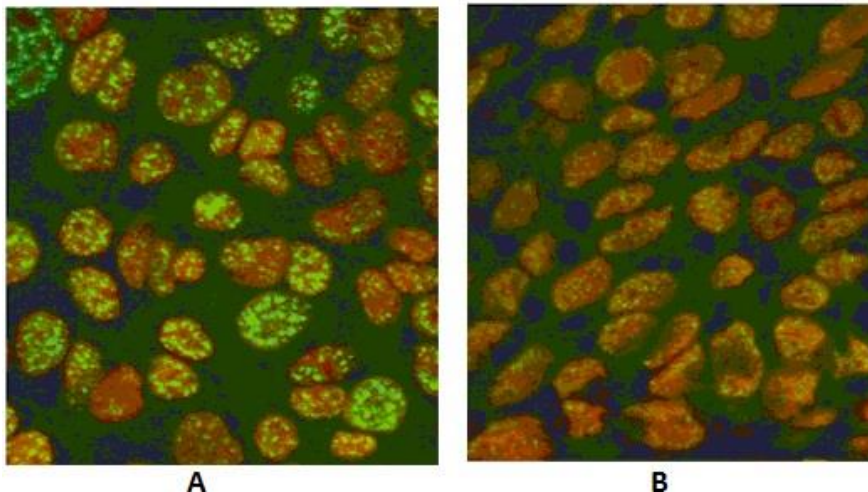




Figura 11: Fotografía microscópica de células CaCo-2 no diferenciadas (A) y diferenciadas (B).

En las últimas etapas del cultivo las células forman una monocapa polarizada que exhibe uniones estrechas bien definidas y presenta valores de resistencia eléctrica de aproximadamente $300\Omega/\text{cm}^2$.

Esta línea celular permite estudiar la importancia relativa de las rutas transcelular y paracelular en el transporte de un determinado compuesto. También se observan en estas etapas microvellosidades apicales que están organizadas en un borde en cepillo típico y que cubren la superficie celular. Estas microvellosidades en borde de cepillo son muy similares a las observadas en el intestino delgado (Muñoz, 2001).

CaCo-2 es el primer modelo celular de absorción intestinal ampliamente aceptado en la comunidad de los investigadores, los transportadores presentes están muy bien caracterizados y junto con la línea celular MDCK II (Madin Darby Canine Kidney) es el modelo de referencia para el estudio del pasaje a través de Glicoproteína P.

2.4 Citocromo p450

El citocromo P450 (CYP450) es una superfamilia de enzimas que contienen un grupo hemo unido no covalentemente a una cadena polipeptídica a través de una cisteína de gran importancia en el metabolismo de xenobióticos.

Las primeras evidencias experimentales relacionadas con el citocromo P450 fueron descritas en 1955 por Axelrod y Brodi e quienes identificaron un sistema enzimático en el retículo endoplásmico liso del hígado capaz de oxidar xenobióticos.

En 1958 Garfinkel y Klingenberg detectaron espectrofotométricamente un pigmento en microsomas hepáticos el cual tenía un máximo de absorción a 450nm.

Posteriormente en 1964, fue determinada la naturaleza hemoprotéica de este pigmento y fue nombrado citocromo P450 (Omura & Sato, 1964).

Enzimas de CYP450 se encuentran en organismos biológicamente muy distintos como bacterias, plantas y animales. En los mamíferos se identificó por lo menos una enzima de esta superfamilia en cada tejido.

La superfamilia de CYP450 incluye muchas isoformas que metabolizan una gran variedad de sustratos diferentes entre los cuales se encuentran esteroides, eicosanoides, ácidos grasos, lípidos, retinoides, entre otros. En la Figura 10 se muestra la importancia de las contribuciones de las distintas isoformas de Citocromo en el metabolismo de los fármacos actualmente en el comercio (Gungerich, 2003).

Su importancia en farmacología se debe a que es la enzima clave en el metabolismo de muchos fármacos, fármacos de abuso, etanol, carcinogénicos, precarcinogénicos, pesticidas etc. (Cuadro 3) y muchas interacciones entre medicamentos se deben a la acción conjunta sobre CYP450 (Lynch & Price, 2007).



Cuadro 3: Ejemplos de sustratos, inhibidores y inductores de CYP1A2, CYP2D6, CYP3A4

	Sustratos	Inhibidores	Inductores
CYP1A2	Cafeína	Furafilina	omeprazolo
	teofilina	Fluvoxamina	humo de tabaco
	Tacrina	Amiodarona	fenobarbital
CYP2D6	Debrisoquina	Quinidina	-
	Haloperidol	Amiodarona	-
	Sparteina	Fluoxetina	-
CYP3A4	Nifedipina	Ketoconazolo	Rifampicina
	Eritromicina	Gestodene	Carbamazepina
	Ciclosporina	verapamilo	<i>Hypericum perforatum</i>

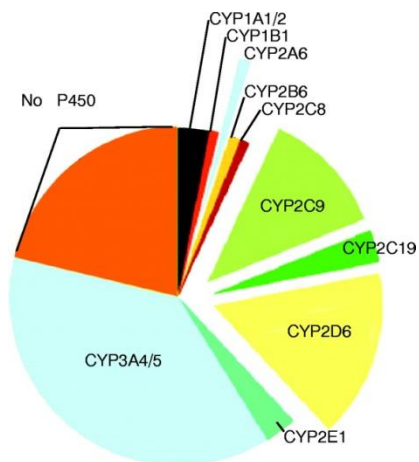
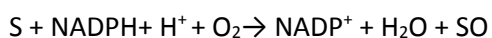


Figura 12: Contribución de los CYP450 al metabolismo de fase I de fármacos

Las reacciones de los Citocromos P450 para la oxidación de fármacos, normalmente trabajan según la siguiente función estequiometría (S=sustrato, SO=producto oxidado):





En los mamíferos todos los Citocromos P450 están enlazados a las membranas, principalmente en el retículo endoplasmático y en las mitocondrias recibiendo electrones de las flavoproteínas NADPH-P450 reductasa (retículo endoplasmático) y adrenodoxinreductasa (mitocondrias) (Gungerich, 2003).

2.4.1 Isoenzima CYP 1A2

El CYP1A2 se expresa casi exclusivamente en el hígado de forma constitutiva y se ha identificado en bajas proporciones en el colon. Entre sus sustratos resaltan estructuras de aminas aromáticas y heterocíclicas, hidrocarburos policíclicos y nitrosaminas.

Los psicofármacos son metabolizados principalmente por CYP1A2 (fluvoscamina, mirtazapina, haloperidol) como las metilxantinas (cafeína, teofilina).

En el hombre el CYP1A2 presenta gran polimorfismo genético y constituye el 10% del número total de citocromos del hígado y su estudio está asociado a interacciones entre fármacos y a la predisposición a desarrollar cáncer debido a su capacidad de metabolizar procancerígenos y convertirlos en cancerígenos activos (Camper, 2013; Lang *et al.*, 1994).

2.4.2 Isoenzima CYP 2D6

El CYP2D6 se expresa principalmente en el hígado donde representa alrededor del 2 % de los citocromos totales, un porcentaje bajo que pero es responsable del metabolismo del 20-25% de los fármacos utilizados clínicamente (Ingelman, 2004).

Sus sustratos son principalmente psicofármacos (fluoxetina, paroxetina, haloperidol), antiarrítmicos (esparteína, lidocaína, mexiletina) y β -bloqueantes (propranolol, alprenolol, timolol).

Entre sus características destacan la falta de inductores, que determina su baja capacidad metabólica (enzima de alta afinidad y baja capacidad) que lo lleva a saturarse fácilmente y su polimorfismo, que es causa de la grande diferencia en la expresión según el grupo étnico que lleva a diferencias en los individuos que se dividen en metabolizadores lentos, intermedios, rápidos y ultrarrápidos, causando problemas con la dosificación de los fármacos en las terapias (Lorenzo *et al.*, 2007).

2.4.3 Isoenzima CYP 3A4

Las isoenzimas de la subfamilia 3A predominan en la fase I del metabolismo de fármacos y entre estas la principal es la CYP3A4 que representa el 30% del total de las isoenzimas de CYP450 del hígado y casi la totalidad de las presentes en el intestino delgado.

No obstante los factores que la controlan, su expresión tiene amplias variación



intrapoblacionales (hasta 20 veces), lo que justifica las importantes diferencias en la biodisponibilidad oral de los fármacos sustratos de esta enzima.

Su actividad es inducida normalmente por fármacos antiepilépticos y sus sustratos son de muchas categorías distintas, entre las cuales destacan los antirretrovirales ocupados para el tratamiento del sida, antihistamínicos (astemizol, terfenadina), estatinas (atorvastatina, sinvastatina, cerivastatina) y esteroides (cortisol, profesterona testosterona).

Además el estudio de CYP3A4 es fundamental en las interacciones de los fármacos ocupados en la terapia de la sida porqué en esta categoría hay fármacos que son sustratos (indinavir y ritonavir), inhibidores (delaviridina, nelfinavir) e inductores (efavirenz, nevirapina), lo cual puede causar problemas de interacciones farmacológicas (Lorenzo *et al.*, 2007).

2.5 Neurotransmisión colinérgica

La neurotransmisión colinérgica ocupa como neurotransmisor en sus sinapsis a la acetilcolina (ACh). La importancia de este neurotransmisor es fundamental en el sistema nervioso central, en donde está involucrada en las aéreas de aprendizaje, memoria y atención. En el sistema nervioso periférico, en donde es el transmisor de los axones motores procedentes de la médula espinal, y en el sistema nervioso autónomo donde es el neurotransmisor posganglionar del sistema parasimpático y simpático (Dani & Bertrand, 2007).

La ACh fue identificada por primera vez en 1914 por Henry Hallett Dale, y después confirmada como un neurotransmisor por Otto Loewi, quienes recibieron en 1936 el premio Nobel en fisiología y medicina.

La ACh se sintetiza en las neuronas preganglionares por la enzima acetiltransferasa a partir de acetil-CoA y colina y se almacena en vesículas que, estimuladas por el impulso nervioso presináptico que llega a través del axón, se funden con la membrana de la sinapsis y liberan ACh que difunde a través del espacio sináptico hasta unirse a sus receptores en la membrana postsináptica (Figura 13).

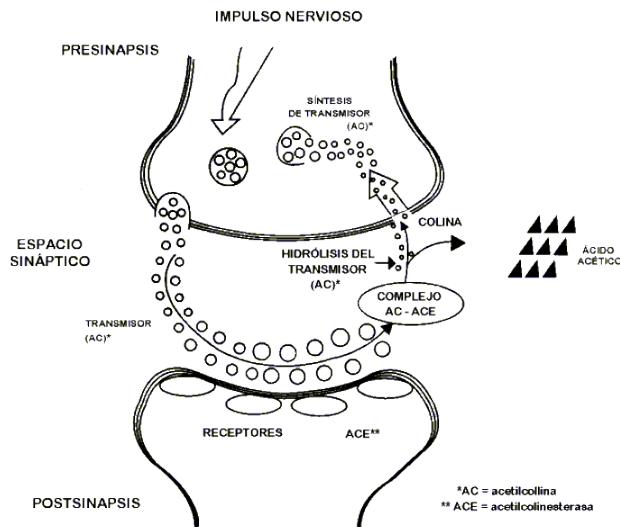


Figura 13: estructura de una sinapsis colinérgica

En la Figura 11 se representa el mecanismo de liberación de ACh por excitación y su mecanismo de degradación por parte de la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), cuya función es hidrolizar al neurotransmisor en ácido acético y colina, la cual será recaptada por el Transportador de colina adentro de la sinapsis preganglionar donde volverá a ser sustrato de colina-O-acetiltransferasa para producir nueva ACh (Berne & Levy, 2001).

2.5.1 Acetilcolinesterasa (AChE)

El mecanismo de degradación por Acetilcolinesterasa es fundamental para regular la transmisión del estímulo nervioso, es necesario retirar rápidamente el neurotransmisor del espacio intersináptico para permitir que se recupere la capacidad de respuesta de la célula efectora ante la llegada de un nuevo impulso nervioso (Lorenzo *et al.*, 2007). AChE pertenece a la superfamilia de las α/β hidrolasas, con un plegamiento altamente conservado y con considerable homología en sus secuencias, incluso entre insectos y mamíferos. Debido a la alta abundancia en los órganos eléctricos de los organismos marinos *Torpedo* y *Electrophorus* sus acetilcolinesterasas han sido las más ampliamente estudiadas y ocupadas por ensayos *in vitro* (Harel *et al.*, 1996).

2.5.2 Inhibición de la Acetilcolinesterasa

La inhibición de AChE lleva a un aumento de la concentración de ACh en el espacio



intersináptico, que puede llevarse a cabo por dos tipos de inhibidores, los irreversibles y los reversibles.

Los inhibidores reversibles de AChE son parasimpaticomiméticos de acción indirecta, son empleados en el tratamiento de la miastenia gravis, de glaucoma y en algunas formas de enfermedad de Parkinson, sus dos grupos principales son alcoholes con nitrógeno cuaternario (Ej. Edrofonio) y los carbamatos (ej. Neostigmina, fisiostigmina).

Los inhibidores de AChE tienen efectos secundarios peculiares, debido a que son la exacerbación de sus efectos farmacológicos: dolor muscular, dificultades respiratorias, bradicardia, vómito, diarrea y anorexia (Lorenzo *et al.*, 2007).

Los inhibidores irreversibles de AChE no tienen empleo en terapéutica por su alto índice de toxicidad pero algunos compuestos organofosforados son empleados en agricultura como pesticidas (ej. Carbaril, aldicarb) mientras otros son ocupados en formulaciones bélicas ilegales como el gas sarín (OPAQ, 1993).



3 Planteamiento del problema

Se ha considerado que la estructura de los glicosidos cardiotónicos de *Thevetia thevetoides* (Thevetósidos) tienen estructuras similares a los reportados en otras especies de *Thevetia*, es decir, que tienen agliconas similares a las de los digitálicos.

Digoxina, el digitálico terapéuticamente más relevante, es un reconocido sustrato del transportador de eflujo Glicoproteína P que permite su eliminación (Gerloff *et al.*, 2002), sin embargo por el momento no se ha estudiado si los thevetósidos son eliminados por la misma proteína.

Es bien conocido que los glicosidos cardiotónicos son inhibidores de la ATPasa Na^+/K^+ (Glynn, 1964), sin embargo los efectos tóxicos de *Thevetia spp* tales como diarrea, dolor de cabeza, Insuficiencia renal, vomito, hipertensión, alteraciones hepáticas, dolor muscular y alteraciones cardiacas son justificados sólo parcialmente por la inhibición de esta bomba (Regner *et al.*, 1987). Adicionalmente, estos efectos secundarios también presentan rasgos comunes con los efectos adversos de los inhibidores de acetilcolinesterasa (AChE) (Lorenzo *et al.*, 2007) e inhibidores de α -glucosidasa (α GHY)(Lebovitz, 1997) por lo que se ha considerado la posible inhibición de estas dos enzimas por los thevetósidos.

Por otro lado, uno de los mecanismos más comunes de eliminación de fármacos es la oxidación por Citocromo P450, por el momento se desconoce cualquier interacción entre los thevetósidos y esta superfamilia de proteínas. Tomando en cuenta que las semillas de *Thevetia* son consumidas sin control médico, generalmente por individuos que presentan sobrepeso u obesidad; es posible que estos individuos consuman simultáneamente otros fármacos. Por lo anterior en este informe se describen los estudios realizados sobre los efectos de los glicósidos cardíacos de *T. thevetioides* sobre distintos sistemas *in vitro* para tratar de comprender los efectos que ocasiona el consumo de las semillas de esta planta.

4 Hipótesis

Por la similitud estructural entre los digitálicos y los thevetósidos se espera que presente un valor de permeabilidad aparente superior a dos en la prueba de permeabilidad en células CaCo-2. Además debido a sus efectos secundarios parecidos a los fármacos inhibidores de Acetilcolin Esterasa y inhibidores de α -glucosidasa se espera una inhibición de estas dos enzimas.

Debido a la importancia que tienen el citocromo p450 en la interacción farmacológica se espera que los glicósidos de *T. thevetioides* presenten acción inhibitoria sobre las subfamilias CYP1A2,



CYP2D6 y CYP3A4.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar la acción inhibitoria *in vitro* de la mezcla de thevetósidos aislados de *Thevetia thevetioides* sobre las enzimas α -glucosidasa, acetilcolinesterasa (AChEI), las isoenzimas del CYP 450 1A2, 2D6 y 3A4 y la afinidad por la Glicoproteína P.

5.2 Objetivos específicos

- Caracterizar la mezcla de de thevetósidos en las semillas de *T.thevetioides* por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas.
- Evaluar la inhibición *in vitro* de los thevetósidos sobre las enzimas α -glucosidasa y citocromo P450 (subfamilias: 1A2, 2D6, 3A4) por métodos fotocolorimetricos o de fluorescencia.
- Evaluar la inhibición *in vitro* de los thevetósidos sobre la enzima Acetilcolinesterasa por un método fotocolorimétrico.
- Calcular la permeabilidad aparente de los thevetósidos en el ensayo de permeabilidad en la monocapa de células intestinales CaCo-2 para evaluar la participación de la glicoproteína P.

6 Materiales y métodos

6.1 Materiales y equipos

6.1.1 Material vegetal

Las semillas de *Thevetia thevetioides* se colectaron en la ciudad de Colima, en el estado de Colima (Estados Unidos Mexicanos).

Las semillas fueron liberadas de su mesocarpo carnoso y dejadas a secar en un lugar abierto y ventilado. Se separó el endocarpo y se molieron en un mortero.

6.1.1.1 Preparación de los extractos:

Los extractos se prepararon a partir de 1552 gramos de semillas molidas de *Thevetia thevetioides*, mediante maceración a temperatura ambiente en forma sucesiva con 3 litros de



hexano (x 3) y 3 litros de metanol (x 3), por un periodo de tres días con cada fracción de disolvente fresco.

Después de la evaporación del disolvente se obtuvieron 490 gramos de extracto hexánico y 76.2 gramos de extracto metanólico.

6.1.2 Sustancias:

Neostigmina, DTNB, acetiltiocolina, Trizma base™, solución amortiguadora de fosfatos, acarbosa, α -D-glucopiranosido de paranitrofenilo, propranolol clorhidrato, EDTA, amortiguador HEPES, digoxina, sulforodamina B y ácidotricloroacético, fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos de Norteamérica.

DMEM, DPBS, MEM, piruvato de sodio, HBSS, Tripsina-EDTA 0.5%, azul de tripano y amarillo lucifer fueron adquiridos por Invitrogen srl, Carlsbas, California, Estados Unidos de Norteamérica.

6.1.3 Enzimas y líneas celulares:

Los kit para la prueba de inhibición de CYP450 1A2, 2D6 y 3A4 (marca GENTEST) fueron adquiridos por Corning Inc., New York, Estados Unidos de Norteamérica.

La línea celular CaCo-2, numero de pase 18, fue adquirida por ATCC, Manassas, Virginia, Estados Unidos de Norteamérica.

Las enzimas α -glucosidasa (α -GHY) de *Saccharomyces cerevisiae* y acetilcolinesterasa (AChE) de *Electrophorus electricus* fueron adquiridos por Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos de Norteamérica.

6.1.4 Equipos:

Lector de microplacas (espectrofotómetro) BioRad 680 – BIO-RAD (EUA)

Lector de microplacas (fluorímetro) SpectraMax M5 – MOLECULAR DEVICES (EUA)

Campana de flujo laminar NuAireclass II A/B3 – NUAIRE (EUA)

Balanza analítica Ag204 – METTLER TOLEDO (SUISSA)

Incubadora Isotemp – FISHER SCIENTIFIC (EUA)

Cromatógrafo HPLC 1290 Series - AGILENT TECHNOLOGIES (EUA)

Espectrómetro de Masa TOF-MS 6200 series – AGILENT TECHNOLOGIES (EUA)

contador de células automático TC10 – BIORAD (EUA)

Microscopio Nikon Eclipse TE300 – NIKON (JAPON)

Centrifuga Marathon 21K/BR – FISHER SCIENTIFIC (EUA)

Agitador de placas, GrantBio PMS 1000 – GRANT INSTRUMENTS (REINO UNIDO)

Micropipetas 10 μ l, 20 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l - GILSON INC – EUA



6.1.5 Materiales consumibles

Las placas de microvaloración de 96 pozos transparentes y negras, las cajas de 12 pozos con insertos transwell (mod.3401), placas de cultivo Falcon Integrid 150x25 mm, frascos de cultivo Costar t-75, sistema de filtración *Bottle Top VacuumFilter* (0.22 μm) y las pipetas volumétricas estériles desechables fueron adquiridas por CORNING Inc., New York, Estados Unidos de Norteamérica.

Los tubos Eppendorf 1.5 mL, 2.0 mL y 3.0mL fueron adquiridos por Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos de Norteamérica.

6.2 Métodos

6.2.1 Obtención de la fracción de thevetósidos:

62.4 gramos de extracto metanólico se fraccionaron en columna cromatográfica abierta con gel de sílica (600 gramos) eluida con una fase móvil de cloroformo y metanol utilizando cromatografía de capa fina revelada con reactivo de Kedde (1:1 NaOH 2M y Acido 3,5 dinitrobenzoico 3% en etanol) para detectar la presencia de los thevetósidos (Liu *et al.*, 2013). Se reunieron aquellas fracciones que revelaban con Kedde eluidas con 70:30 cloroformo:metanol, se obtuvieron 41.2 gramos de una fracción mezcla de thevetósidos.

6.2.2 Obtención de la fracción de thevetósidos hidrolizados:

Para obtener la fracción de thevetósidos hidrolizados se modificó la metodología de McLaughlin *et al.* (1980); brevemente: se ocuparon 500mg de la mezcla de thevetósidos y fueron mezclados con 10 gramos de semillas frescas para ocupar las glicosidasas presentes en la semilla. Las semillas molidas y se vertieron en un frasco de vidrio con 100 mL de agua destilada y hexano para cubrir la superficie del agua con una capa de este disolvente, y se dejó por 4 días a la temperatura de 37°C con una tapón de gaza. Posteriormente se agregaron 80 ml de etanol absoluto y se filtró a través de tierra de diatomea, al residuo se agregó etanol al 50%, se mezcló y se volvió a filtrar. Por cromatografía en capa fina los dos extractos presentaron los mismos componentes. Los dos filtrados fueron unificados y concentrados a presión reducida hasta un volumen final de 30 mL.

Al filtrado se realizaron tres lavados con 30 mL de Cloroformo, este se secó con Na_2SO_4 anhidro se concentró a presión reducida y el residuo se dejó evaporar a temperatura y presión ambiente, como resultado se obtuvieron 351.6 mg de polvo color amarillo claro que al microscopio mostró una forma cristalina irregular. Por cromatografía en capa fina se obtuvieron tres manchas diferentes y todas revelaron con reactivo de Kedde.



Este extracto se sometió a un fraccionamiento primario por cromatografía en columna abierta empacada con silica gel (4.0 g) utilizando como fase móvil mezclas de cloroformo y etanol. La separación se siguió por cromatografía de capa fina revelada con reactivo de Keddle. Las manchas individuales eluidas con 70:30 Cloroformo:Etanol fueron analizadas por CLAR-EM.

6.2.3 Obtención de los ácidos grasos:

En un matraz redondo se pesaron 0.5 gramos del aceite de semilla de *Thevetia thevetioides*, obtenida por extracción con hexano.

Al matraz se adicionaron 5 mL de KOH 5% en Metanol y se colocaron a reflujo a una temperatura de 80°C por 60 minutos. Al término de este tiempo se dejó enfriar y se neutralizó con HCl 10%. Se agregaron 8 mL de agua y 10 mL de CH₂Cl₂, se agitó vigorosamente por un minuto y se separó la fase orgánica, este proceso de extracción se realizó otras dos veces, se reunieron las 3 extracciones y se evaporó el CH₂Cl₂. La mezcla se redisolvió en éter etílico (10mL). Esta mezcla de ácidos se metiló con diazometano en exceso. La mezcla se dejó en agitación toda la noche a temperatura ambiente y fue analizada por CG-EM.

6.2.4 Identificación de los compuestos:

Los compuestos de las tres fracciones fueron identificados con la técnica de CLAR-EM comparando los fragmentos obtenidos con los patrones de fragmentación reportados (Dominguez, 1972; Kohls et al., 2012).

En el Cuadro 4 se reportan las características y las condiciones de los equipos ocupados bajo las cuales fueron analizadas las fracciones de thevetósidos y thevetósidos hidrolizados.

Cuadro 4: Equipos de cromatografía CLAR-EM y condiciones ocupados por el análisis de las fracciones

Equipos Utilizados	Espectrómetro de Masas Modelo Synapt GS-2, Marca WATERS, con tiempo de Vuelo
	Cromatógrafo de Líquidos Modelo ACQUITY, Marca WATERS
Columna	ACQUITY UPLC BEH, Fase Reversa C18, 1.7um, 2.1X100mm. Num. de serie: 01803016915356
Temperatura columna	25°C



Fase móvil	Fase A: Agua Mill Q con 0.1% de Ac. Fórmico	
	FaseB: Acetonitrilo con 0.1% de Ac. Fórmico	
Velocidad de flujo	0.3mL/min	
Tipo de ionización	Electrospray	
Temperatura de la cámara de ionización	100°C	
Voltaje del capilar	3.00kV	
Intervalo de masas	50-1500 u	
Detección de iones	Positivos	
Resolución	20,000	
Gradiente cromatografico (thevetósidos)	Inicial	87%A 13%B
	min 9	60%A 40%B
	min 10	100%B
Gradiente cromatografico (thevetósidos hidrolizados)	Inicial	90%A 10%B
	min 1	90%A 10%B
	min 10	50%B 50%B
	min 12	10%A 90%B
	min 14	90%A 10%B



6.2.5 Determinación del contenido de metales pesados:

Para determinar el contenido de metales pesados en las semillas de *Thevetia thevetioides* se ocupó el método MGA 0561 (II) por comparación con estándar de Plomo, según la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos XX edición.

6.3 Ensayos farmacológicos

6.3.1 Prueba de inhibición de AcetilColinEsterasa

La prueba de inhibición de AChE fue realizada modificando la técnica de Ellman *et al.* (1961), en el ensayo *in vitro* de la inhibición de Acetilcolinesterasa (AChE) se utilizó como control positivo neostigmina y mezcla de thevetósidos en 4 concentraciones (10, 5, 1, 0.5 mg/mL); las pruebas se efectuaron en buffer de trizma de pH 8.

La enzima fue preparada disolviendo 500 unidades en 0.5 mL de gelatina al 1% en agua destilada y llevando a volumen de 25 mL obteniendo una solución stock de 20 Unidades/mL que fue diluida sucesivamente con agua destilada hasta obtener la concentración deseada de 1.5 Unidades/mL.

El sustrato ocupado fue Acetiltiocolina Iodada en una solución 0.075 M y como revelador colorimétrico DTNB 0.01M en buffer de trizma de pH 7.

La inhibición fue medida utilizando un método espectrocolorimétrico a pH 8 y 37°C por medio de un lector de microplacas BioRad (mod. 680) midiendo el incremento de la absorbancia a la longitud de onda de 415 nm debido a la hidrólisis del DTNB.

La prueba se realizó poniendo 23.3 μ L de thevetósidos en las distintas concentraciones en un vial con 2920.8 μ L de Buffer pH 8 y agregando 23.3 μ L de enzima y 46.6 μ L de DTNB, estos viales se incubaron por 10 minutos a 37 °C con la enzima.

Después de la incubación se agregaron 9.3 μ L de Sustrato en todos los viales menos en el del control y se comenzó a tomar el tiempo.

De cada vial se depositaron en los pozos 200 μ L en sextuplicado, y se puso en incubación a 37°C por 30 minutos, después de la incubación se leyeron los valores de absorbancia a 420 nm.

6.3.2 Prueba de inhibición de α -glucosidasa

La prueba de inhibición de α GHY se realizó según la metodología descrita por Brindis *et al.* (2010), para el ensayo *in vitro* de inhibición de α -glucosidasa se ocupó como control positivo acarbose, el sustrato ocupado fue α -D-glucopiranosido de p-nitrofenilo (*p*NPG) a partir de una



solución 5 mM y como enzima α GHY a partir de una solución 0.4 Unidades/mL, las pruebas se efectuaron en buffer de fosfatos pH 7. Se evaluó el efecto de los thevetósidos como inhibidores enzimáticos a 5 concentraciones (2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 mg/mL) en triplicado.

La inhibición fue medida utilizando un método espectrofotocolorimétrico midiendo el incremento de la absorbancia a la longitud de onda de 405 nm debido a la hidrólisis del pNPG por α GHY. Las diferentes concentraciones de thevetósidos y acarbosa fueron incubadas por 10 minutos a 37°C con 20 μ L de la solución stock de enzima en los pozos de microvaloración.

Después de la incubación se leyeron los valores de absorbancia que se ocuparon como blanco, se agregaron 10 μ L de sustrato (5 mM) y posteriormente se volvió a incubar a 37 °C por 20 minutos.

Después de la segunda incubación se leyeron los valores de absorbancia obtenidos a 405 nm.

6.3.3 Pruebas de inhibición de CYP 450.

Las pruebas de inhibición se efectuaron sobre tres isoformas de CYP450 (1A2, 2D6, 3A4) según la metodología descrita por Manda *et al.* (2013).

Cada fila de la placa de microvaloración va a tener una repetición de la prueba con thevetósidos o con el inhibidor control en 6 concentraciones diferentes (dilución consecutiva de 1 a 3), se dejará una columna con tres pozos sin inhibidores como testigo.

Los resultados obtenidos se expresan con Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU), un valor bajo indica efecto inhibitorio de la sustancia sobre el Citocromo, un valor alto una inhibición escasa o nula.

6.3.3.1 Citocromo 1A2

Calentar a 37° en baño María el agua destilada y la solución amortiguadora de Fosfatos, descongelar todas las componentes del ensayo y guardarlas en un baño de hielo.

Preparar la mezcla NADPH-Cofactores agregando a 2912 μ l de agua destilada (37°C) 37.5 μ l de cofactores, 30 μ l de G6PDH y 20 μ l de proteína control. Preparar la mezcla cofactores-MeOH agregando 40 μ l de MeOH a 1960 μ l de mezcla NADPH-Cofactores.

En las filas A, B y C agregar 147 μ l de mezcla NADPH-Cofactores en los pozos de la columna 1 y 100 μ l de mezcla Cofactores-MeOH en las columnas que van de 2 a 7.

En la columna 1 Agregar 3 μ l de glicósidos de *Thevetia* 20mg/ml en los pozos A y B de y 3 μ l de furafilina 5mM en el pozo C, con la ayuda de la pipeta multicanal proceder a una dilución serial sucesiva de 50 μ l desde los pozos de la columna 1 hasta la columna 6, los 50 μ l excedentes en los pozos de la columna 6 se desechan.

Cubrir la placa y ponerla en pre incubación por 10min, en el mientras preparar la mezcla Enzima/Sustrato agregando 400 μ l de solución amortiguadora, 10 μ l de HTS-703 y 1 μ l de CEC 5mM a 1590 μ l de agua destilada .

Pasados los 10 minutos de pre incubación agregar 100 μ l de la mezcla enzima/sustrato a los pozos de las columnas 1 a 7, cubrir la placa y volverla a poner en la incubadora por 15 minutos.



Pasados los 15 minutos de incubación agregar a los pozos 75µl de reactivo de interrupción y leer en el fluorímetro con longitudes de onda de 410 nm de excitación y 460 nm de emisión.

6.3.3.2 Citocromo 2D6

Calentar a 37° en baño María el agua destilada y la solución amortiguadora de Fosfatos, descongelar todas las componentes del ensayo y guardarlas en un baño de hielo.

Preparar la mezcla NADPH-Cofactores agregando a 2912µl de agua destilada (37°C) 37.5 µl de cofactores, 30µl de G6PDH y 20µl de proteína control. Preparar la mezcla cofactores MeOH agregando 40µl de MeOH a 1960µl de mezcla NADPH-Cofactores.

En las filas A, B y C agregar 147µl de mezcla NADPH-Cofactores en los pozos de la columna 1 y 100 µl de mezcla Cofactores-MeOH en las columnas que van de 2 a 7.

En la columna 1 Agregar 3µl de glicósidos de *Thevetia* 20mg/ml en los pozos A y B de y 3µl de quinidina 25 µM en el pozo C, con la ayuda de la pipeta multicanal proceder a una dilución serial sucesiva de 50 µl desde los pozos de la columna 1 hasta la columna 6, los 50 µl excedentes en los pozos de la columna 6 se desechan.

Cubrir la placa y ponerla en pre incubación por 10min, en el mientras preparar la mezcla Enzima/Sustrato agregando 400µl de solución amortiguadora, 12.5µl de HTS-717 y 1µl de AMMC 10mMa 1590 µl de agua destilada.

Pasados los 10 minutos de preincubación agregar 100 µl de la mezcla enzima/sustrato a los pozos de las columnas 1 a 7, cubrir la placa y volverla a poner en la incubadora por 30 minutos.

Pasados los 30 minutos de incubación agregar a los pozos 75µl de reactivo de interrupción y leer en el fluorímetro con longitudes de onda de 390 nm de excitación y 460 nm de emisión.

6.3.3.3 Citocromo 3A4

Calentar a 37° en baño María el agua destilada y la solución amortiguadora de Fosfatos, descongelar todas las componentes del ensayo y guardarlas en un baño de hielo.

Preparar la mezcla NADPH-Cofactores agregando a 2912µl de agua destilada (37°C) 37.5 µl de cofactores, 30 µl de G6PDH y 20 µl de proteína control. Preparar la mezcla cofactores MeOH agregando 40 µl de MeOH a 1960 µl de mezcla NADPH-Cofactores.

En las filas A, B y C agregar 147 µl de mezcla NADPH-Cofactores en los pozos de la columna 1 y 100 µl de mezcla Cofactores-MeOH en las columnas que van de 2 a 7.

En la columna 1 Agregar 3 µl de glicosidos de *Thevetia* 20mg/ml en los pozos A y B de y 3 µl de Ketoconazolo 0.25 mM en el pozo C, con la ayuda de la pipeta multicanal proceder a una dilución serial sucesiva de 50 µl desde los pozos de la columna 1 hasta la columna 6, los 50 µl excedentes en los pozos de la columna 6 se desechan.

Cubrir la placa y ponerla en pre incubación por 10min, en el mientras preparar la mezcla Enzima/Sustrato agregando 386 µl de agua destilada, 10 µl de HTS-702 y 4 µl de BFC 50mMa 1600 µl de solución amortiguadora.



Pasados los 10 minutos de preincubación agregar 100 μ l de la mezcla enzima/sustrato a los pozos de las columnas 1 a 7, cubrir la placa y volverla a poner en la incubadora por 30 minutos.

Pasados los 30 minutos de incubación agregar a los pozos 75 μ l de reactivo de interrupción y leer en el fluorimetro con longitudes de onda de 409 nm de excitación y 530 nm de emisión.

6.3.4 Permeabilidad por CaCo-2

Las técnica de cultivo celular y del ensayo de permeabilidad fueron realizados según el protocolo del NCNPR de la University of Oxford, Misisipi, Estados Unidos de Norteamérica y la técnica descrita por Cai *et al.*, 2012.

Las células Caco-2 fueron cultivadas en el medio de cultivo celular complementado (MCCC) en platos de cultivo Corning y se mantuvieron en incubadora a los 37°C con una atmosfera de CO₂ al 5% y humedad relativa al 95%.

Las células crecen en placas de cultivo o frascos de cultivo y el medio de cultivo (MCCC) se cambia cada dos días con excepciones que serán especificadas.

6.3.4.1 Siembra y mantenimiento de las células en placas de cultivo.

Las células se conservan en Nitrógeno líquido y se descongelaron dejándolas 5 minutos en un baño maría de 37°C.

Las células descongeladas se pasaron a un tubo Falcon de 50 ml agregando 15 ml de MCCC a la temperatura de 37 °C y se pasaron a una placa de cultivo.

Cada dos días hay que retirar, con una pipeta esteril, el MCCC de las placas o frascos y substituirlo con 15ml de MCCC fresco.

Un color amarillento indica una contaminación o un sobrecrecimiento de las células respecto a los nutrientes disponibles.

Una mirada al microscopio nos puede ayudar a reconocer entre las dos condiciones y orientarnos hacia desechar la placa en el primer caso o substituir el medio en el segundo.

6.3.4.2 Resiembra y propagación de las células.

Las células se pueden resembrar en dos placas de cultivo cuando han llegado al 80% de confluencia, esta operación se hace para obtener un número mayor de placas por si acaso uno se llega a contaminar o para tener más muestras que congelar.

Para resembrar se quita el medio de cultivo de la placa, se agregan 5ml de una solución de tripsina al 15% en EDTA y se deja en la incubadora por 5 minutos.



Luego de los 5 minutos se checa en el microscopio para ver si las células se han despegado, se puede golpear suavemente las paredes de la caja para ayudar las células a despegarse. Cuando las células están despegadas lo suficiente se agregan 10ml de MCCC, se colecta la suspensión de células en un tubo Falcon de 50ml y se centrifuga por 3 minutos a 1000rpm con temperatura de 5°C.

Se desecha el sobrenadante y se re suspenden las células en 2ml de MCCC fresco, se agregan a dos cajas nuevas 15ml de MCCC a 37°C y se le agregan 100µl de la suspensión celular. Cada vez que se reseman las células de una caja a otra o a los pozos transwell hay que aumentar el número de pase de una unidad.

6.3.4.3 Siembra de las células en los pozos Transwell

Se pone el MCCC en las dos partes de la caja transwell, 500µl en el compartimento superior (adentro del inserto) y 1500µl en el compartimento inferior (Figura 12). Las cajas se dejan en la incubadora hasta que no esté lista la suspensión de células.

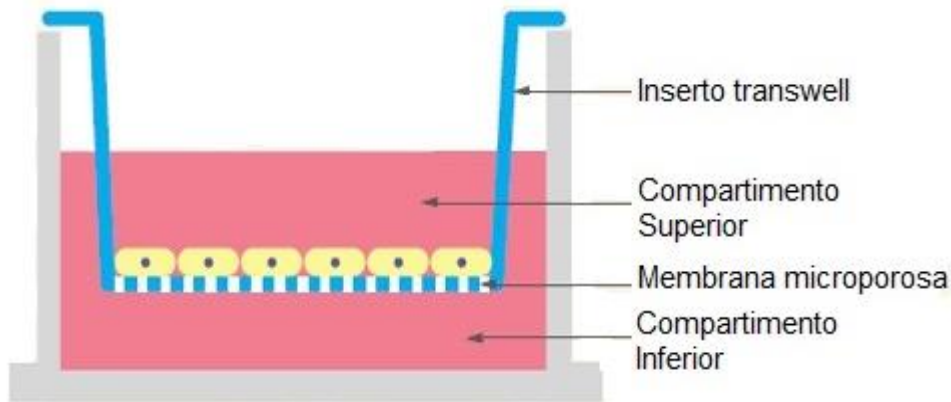


Figura 14: Estructura de un pozo transwell

Se quita el medio de cultivo de la caja de cultivo, se agregan 5ml de una solución de tripsina al 15% en EDTA y se esperan 5 minutos golpeando suavemente las paredes del plato para que las células se despeguen, una vez observado al microscopio que la mayoría de las células están flotando se agregan 10ml de MCCC, se mezcla bien y a través de una pipeta volumétrica y se pone el contenido de la caja en un tubo falcon de 50ml.

Se centrifuga el tubo falcon por 3 minutos a 5°C a una velocidad de 1000 rpm y se quita el sobrenadante. Al botón que queda en el fondo se agregan 2ml de MCCC y se mezcla vigorosamente con la pipeta para que se disuelva y se ponga homogéneo.

Se toman 20 µl de esta suspensión, se ponen en una cámara de conteo que se introduce al



contador automático de células TC10 que nos da como resultado la concentración de células expresada como Celulas/ml.

Se calcula la dilución necesaria para obtener una solución que contenga 2.72×10^5 células por mL y se agrega MCCC hasta alcanzar la dilución requerida.

Se saca la caja de pozos Transwell de la incubadora, se quita el medio de cultivo del inserto y se agregan 500 μ l de la solución conteniente células, la cantidad necesaria para la siembra es de 1.36×10^5 células por pozo.

Se pone la caja en la incubadora, se cambia el medio de cultivo en el pozo y en el inserto el día sucesivo a la siembra y luego cada día alterno hasta llegar a la diferenciación y confluencia de las células al día 21.

6.3.4.4 Prueba de viabilidad.

La prueba de Citotoxicidad fue realizada según la técnica de desulforodamina B (SRB) descrita por Voigt *et al.* (2005) con la mezcla de thevetósidos en las cuatro concentraciones que se ocuparon en el ensayo (100, 250, 500 y 750 μ g/mL).

La prueba se realizó sembrando las células en el numero de 2.0×10^4 células/mL en pozos de microplacas en el día 1, el día 2 se quitó el medio de cultivo y se pusieron en triplicado las cuatro concentraciones de thevetósidos disueltos en medio de cultivo y se dejaron en incubadora a 37°C por 24 horas.

El día 3 se quitó el medio y se agregaron 10 μ l de acidotricloroacético (TFA) 10% para fijar las proteínas de las células y se puso la placa en refrigeración a 4°C por 30 minutos luego de los cuales se quitó el acido y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas.

El día 4 se agregaron en cada pozo 100 μ L de SRB 0.4% en acido acético 1%, se dejó en contacto por 60 minutos, se lavó con acido acético 1% y se dejó secar a temperatura ambiente por 24 horas.

Los resultados se leyeron en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 564 nm.

La presencia de los thevetósidos no inhibió el crecimiento de las células.

6.3.4.5 Lectura de datos

Las muestras obtenidas en los ensayos fueron analizadas con la técnica de CLAR-EM, ocupando los equipos y las condiciones de las tablas 6 y 7.

Cuadro 5: Equipos de cromatografía CLAR-EM ocupados por el análisis de las fracciones



Equipos Utilizados	Espectrómetro de Masas Modelo 6200 Marca AGILENT, con tiempo de Vuelo
	Cromatógrafo de Líquidos Modelo 1290, Marca AGILENT
Columna	Zorbax SB-C8 RRHD 2.1x100 mm 1.8 μ , marca AGILENT
Temperatura columna	35°C
Fase móvil	Fase A: Agua Mill Q con 0.1% de Ac. Fórmico
	FaseB: Acetonitrilo con 0.1% de Ac. Fórmico
Velocidad de flujo	0.25 mL/min
Tipo de ionización	Electrospray
Temperatura de la cámara de ionización	325°C
Voltaje del capilar	3.00kV
Intervalo de masas	100-1300
Detección de iones	negativos

Cuadro 6: Condiciones cromatograficas del análisis de las fracciones

Gradiente cromatografico (thevetosidos)	Inicial	87%A 13%B
	min 9	60%A 40%B
	min 10	100%B

Debido a la disponibilidad de una sola sustancia como estándar puro (thevetina A) en una cantidad muy limitada (1.0 mg) se decidió de ocuparla como referencia para cuantificar los tres thevetósidos de la muestra de los cuales decidimos medir el pasaje (thevetina A, thevetina B, thevetina C) debido a la similaridad estructural de los tres compuestos.

Fueron ocupadas concentraciones de thevetina A en el rango de 0.1 μ g/mL hasta 10 μ g/mL y



obtuvimos la siguiente ecuación que ocupamos para la cuantificación.

$$y = 42027x + 7086.$$

$$R^2 = 1$$

6.3.4.6 Prueba de permeabilidad por CaCo-2.

Después de 21 días de la siembra de las células en los pozos transwell, la monocapa está lista para poder efectuar el ensayo de permeabilidad.

Decidimos trabajar con cuatro concentraciones de nuestra mezcla de thevetósidos (100, 250, 500 y 750 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y una de thevetina A (150 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Nuestro objetivo fue evaluar su paso en las direcciones Apical \rightarrow Basolateral (A \rightarrow B) y Basolateral \rightarrow Apical (B \rightarrow A). Cada una de estas pruebas se realizó por duplicado.

Se cambió el medio de cultivo en los pozos 12 horas antes de realizar el experimento para evitar el acumulo de células muertas y garantizar buenas condiciones vitales de las células de la monocapa. El medio de cultivo se substituyó con Buffer de Transporte 30 minutos antes de comenzar el ensayo. Substituir el.

Para las pruebas de permeabilidad A \rightarrow B la muestra (500 μl) se puso en el inserto superior mientras en la parte inferior se colocó el Buffer de transporte (1500 μl). Para las pruebas de permeabilidad B \rightarrow A la muestra (1500 μl) se puso en el pozo inferior mientras en el inserto superior se colocó el Buffer de transporte (500 μl).

Una vez equilibradas las células en el buffer de transporte, este fue retirado de ambos compartimentos y se colocaron las soluciones de Thevetósidos y del buffer de transporte en los respectivos compartimentos.

La placa se pone en un agitador de placas y se pone en la incubadora (37°C , 5%CO₂, 95% humedad relativa).

Al minuto 30 la caja se retira de la incubadora, se toman muestras de 200 μl del compartimento acceptor y se depositan 200 μl de buffer de transporte a la temperatura de 37°C en el mismo compartimento.

Las muestras se ponen en tubos Eppendorf adecuadamente etiquetados que se guardaran en refrigeración a 4°C hasta el momento de su análisis por cromatografía líquida acoplada a masa. La caja se vuelve a poner en la incubadora y se repite el proceso de muestreo y remplazo con buffer a los minutos 60, 90 y 120.

Terminado el ensayo de permeabilidad se efectúa la prueba de Lucifer Yellow y se efectúa para determinar si la prueba tuvo algún efecto sobre la integridad de la monocapa.

Luego de haber recolectado las últimas muestras, al minuto 120, se quita el contenido de ambos



compartimentos y se depositan 1500 μl de buffer de transporte en cada compartimento basolateral y luego se depositan 500 μl de una solución del colorante Lucifer Yellow 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en cada compartimento apical.

La placa se pone en un agitador de placas y se coloca en la incubadora (37°C , 5%CO₂, 95% humedad relativa).

Luego de 60 minutos se sacan 100 μl de cada pozo, se depositan en duplicado en una placa negra con 96 pozos, y se leen en un lector de fluorescencia con longitud de onda de excitación (λ_{EX}) de 485nm y lectura de longitud de onda de emisión (λ_{EM}) de 535nm.

Los resultados se comparan con la curva de calibración de Lucifer Yellow y se calcula el coeficiente de permeabilidad aparente (P_{app}) para cada pozo, si la P_{app} de un pozo es superior a 1×10^{-8} cm/s el resultado de ese pozo no se considera confiable.

En ninguna de las pruebas se obtuvieron resultados fuera del rango.

7 Resultados y discusión

7.1 Rendimiento de las fracciones.

De las semillas de *Thevetia thevetioides* se obtuvieron los extractos y rendimientos mostrados en el Cuadro 7.

Cuadro 7: Rendimiento de los extractos de semillas de *Thevetia thevetioides*.

	Cantidad (g)	Rendimiento %
Semilla	1552	100.0
Semilla desgrasada	1062	68.4
Extracto MeOH	76.2	4.9
Fraccion de glucósidos	41.2	2.7

7.2 Identificación de los glicosidos.

De las fracciones de glucósidos hidrolizados y no hidrolizados se obtuvieron los espectros de masa con los cuales fue posible identificar 3 thevetósidos monoglicosilados (Nerifolina, Acetilnerifolina y Acetilperuvosido) y 6 triglicósidos (Thevetina A, Thevetina B, Thevetina C,



Acetilthevetina A, Acetilthevetina B, Acetilthevetina C).

Para la identificación se compararon la presencia de thevetósidos en otras especies de *Thevetia* (Abe *et al*, 1992; McLaughlin *et al*, 1980) y su fragmentación característica (Kolsh *et al*, 2012; Dominguez, 1972)-Para cada uno de los compuestos se propuso un patrón de fragmentación que corresponde con los picos encontrados en los espectros (ver apéndice) que se puede observar en las figuras de 15 a 23.

Normalmente la fragmentación de la cadena glicosídica sigue unos patrones que están relacionados con la pérdida de unidades mono o di glicosiladas hasta obtener la aglicona como se puede ver en el ejemplo de thevetina B (Fig. 13). De esta fragmentación se obtienen los picos de 323 (disacárido proximal), 325 (gentiobiosa) y 485 (gentiobiosa mas thevetosa) que se encontraron en todos los espectros de thevetósidos.

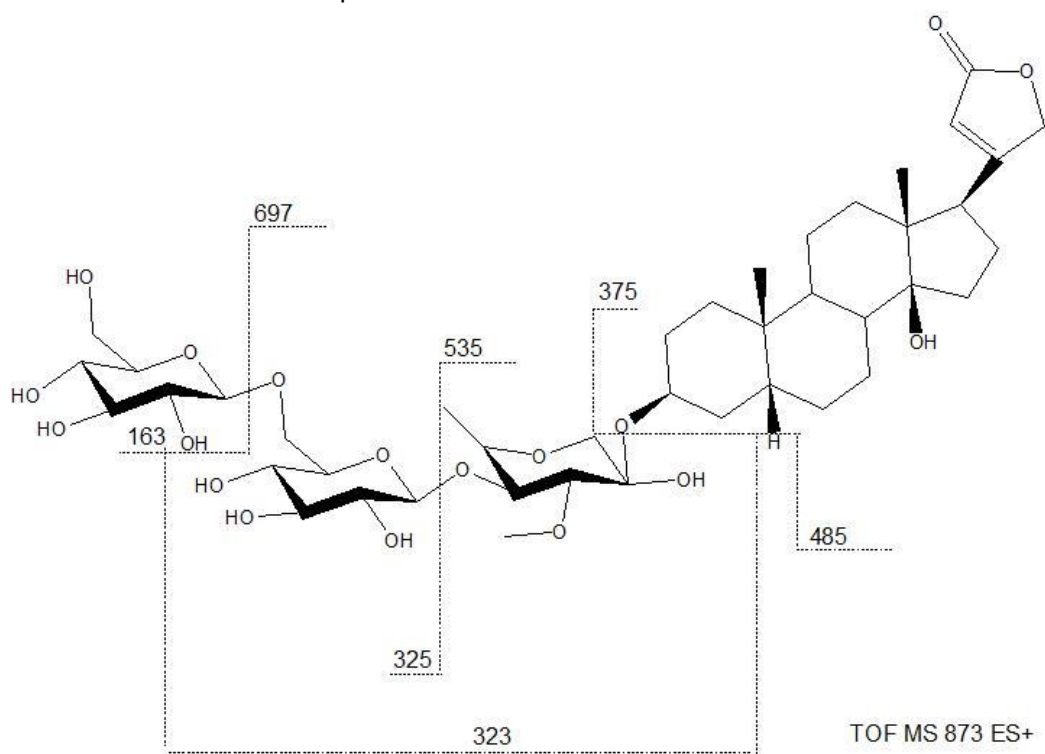


Figura 15: patrón de fragmentación de los azucres de los thevetósidos (Thevetina B)

Los thevetósidos acetilados presentan el mismo patrón, sin embargo debido a la presencia del grupo acetil en la thevetosa su fragmentación genera dos iones característicos diferentes que representan a la thevetosa (203) y su derivado de metoxilado (171) (fig 14).

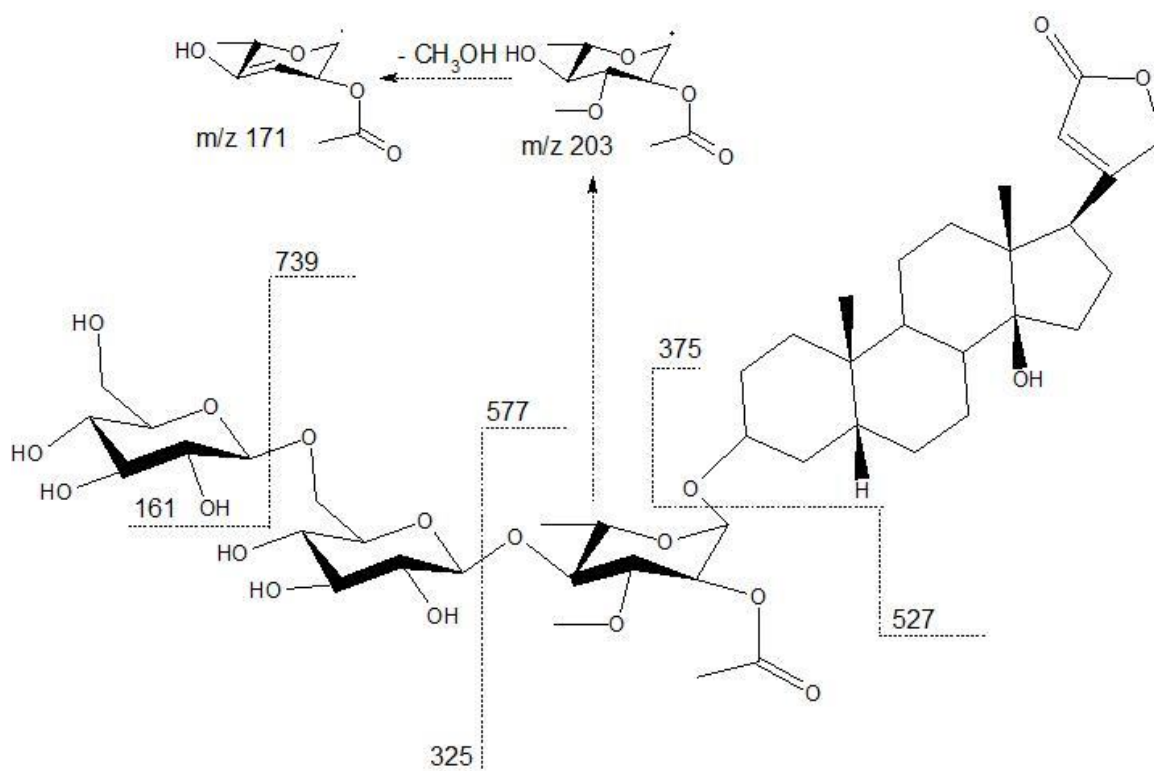


Figura 16: patrón de fragmentación de los azúcares de los thevetósidos acetilados (Acetilthevetina B)

7.2.1 Thevetina A

Thevetina A tiene una fórmula molecular de $C_{42}H_{64}O_{19}$ y una masa exacta de 872.40 uma, el pico base (353) corresponde a la aglicona luego de la deshidratación doble en las posiciones 3 y 14, mientras el ion molecular se puede ver en dos picos, uno muy pequeño en 873 donde se encuentra en aducto con H^+ y uno en 892 donde se encuentra en aducto con $NH_4^+ + 2$ electrones que quedan en la fragmentación, ambos el aducto de m/z 892 y la dimensión muy pequeña del pico m/z 873 están reportados por Kolsh *et al* (2012).

Los azúcares siguen el patrón de fragmentación clásico de los thevetósidos no acetilados (m/z 485 y m/z 325) y se encuentran los relativos fragmentos de la aglicona (m/z 389) y su forma monoglucosilada (m/z 549) (Fig.15).

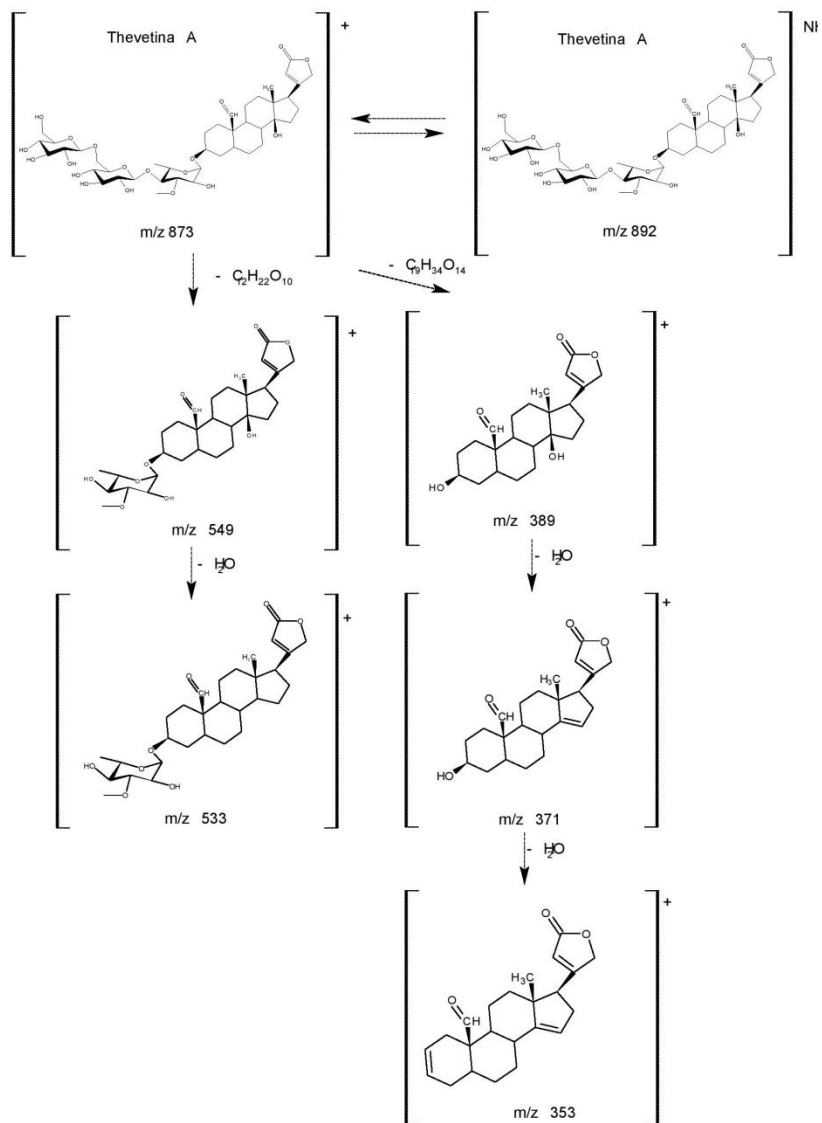


Figura 17: Patrón de fragmentación de thevetina A

7.2.2 Thevetina B

Thevetina B tiene una fórmula molecular de $C_{42}H_{66}O_{18}$ y una masa exacta de 858.42 uma, el pico base (m/z 339) corresponde a la aglicona luego de la deshidratación doble en las posiciones 3 y 14, mientras el ion molecular se encuentra en m/z 859. Los azúcares siguen el patrón de fragmentación de los thevetósidos no acetilados (m/z 485 y



m/z 325) y se encuentran los relativos fragmentos de la aglicona (m/z 375) y su forma monoglucosilada (m/z 535).

Se pueden apreciar en m/z 111 y m/z 85 los picos correspondientes a la fragmentación del anillo lactónico comunes en la fragmentación de los cardenólidos (Dominguez, 1972) (fig. 16).

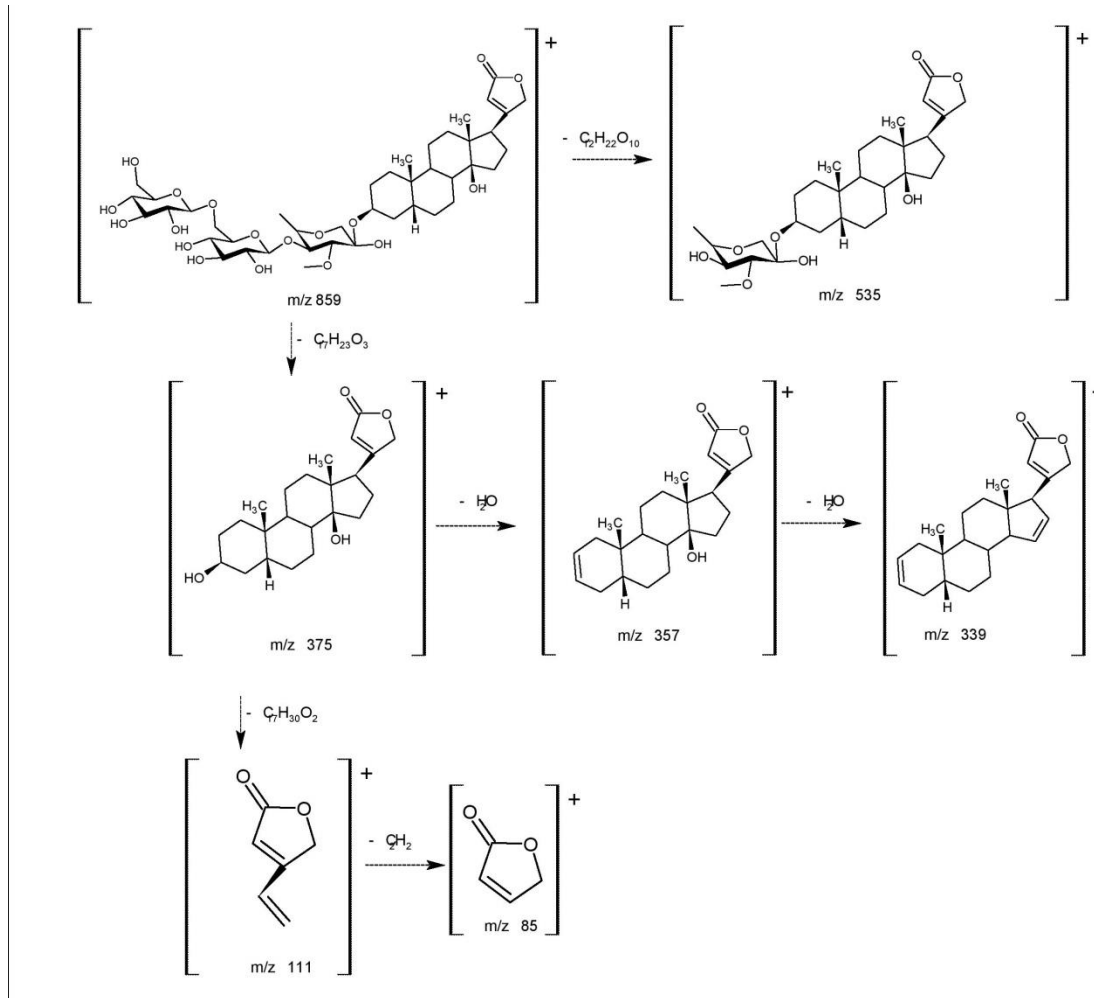


Figura 18: Patrón de fragmentación de thevetina B

7.2.3 Thevetina C

Thevetina C tiene una fórmula molecular de $C_{42}H_{66}O_{19}$ y una masa exacta de 874.42 uma, el pico base (m/z 353) corresponde a un aducto molecular de la aglicona luego de la deshidratación doble en las posiciones 3 y 14 con los iones fragmentos de thevetina A como está reportados por Kolsh *et al* (2012) mientras el ion molecular se puede ver en dos picos, uno en m/z 873 donde se encuentra en aducto con H^+ y uno en m/z 892 donde se encuentra con NH_4^+ .

Los azúcares siguen el patrón de fragmentación clásico de los thevetósidos no acetilados (picos en m/z 485 y m/z 325) y se encuentran los relativos picos de la aglicona (m/z 391) y su forma



monoglucosilada (m/z 549) así como los picos correspondientes a la fragmentación del anillo lactónico (m/z 85 y m/z 111) (Fig.17).

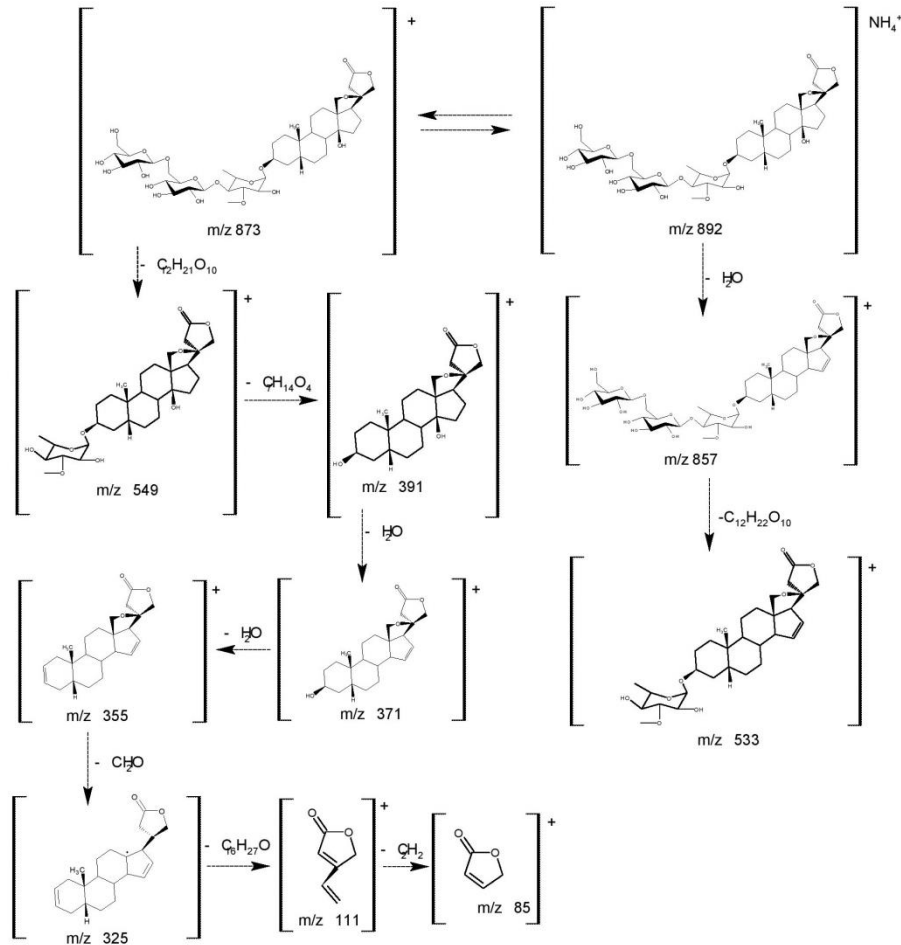


Figura 19: Patrón de fragmentación de thevetina C

7.2.4 Acetilthevetina A

Acetilthevetina A tiene una fórmula molecular de $C_{44}H_{66}O_{20}$ y una masa exacta de 914.41 uma, el pico base (m/z 203) corresponde a la acetilthevetosa y el ión molecular se encuentra como aducto con Na^+ (m/z 937).

Se pueden apreciar los picos de la aglicona (m/z 389), de la misma luego de la pérdida de una (m/z 371) y dos (m/z 353) moléculas de agua y de los fragmentos de su anillo lactónico (m/z 111 y m/z 85) (fig.18)



Figura 20: Patrón de fragmentación de acetylthevetina A

7.2.5 Acetylthevetina B

Acetylthevetina B tiene una fórmula molecular de $C_{44}H_{68}O_{19}$ y una masa exacta de 900.44 uma, el pico base (m/z 203) corresponde a la acetylthevetosa, presenta dos picos del ión molecular se encuentran como aductos con NH_4^+ (m/z 918) y con Na^+ (m/z 923).

Se pueden apreciar los picos de la aglicona (m/z 375), y luego de la pérdida de dos moléculas de agua (m/z 339) además de los fragmentos de su anillo lactónico (m/z 111 y m/z 85) (fig.19).

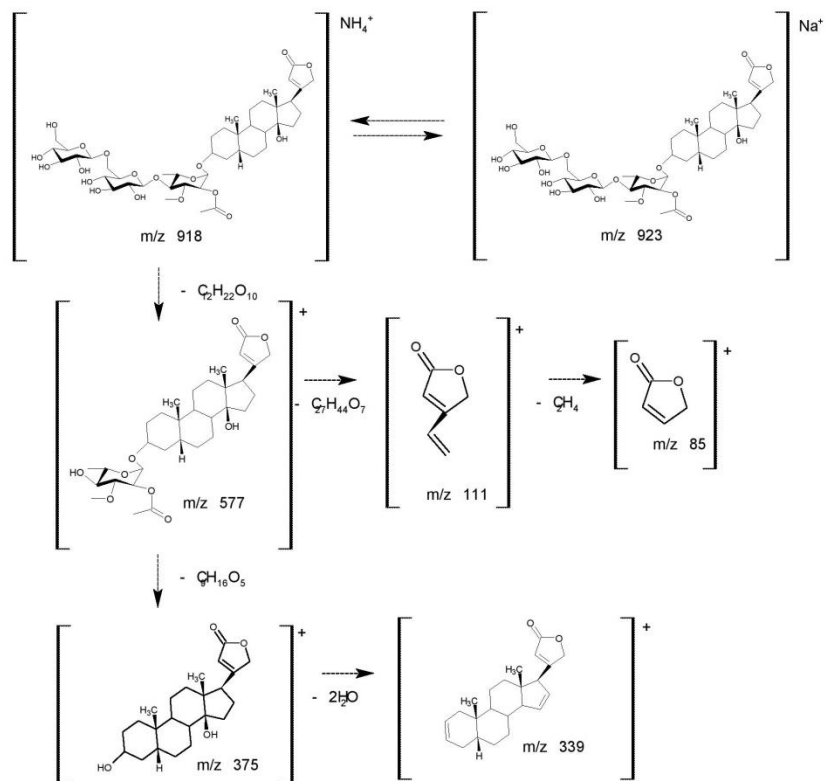


Figura 21: Patrón de fragmentación de acetylthevetina B

7.2.6 Acetylthevetina C

Acetylthevetina C tiene una fórmula molecular de $\text{C}_{44}\text{H}_{68}\text{O}_{20}$ y una masa exacta de 916.43 uma, presenta dos picos correspondientes al ión molecular se encuentran como aductos con NH_4^+ ($m/z\ 934$) y con Na^+ ($m/z\ 939$), este último es también el pico base ($m/z\ 939$). Además de los picos correspondientes al patrón característico de fragmentación de los azúcares de los thevetósidos acetilados se pueden apreciar el pico de la aglicona monoglicosilada ($m/z\ 593$), y luego de la pérdida de una moléculas de agua ($m/z\ 575$) (fig. 20).

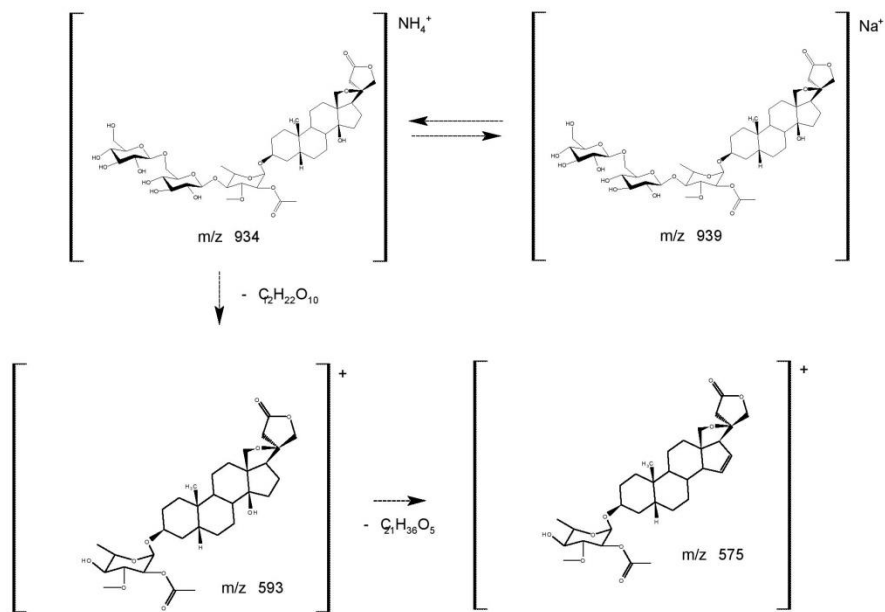


Figura 22: Patrón de fragmentación de acetilthevetina C

7.2.7 Nerifolina

Nerifolina tiene una fórmula molecular de $\text{C}_{30}\text{H}_{46}\text{O}_8$ y una masa exacta de 534.68 uma y son presentes dos picos correspondientes al ión molecular, uno como aducto de H^+ (m/z 535) y uno como dímero con sí mismo (m/z 1070).

En el espectro también se encuentran los picos correspondientes a la nerifolina deshidratada (m/z 517) y a la aglicona (m/z 375) luego de la pérdida de una (m/z 357) y dos (m/z 339) moléculas de agua, este último pico representa al pico base.

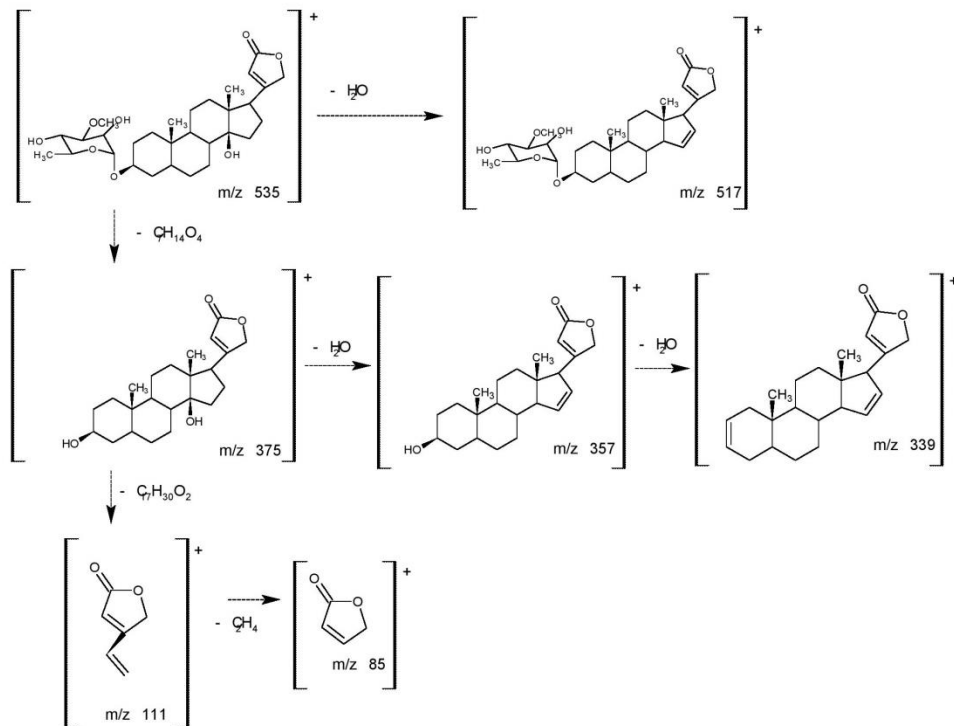


Figura 23: Patrón de fragmentación de nerifolina

7.2.8 Acetilnerifolina

Acetilnerifolina tiene una fórmula molecular de $C_{32}H_{48}O_9$ y una masa exacta de 576.62 uma, el pico base (m/z 85) representa el anillo lactónico luego de la ruptura de la estructura de la aglicona. Acetilnerifolina presenta dos picos correspondientes al ión molecular, uno como aducto de H^+ (m/z 577) y uno como dímero con sí mismo (m/z 1154).

Además de los picos correspondientes al patrón característico de los thevetósidos acetilados (m/z 171, m/z 203) se pueden apreciar el pico de la aglicona luego de la pérdida de dos moléculas de agua (m/z 339) y de otro fragmento de su anillo lactónico (m/z 111) (fig. 22).

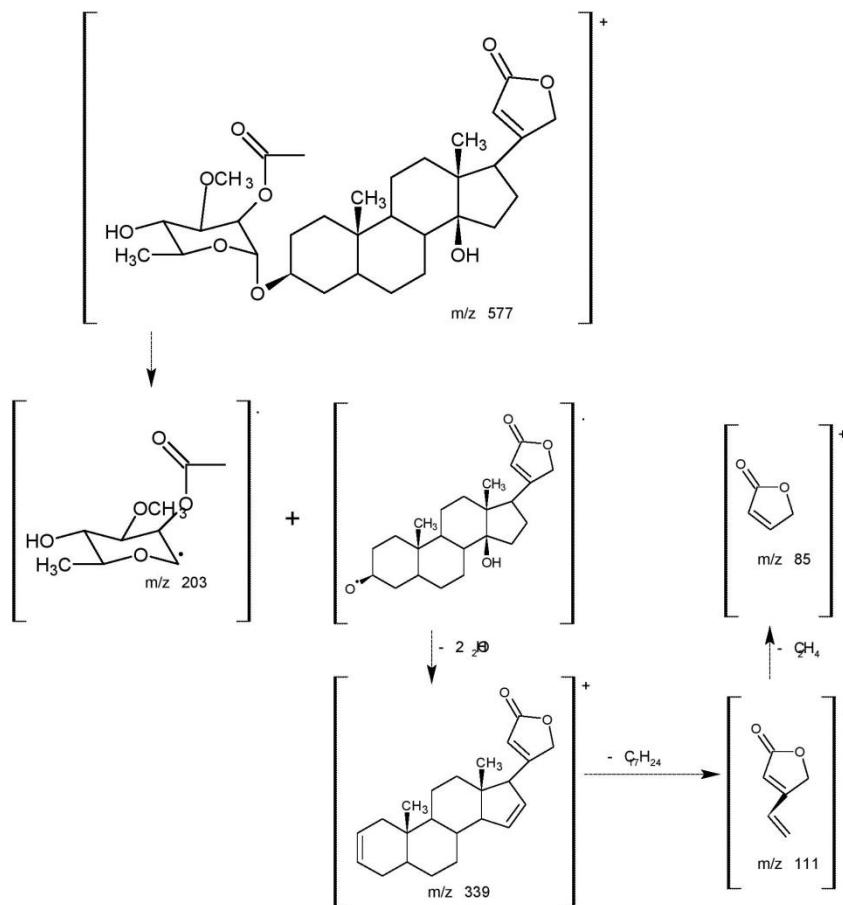


Figura 24: Patrón de fragmentación de acetilnerifolina

7.2.9 Acetilperuvosido

Acetilperuvosido tiene una fórmula molecular de $C_{32}H_{46}O_{10}$ y una masa exacta de 590.31 uma. El pico base (m/z 85) representa el anillo lactónico luego de la ruptura de la estructura de la aglicona y presenta dos picos correspondientes al ión molecular, uno como aducto de H^+ (m/z 591) y uno como dímero con sí mismo (m/z 1182).

Además de los picos correspondientes al patrón característico de los thevetósidos acetilados (m/z 171, m/z 203) se pueden apreciar el pico de la aglicona luego de la pérdida de una (m/z 371) y dos (m/z 353) moléculas de agua y de otro fragmento de su anillo lactónico (m/z 111) (fig. 22).

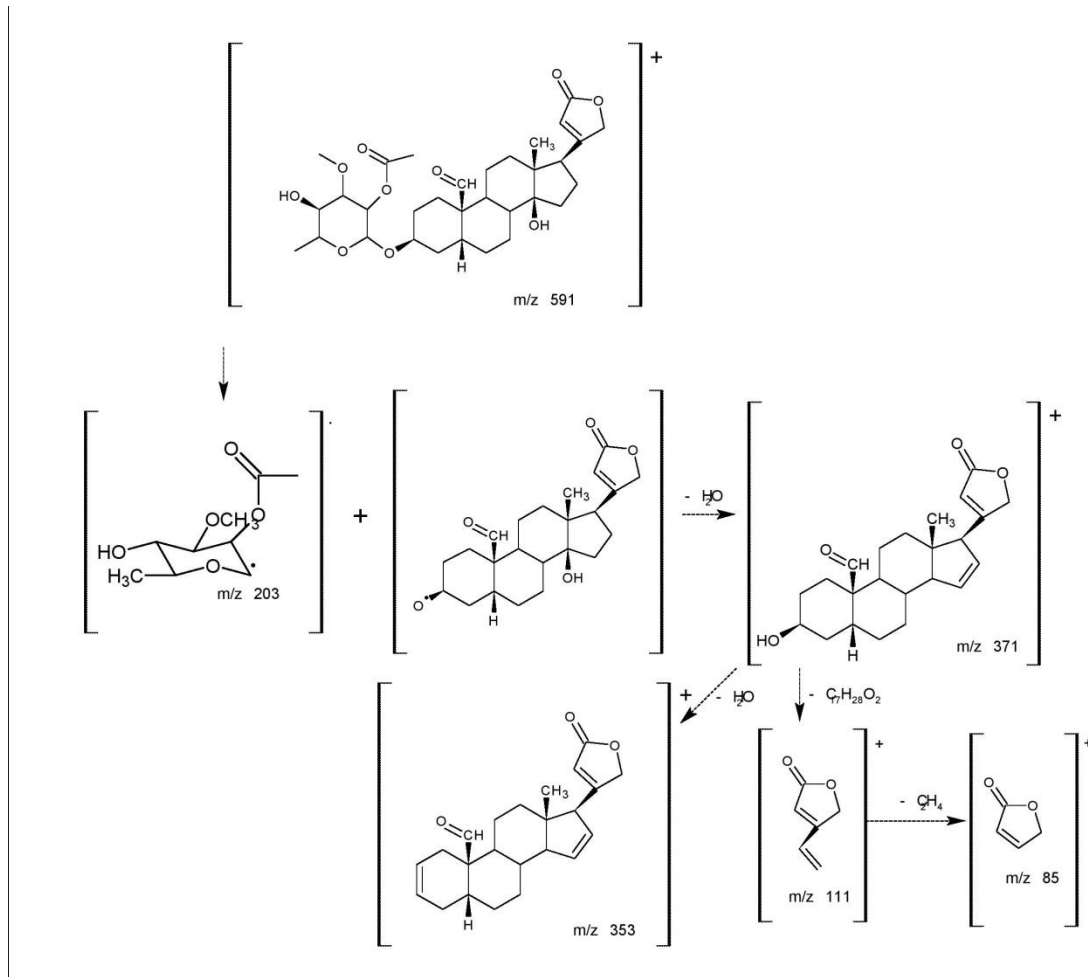


Figura 25: Patrón de fragmentación de acetilperuvosido

7.3 Identificación de ácidos grasos

La fracción de ácidos grasos fue corrida en cromatografía de gases y sus picos fueron comparados con la librería de espectros NIST MS Search 2.0 para poderlos identificar. En la columna "similitud" se presentan los valores del dato obtenido por el index SI, que compara los espectros obtenidos con los presentes en el banco de datos y tiene un valor máximo de 1000 (Cuadro 9).



Cuadro 8: datos de analisis de los acidos grasos de *T.thevetioides*

# pico	Nombre como éster metílico	Tiempo Retención (segundos)	Área %	Formula	CAS	Similitud	PM
1	Ácido mirístico	352.666	0.15131	C15H30O2	124-10-7	792	242
2	Ácido Palmitoleico	410.866	0.27084	C17H32O2	56875-67-3	931	268
3	Ácido palmitico	421.566	27.103	C17H34O2	112-39-0	915	270
4	Ácido margarico	447.416	0.18540	C18H36O2	1731-92-6	863	284
5	Ácido linoleico	473.016	36.801	C19H34O2	112-63-0	852	294
6	Ácido 16 octadecenoico	474.566	4.4741	C19H36O2	56554-49-5	781	296
7	Ácido oleico	476.416	14.002	C19H36O2	1937-62-8	919	296
8	Ácido 13, 16 octadecadienoico	476.816	6.1674	C19H34O2	56846-99-2	845	294
9	Ácido esteárico	480.366	7.6582	C19H38O2	112-61-8	877	298
10	Ácido vaccénico	522.716	0.44791	C19H36O2	52380-33-3	914	264
11	Ácido araquídico	530.066	1.9273	C21H42O2	1120-28-1	897	326
12	Ácido behénico	579.016	0.56549	C23H46O2	929-77-1	807	354

7.3.1 Determinación del contenido de metales pesados:

El contenido de metales pesados de las semillas de *T. thevetioides* con referencia al plomo se encontró entre las 10 ppm y las 20 ppm, con esta concentración se puede afirmar que ninguno de los efectos tóxicos de *T. thevetioides* puede ser causado por una intoxicación de metales



pesados.

7.3.2 Prueba de inhibición de Acetilcolinesterasa

Se puede notar como la actividad de Acetilcolinesterasa no es disminuida por la presencia de los Thevetósidos, inclusive parece aumentada siendo que muestra siempre una actividad superior a la actividad encontrada en el control negativo que es directamente proporcional a la concentración de thevetósidos llegando a un máximo del 183% en presencia de la concentración más alta (10 mg/mL) sugiriendo una posible actividad inductora sobre la enzima (Fig.24).

En un trabajo reciente (Marroquin *et al*, 2014) se describe que el extracto acuoso de *Thevetia peruviana* aumenta la actividad de acetilcolinesterasa en ratones, lo que confirma el resultado obtenido en este estudio, estos resultados sugieren que los efectos tóxicos de *T.thevetioides* como dolor muscular, dolor de cabeza, náusea y vómito no están relacionados a su capacidad de inhibir la enzima Acetilcolinesterasa.

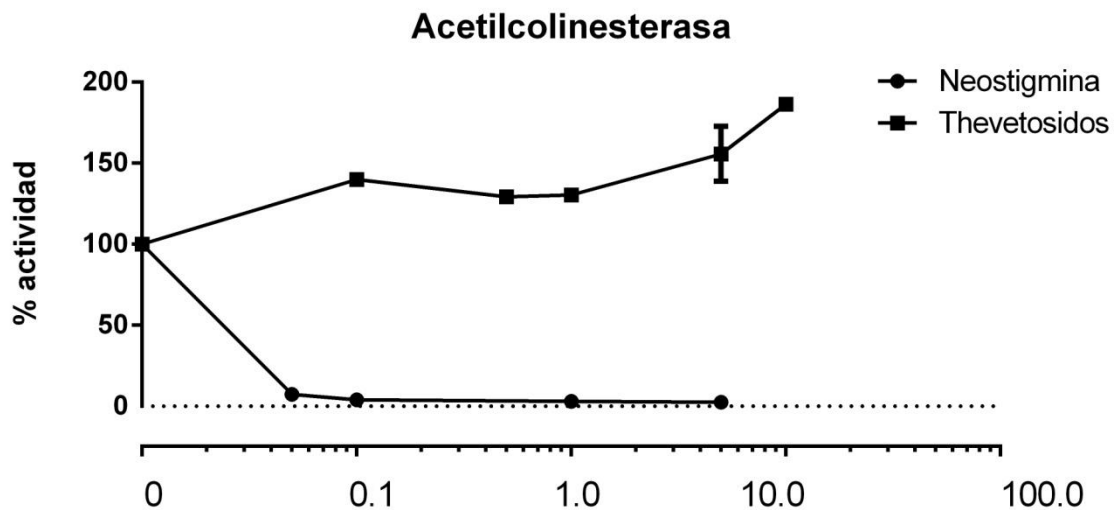


Figura 26: Gráfica de la inhibición de Acetilcolinesterasa por thevetósidos y neostigmina

7.3.3 Pruebas de inhibición de α -glucosidasa

Se puede notar como la actividad de α -glucosidasa no es disminuida por la presencia de los Thevetósidos (Fig. 27), que al igual que en la inhibición de la acetilcolinesterasa parece aumentada, con un máximo del 187% en la concentración de 5 mg/mL, sugiriendo una posible



actividad inductora de los thevetósidos sobre la enzima.

Estos resultados sugieren que la diarrea que se presenta en los individuos que consuman *T. thevetioides* no es resultado de la inhibición de α -glucosidasa.

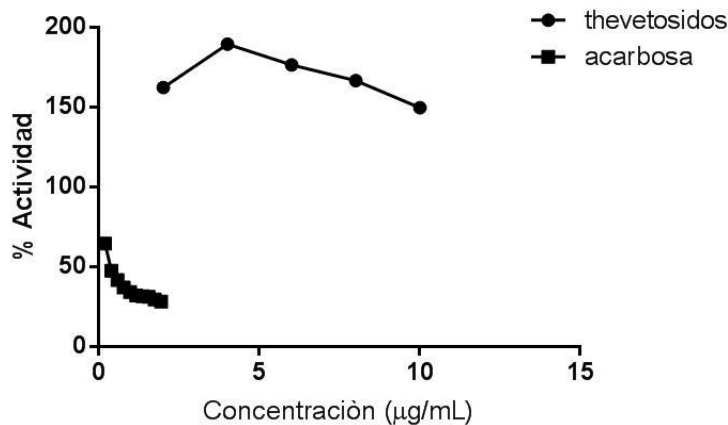


Figura 27: Gráfica de la inhibición de α -glucosidasa por thevetósidos y acarbosa

7.3.4 Pruebas de inhibición enzimáticas de citocromo P450.

No se detectó actividad inhibitoria de los glicósidos de *T. thevetioides* sobre ninguna de las tres isoenzimas. Las pruebas presentan indicios de posible activación enzimática, especialmente sobre la isoenzima 3A4.

Los resultados obtenidos sugieren que la asunción de thevetósidos no crea problemas en el metabolismo de medicamentos que sean metabolizados por estos tres citocromos.

7.3.4.1 CYP1A2

Se puede notar como la actividad de CYP1A2 no es disminuida significativamente por la presencia de los thevetósidos alcanzando su máxima inhibición (inferior al 20%) sólo con la concentración más alta de thevetósidos (218μg/mL), en cambio con la furafilina la inhibición presentó un comportamiento concentración- dependiente (Fig.26).

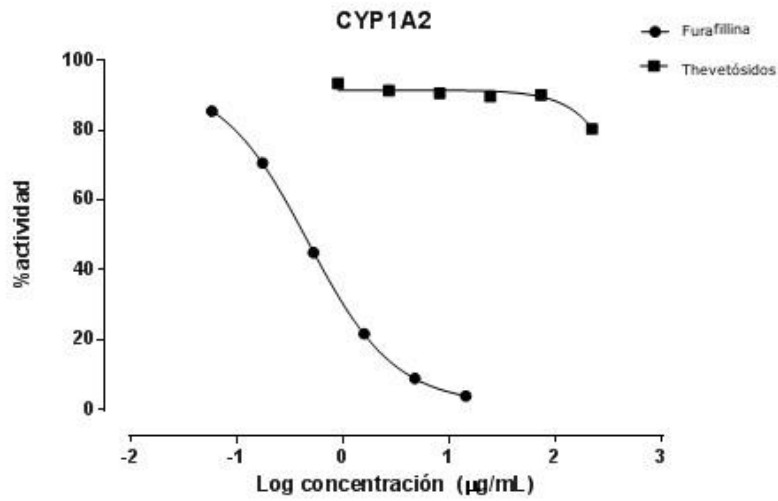


Figura 28: Grafica de la inhibición de CYP1A2 por thevetósidos

7.3.4.2 CYP2D6

Se puede notar como la actividad de CYP2D6 no es disminuida por la presencia de los Thevetósidos manteniendo siempre un valor superior al encontrado en el control negativo, en cambio la quinidina inhibió correctamente a esta isoenzima (Fig. 27).

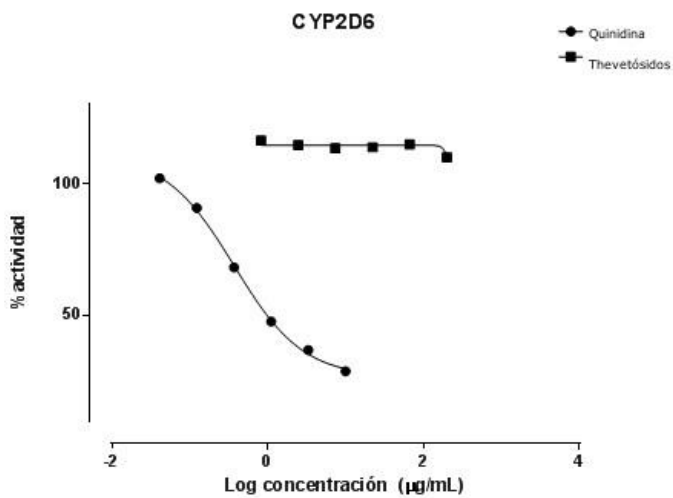


Figura 29: Grafica de la inhibición de CYP2D6 por thevetósidos



7.3.4.3 CYP3A4

Se puede notar como la actividad de CYP3A4 no es disminuida por la presencia de los Thevetósidos hasta parece aumentada siendo que presenta siempre una actividad superior a la encontrada en el control negativo con un máximo de 137% en presencia de la concentración más baja (0.82 $\mu\text{g}/\text{mL}$) con excepción de la concentración más alta (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en la cual la actividad baja al 89% (Fig.28).

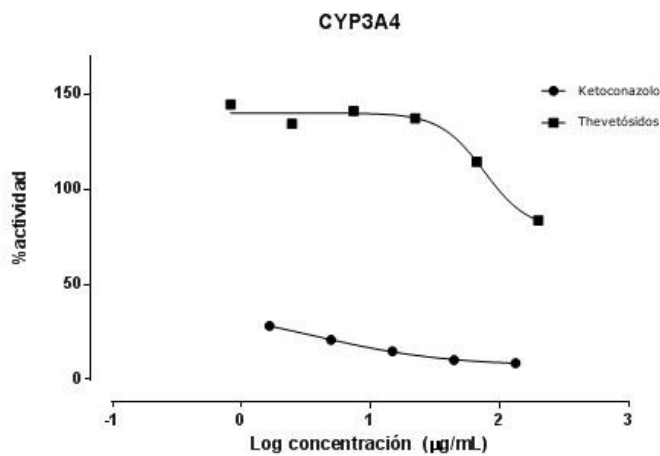


Figura 30: Grafica de la inhibición de CYP3A4 por thevetósidos

7.3.5 Prueba de viabilidad.

Se vio en la prueba de viabilidad que la presencia de los thevetósidos no influencia el crecimiento de las células.



7.3.6 Permeabilidad por células CaCo-2.

Las pruebas de permeabilidad por Glicoproteína P fueron realizadas en duplicado en ambas las direcciones Apical-Basolateral/Basolateral-Apical (A-B/B-A) con 4 concentraciones de thevetósidos (100 µg/mL – 750 µg/mL) con control de propranolol en duplicado y con control final de integridad de membrana por Lucifer Yellow.

Las pruebas de viabilidad de las células CaCo-2 en presencia de thevetósidos resultaron positivas en las cuatro concentraciones ocupadas en nuestro ensayo demostrando de no tener ningún efecto citotóxico o inhibitor del crecimiento sobre las células.

Se evaluaron tres thevetósidos: thevetina A, thevetina B y thevetina C, ocupando thevetina A como estándar para cuantificar los tres.

La permeabilidad de los tres compuestos a través de la membrana fue baja y no repetible, en ambas direcciones.

En la mayoría de las muestras del ensayo no pudimos detectar la presencia de los tres compuestos y en las muestras en las cuales relevamos la presencia no resultaron ser repetibles y tampoco encontramos una presencia significativamente mayor en la dirección B-A que hubiera sugerido un pasaje a través de la glicoproteína P (Cuadro 10).

Los datos colectados en estas pruebas no fueron suficientes para calcular un dato de Permeabilidad Aparente por los thevetósidos.

Estos resultados llevan a la conclusión que los thevetósidos tienen una permeabilidad limitada y que esta no es una vía de eliminación importante para estos compuestos como lo es por digoxina (Horn, 2004).

Cuadro 9: Concentraciones de thevetósidos encontradas en dirección A-B y B-A en ensayo por CaCo-2.

Apical-Basolateral (A-B)							Basolateral – Apical (B-A)						
Concentración mezcla de glicósidos 100 µg/mL							Concentración mezcla de glicósidos 100 µg/mL						
tiempo [min]	Thevetina A [µg/mL]		Thevetina B [µg/mL]		Thevetina C [µg/mL]		tiempo [min]	Thevetina A [µg/mL]		Thevetina B [µg/mL]		Thevetina C [µg/mL]	
60	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	90	-	-	-	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	120	-	-	-	-	-	-
Concentración mezcla de glicósidos 250 µg/mL							Concentración mezcla de glicósidos 250 µg/mL						



60	-	-	-	-	-	-	60	-	-	0.415	-	-	-
90	-	-	-	-	-	-	90	-	-	0.429	-	-	-
120	-	-	-	-	-	-	120	-	-	0.415	-	-	-
Concentración mezcla de glicósidos 500 µg/mL							Concentración mezcla de glicósidos 500 µg/mL						
60	-	-	-	-	-	-	60	-	-	-	-	-	-
90	-	-	0.536	0.43	-	-	90	0.679	-	0.379	1.904	0.917	-
120	-	-	-	0.494	0.317	-	120	0.557	-	0.359	1.47	0.795	-
Concentración mezcla de glicósidos 750 µg/mL							Concentración mezcla de glicósidos 750 µg/mL						
60	-	-	-	-	-	-	60	-	-	0.798	-	-	-
90	-	-	-	-	0.319	-	90	0.312	-	1.163	0.494	0.45	-
120	-	-	0.558	-	-	-	120	0.465	-	0.419	0.521	0.618	-

8 Conclusiones

Las conclusiones que se desprenden del presente trabajo son:

- Las semillas de *Thevetia thevetioides* presentan 6 glicosidos cardioactivos de cadena completa (Thevetina A, thevetina B, thevetina C, acetilthevetina A, acetilthevetina B, acetilthevetina C) y 3 monoglicosilados (nerifolina, acetilnerifolina, acetilperuvosido).
- Los efectos adversos debidos a la asunción de la semilla no están relacionados con la inhibición de α -glucosidasa ni de Acetilcolinesterasa.
- Los thevetósidos no inhiben las isoformas 1A2, 2D6 Y 3A4 de Citocromo P450.
- Los thevetósidos no son sustrato de la Glicoproteína P y parecen tener una permeabilidad extremadamente baja a través de la membrana de células intestinales CaCo-2 en ambas las direcciones.

9 Perspectivas

Las pruebas de inhibición enzimática nos demostraron como la presencia de los thevetósidos dio como resultados valores más altos del control negativo por los enzimas Acetilcolinesterasa, α -glucosidasa y CYP3A4 así que unos estudios de inducción enzimática podrían ayudar a descubrir



si los thevetósidos son inductores de estas tres enzimas.

Debido a la muy escasa permeabilidad de los thevetósidos por las membranas de CaCo-2 sería interesante evaluar si la presencia de estos afecta la permeabilidad de otros compuestos a través de las paredes intestinales, lo que justificaría el tipo de diarrea provocado por la ingestión de semillas de *Thevetia*. Así que estudios de permeabilidad conjunta entre thevetósidos y glucosa o thevetósidos y sustratos de glicoproteína P (ej. Digoxina) ayudarían a comprender mejor este mecanismo.

10 Bibliografía

- Abe, F., Chen, R. F., & Yamauchi, T. (1996). Dinormonoterpenoids and their apiosylglucosides from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*, 43(1), 161-163.
- Abe, F., Yamauchi, T., & Wan, A. S. (1992). Cardiac glycosides from the leaves of *Thevetia neriiifolia*. *Phytochemistry*, 31(9), 3189-3193.
- Abe, F., Yamauchi, T., Yahara, S., & Nohara, T. (1995). Minor iridoids from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry*, 38(3), 793-794.
- Ambang, Z., Ngoh Dooh, J. P., Essono, G., Bekolo, N., Chewachong, G., & Asseng, C. C. (2010). Effect of *Thevetia peruviana*'Seeds Extract on 'in vitro' Growth of Four Strains of *Phytophthora megakarya*'. *Plant Omics*, 3(3), 70.
- Argueta Arturo, María Concepción Gallardo Vázquez (1994) Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Onstituto Nacional Indigenista, Mexico.
- Atteh, J. O., Ibiyemi, S. A., & Ojo, A. O. (1995). Response of broilers to dietary levels of thevetia cake. *JOURNAL OF AGRICULTURAL SCIENCE-CAMBRIDGE*, 125, 307-307.
- Balusamy, T., & Marappan, R. (2007). Performance evaluation of direct injection diesel engine with blends of *Thevetia peruviana* seed oil and diesel. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 66(12), 1035.
- Balusamy, T., & Marappan, R. (2010). Effect of injection time and injection pressure on CI engine fuelled with methyl ester of *Thevetia peruviana* seed oil. *International Journal of Green Energy*, 7(4), 397-409.
- Bandara, V., Weinstein, S. A., White, J., & Eddleston, M. (2010). A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*, 56(3), 273-281.
- Batrakova, E. V., Li, S., Vinogradov, S. V., Alakhov, V. Y., Miller, D. W., & Kabanov, A. V. (2001). Mechanism of pluronic effect on P-glycoprotein efflux system in blood-brain barrier: contributions of energy depletion and membrane fluidization. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 299(2), 483-493.
- Berne, R. M., Levy, M. N. (2001) *Fisiología* 3ra edición, capítulo 32. Ediciones Harcourt
- Brindis, F., Rodríguez, R., Bye, R., González-Andrade, M., & Mata, R. (2010). (Z)-3-Butylidenephthalide from *Ligusticum porteri*, an α -
- Glucosidase Inhibitor. *Journal of natural products*, 74(3), 314-320.
- Bruneton J (2001) Farmacognosia. Fitoquímica de plantas medicinales 2ª edición, Acribia.



- CAI, Xianmei, et al. Approach to improve compound recovery in a high-throughput Caco-2 permeability assay supported by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical sciences*, 2012, vol. 101, no 8, p. 2755-2762.
- Campero Peredo, Cristina (2013) Evaluación del efecto de complejos antitumorales de cobre II, Casiopeínas, sobre la actividad del Citocromo P450. Tesis UNAM
- Campos Paniagua, J. A. (2009). *Determinación de la actividad anticancerígena in vitro de los glicósidos cardiotónicos de los frutos de Thevetia ahouia (cojón de costa de hojas largas) y Thevetia peruviana (Chilca) familia apocynaceae*(Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
- Carlsen, S. A., Till, J. E., & Ling, V. (1976). Modulation of membrane drug permeability in Chinese hamster ovary cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 455(3), 900-912.
- Chen, K. K., & Chen, A. L. (1934). The action of crystalline thevetin, a cardiac glucoside of *Thevetia nerifolia*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 51(1), 23-34.
- Dani, J. A., & Bertrand, D. (2007). Nicotinic acetylcholine receptors and nicotinic cholinergic mechanisms of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 47, 699-729.
- De Silva, H. A., Fonseka, M. M. D., Pathmeswaran, A., Alahakone, D. G. S., Ratnatilake, G. A., Gunatilake, S. B., ... & De Silva, H. J. (2003). Multiple-dose activated charcoal for treatment of yellow oleander poisoning: a single-blind, randomised, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 361(9373), 1935-1938.
- Deka, D. C., & Basumatary, S. (2011). High quality biodiesel from yellow oleander (*Thevetia peruviana*) seed oil. *Biomass and Bioenergy*, 35(5), 1797-1803.
- Dominguez, Xavier A. Métodos de investigación fitoquímica. Wiley, 1972
- Eddleston, M., Ariaratnam, C. A., Meyer, W. P., Perera, G., Kularatne, A. M., Attapattu, S., ... & Warrell, D. A. (1999). Epidemic of self-poisoning with seeds of the yellow oleander tree (*Thevetia peruviana*) in northern Sri Lanka. *Tropical Medicine & International Health*, 4(4), 266-273.
- Eddleston, M., Ariaratnam, C. A., Meyer, W. P., Perera, G., Kularatne, A. M., Attapattu, S., ... & Warrell, D. A. (1999). Epidemic of self-poisoning with seeds of the yellow oleander tree (*Thevetia peruviana*) in northern Sri Lanka. *Tropical Medicine & International Health*, 4(4), 266-273.
- Eddleston, M., Ariaratnam, C. A., Sjöström, L., Jayalath, S., Rajakanthan, K., Rajapakse, S., ... & Warrell, D. A. (2000). Acute yellow oleander (*Thevetia peruviana*) poisoning: cardiac arrhythmias, electrolyte disturbances, and serum cardiac glycoside concentrations on presentation to hospital. *Heart*, 83(3), 301-306.
- Ellman, G. L., Courtney, K. D., & Featherstone, R. M. (1961). A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2), 88-95.
- Endress, M. E., & Bruyns, P. V. (2000). A revised classification of the Apocynaceae sl. *The Botanical Review*, 66(1), 1-56.
- Estrada Manilla, Lucia (2014). Efecto limitante de la glicoproteína P como transportador intestinal de eflujo en la absorción oral y biodisponibilidad de fármacos. Tesis Unam
- Fallingborg, J. (1999). Intraluminal pH of the human gastrointestinal tract. *Danish medical bulletin*, 46(3), 183-196.
- Flores Bocanegra, Laura Cecilia (2013). Inhibidores de α -glucosidasas de *Vaquelinia Corymbosa*. Tesis Unam.
- Galsky, A. G., Wilsey, J. P., & Powell, R. G. (1980). Crown Gall Tumor Disc Bioassay a possible aid in the detection of compounds with antitumor activity. *Plant physiology*, 65(2), 184-185.
- Gata-Gonçalves, L., Nogueira, J. M. F., Matos, O., & Bruno de Sousa, R. (2003). Photoactive extracts from *Thevetia peruviana* with antifungal properties against *Cladosporium cucumerinum*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 70(1), 51-54.
- Gibaldi, M. (1991). Biopharmaceutics and clinical pharmacokinetics.
- Griffin, B., & O'Driscoll, C. (2008). Models of the small intestine. In *Drug Absorption Studies* (pp. 34-76). Springer US.}
- Guengerich, F. P. (2003). Cytochromes P450, drugs, and diseases. *Molecular interventions*, 3(4), 194.
- Harel, M., Quinn, D. M., Nair, H. K., Silman, I., & Sussman, J. L. (1996). The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *Journal of the American Chemical Society*, 118(10), 2340-2346.



- Hirabayashi, H., Sugimoto, H., Matsumoto, S., Amano, N., & Moriwaki, T. (2011). Development of a quantification method for digoxin, a typical P-glycoprotein probe in clinical and non-clinical studies, using high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry: The usefulness of negative ionization mode to avoid competitive adduct-ion formation. *Journal of Chromatography B*, 879(32), 3837-3844.
- Hogben, C. A. M., Schanker, L. S., Tocco, D. J., & Brodie, B. B. (1957). Absorption of drugs from the stomach. II. The human. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 120(4), 540-545.
- Horn, J. R., & Hansten, P. D. (2004). Drug interactions with digoxin: the role of P-glycoprotein. *Pharmacy times*, 70, 45-45.
- Ibiyemi, S. A., Fadipe, V. O., Akinremi, O. O., & Bako, S. S. (2004). Variation in oil composition of *Thevetia peruviana* Juss' yellow oleander'fruit seeds. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*, 6(2), 61-65.
- Ingelman-Sundberg, M. (2004). Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *The pharmacogenomics journal*, 5(1), 6-13.
- Kandasamy, K. T., & Rakkiyanna, G. M. (2011). *Thevetia Peruviana* biodiesel emulsion used as a fuel in a single cylinder diesel engine reduces NOx and smoke. *Thermal Science*, 15(4), 1185-1191.
- Kinlay, S., & Buckley, N. A. (1995). Magnesium sulfate in the treatment of ventricular arrhythmias due to digoxin toxicity. *Clinical Toxicology*, 33(1), 55-59.
- Kohls Sarah , Barbara M. Scholz-Botcher, TeskeJorg., Zark Patrick, Rullkoter Jürgen (2012) Cardiac glycosides from Yellow Oleander (*Thevetiaperuviana*) seeds ; *Phytochemistry* Vol.75.
- Kuriki, T., & Imanaka, T. (1999). The concept of the α -amylase family: structural similarity and common catalytic mechanism. *Journal of bioscience and bioengineering*, 87(5), 557-565.
- Lang, N.P. et al., 1994. Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and puntative exposure to food-born heterocyclic amines increase the risk for colorrectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiology Biomarkers*, 3, pp.675 – 682.
- Le, Jennifer (2014) Review on drug absorption. Merck Manuals.
- Lebovitz, H. E. (1997). Alpha-glucosidase inhibitors. *Endocrinology and metabolism clinics of North America*, 26(3), 539-551.
- Lingrel, J. B., & Kuntzweiler, T. (1994). Na⁺, K⁺ (+)-ATPase. *Journal of Biological Chemistry*, 269(31), 19659-19662.
- Liu, Q., Tang, J. S., Hu, M. J., Liu, J., Chen, H. F., Gao, H., ... & Yao, X. S. (2013). Antiproliferative Cardiac Glycosides from the Latex of *Antiaris toxicaria*. *Journal of natural products*, 76(9), 1771-1780.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Leza, J. C., Lizasoain, T., & Moro, M. A. (2007) Velásquez. *Farmacologia basica y clinica. 17a edition. Edit. Medica Panamericana*, 1063-1070.
- Luo, F. R., Paranjpe, P. V., Guo, A., Rubin, E., & Sinko, P. (2002). Intestinal transport of irinotecan in Caco-2 cells and MDCK II cells overexpressing efflux transporters Pgp, cMOAT, and MRP1. *Drug metabolism and disposition*, 30(7), 763-770.
- Lynch, T., Price, A. (2007). The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects.
- Marcus, F. I., Kapadia, G. J., & Kapadia, G. G. (1964). The metabolism of digoxin in normal subjects. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 145(2), 203-209.
- McLaughlin J.L., Freedman B., Powell R.G. (1980) Insecticidal and Cytotoxic agents of *Thevetiathvetioides* seeds. *Journal of economic entomology*.
- Mohibbe Azam, M., Waris, A., & Nahar, N. M. (2005). Prospects and potential of fatty acid methyl esters of some non-traditional seed oils for use as biodiesel in India. *Biomass and Bioenergy*, 29(4), 293-302.
- Moorthy SHN, Ramos N., J, M., & A Fernandes, P. (2012). Studies on α -Glucosidase Inhibitors Development: Magic Molecules for the Treatment of Carbohydrate Mediated Diseases. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 12(8), 713-720.



- Muñoz Espinal, Maria de Jesus (2001) Determinacion del coeficiente de permeabilidad aparente de los compuestos diclorados derivados del 1-metilbencimidazol empleando a la linea celular Caco-2 como modelo biologico in vitro, Tesis Unam
- OPAQ (1993). convencion sobre la prohibicion del desarrollo, la produccion, el almacenamiento y el empleo de armas quimicas y sobre su destruccion.
- Peiris-John, R. J., & Wickremasinghe, A. R. (2008). Efficacy of activated charcoal in yellow oleander poisoning: Conflicting data perpetuate the debate. *Ceylon Medical Journal*, 53(2), 33-35.
- PELT, Jean Marie (1999) The cinnamon and the panda; Ediciones Fayard.
- Pinto R., Fogh J. *et al* (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47.
- Prasad, K., Badarinath, A. V., Anilkumar, P., Reddy, B. R., Naveen, N., Nirosha, M., & Hyndavi, M. (2011). Colon Targeted Drug Delivery Systems: A Review. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Sciences*, 2(4), 459-475.
- Roberts, D. M., Southcott, E., Potter, J. M., Roberts, M. S., Eddleston, M., & Buckley, N. A. (2006). Pharmacokinetics of digoxin cross-reacting substances in patients with acute yellow Oleander (Thevetia peruviana) poisoning, including the effect of activated charcoal. *Therapeutic drug monitoring*, 28(6), 784.
- Rojas Alba Mario (2009) Tratado de medicina tradicional Mexicana 3ª edicion, Tlahui.
- Rosas Maqueda, Jeanete (2012) Estudio fitoquímico en extractos de la semilla thevetiathevetioides (hbk). Thesis UNAM
- Russel, F. G. (2010). Transporters: importance in drug absorption, distribution, and removal. In *Enzyme-and Transporter-Based Drug-Drug Interactions* (pp. 27-49). Springer New York.
- Schanker, L. S., Shore, P. A., Brodie, B. B., & Hogben, C. A. M. (1957). Absorption of drugs from the stomach I. The rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 120(4), 528-539.
- Sowjanya, K. M., Narendra, K., Swathi, J., & Krishna Satya, A. (2013). Phytochemical extraction and antimicrobial efficiency of crude leaf extract of medicinal plant Cascabela thevetia. *Int J Res Pharm Biomed Sci*, 4(2), 465-470.
- Sugimoto, H., Hirabayashi, H., Kimura, Y., Furuta, A., Amano, N., & Moriwaki, T. (2011). Quantitative investigation of the impact of P-glycoprotein inhibition on drug transport across blood-brain barrier in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 39(1), 8-14.
- Tewtrakul, S., Nakamura, N., Hattori, M., Fujiwara, T., & Supavita, T. (2002). Flavanone and flavonol glycosides from the leaves of Thevetia peruviana and their HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase inhibitory activities. *Chemical and pharmaceutical bulletin*, 50(5), 630-635.
- Thilagavathi, R., Kavitha, H. P., & Venkatraman, B. R. (2010). Isolation, Characterization and Anti-Inflammatory Property of Thevetia Peruviana. *Journal of Chemistry*, 7(4), 1584-1590.
- Till J. and Ling, V., 1974, Increased drug permeability in Chinese hamster ovary cells in the presence of cyanide. *Biochim. Biophys. Acta*, 373, 242-252.
- Trevor, A. J., Katzung, B. G., & Masters, S. B. (2009). *Basic & clinical pharmacology*. McGraw-Hill Medical.
- Ueda, K., Cornwell, M. M., Gottesman, M. M., Pastan, I., Roninson, I. B., Ling, V., & Riordan, J. R. (1986). The mdrl gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochemical and biophysical research communications*, 141(3), 956-962.
- Villa, F. A., Hormaza, A., & Arias, M. (2011). Thevetin B: glicósido cardiotónico predominante en thevetia peruviana. *Scientia et Technica*, 3(49), 298-303
- Villacis R. Luis (1978) Plantas medicinales de mexico. Editorial época, Mexico.
- VOIGT, Wieland. Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. In: *Chemosensitivity*. Humana Press, 2005. p. 39-48.
- Withering William (1785) An account of the foxglove and some of its medical uses; with practical remarks on the dropsy, and some other diseases. Swinney publications, Birmingham, Inglaterra.
- Wolever, T. M., Chiasson, J. L., Josse, R. G., Hunt, J. A., Palmason, C., Rodger, N. W., ... & Tan, M. H. (1997). Small weight loss on long-term acarbose therapy with no change in dietary pattern or nutrient intake of



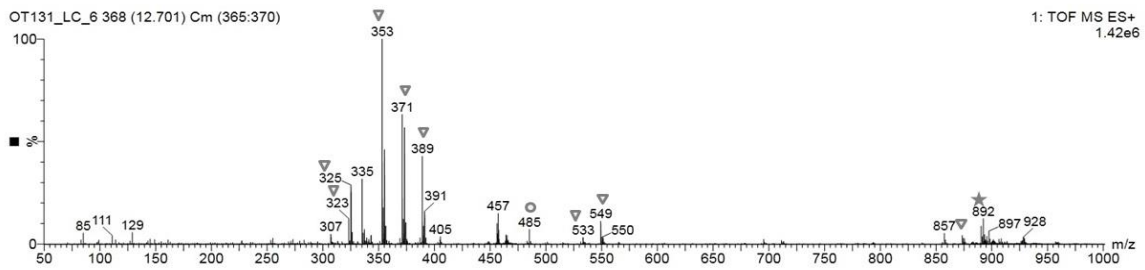
- individuals with non-insulin-dependent diabetes. *International journal of obesity and related metabolic disorders: journal of the International Association for the Study of Obesity*, 21(9), 756-763.
- Yu, L. X., Lipka, E., Crison, J. R., & Amidon, G. L. (1996). Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Advanced drug delivery reviews*, 19(3), 359-376.
 - Yuasa, H. (2008). Drug absorption from the colon in situ. In *Drug Absorption Studies* (pp. 77-88). Springer US.
 - Zibbu, G. & Batra, A. (2011). GC-MS analysis of the desert plants of Apocynaceae family: Nerium oleander L. and Thevetia peruviana (Pers.) Schum. *International Journal of Pharmaceutical Research & Development*, 3(10), 49-62.
 - Thomas, H., & Coley, H. M. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer control*, 10(2), 159-159.
 - Miller, T. L., & Wolin, M. J. (1996). Pathways of acetate, propionate, and butyrate formation by the human fecal microbial flora. *Applied and environmental microbiology*, 62(5), 1589-1592.
 - Evans, D. F., Pye, G., Bramley, R., Clark, A. G., Dyson, T. J., & Hardcastle, J. D. (1988). Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut*, 29(8), 1035-1041.



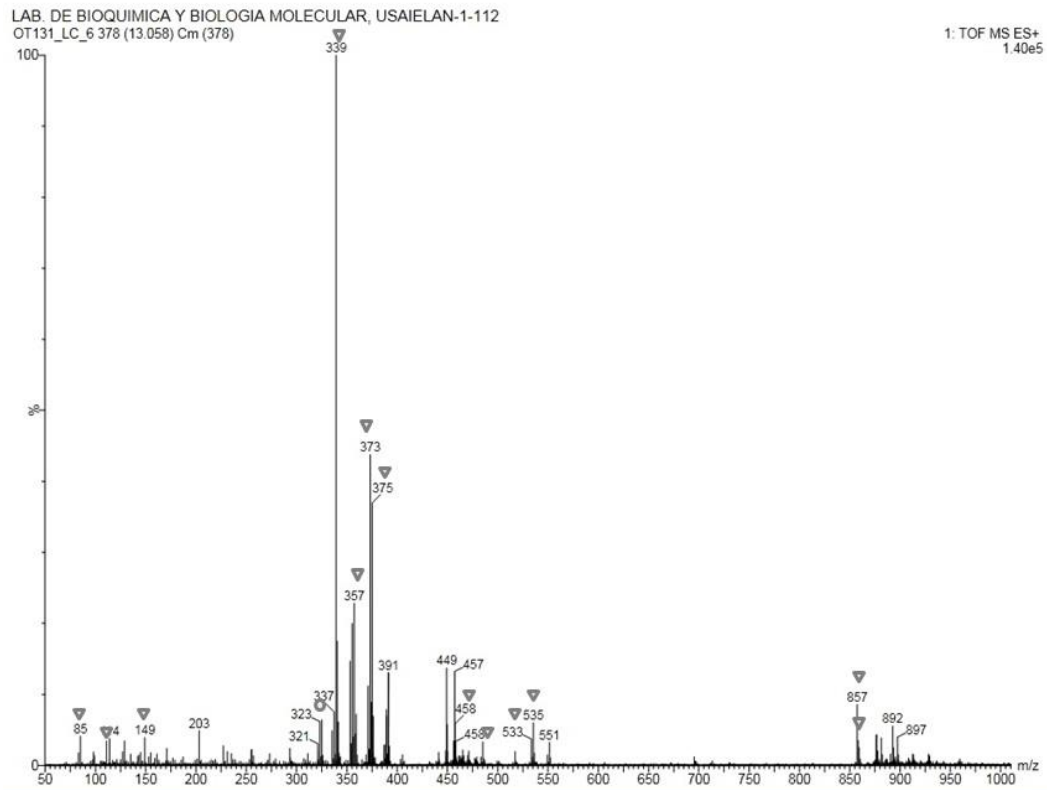
11 Anexos

Leyenda de los aductos:

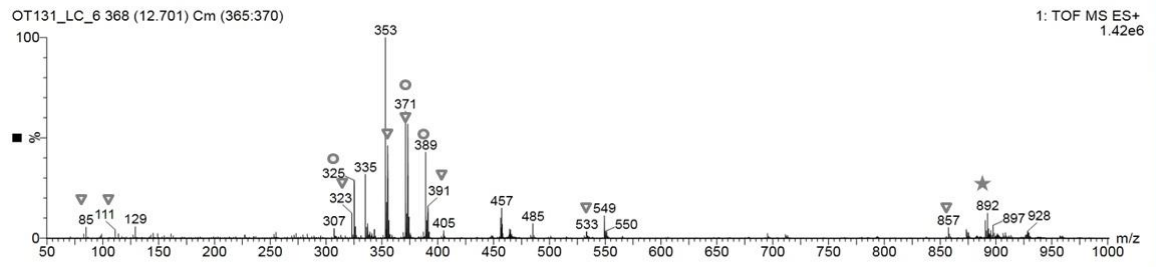
- ▼ $m + H^+$
- $m + Na^+$
- m^o
- ★ $m + NH_4^+$



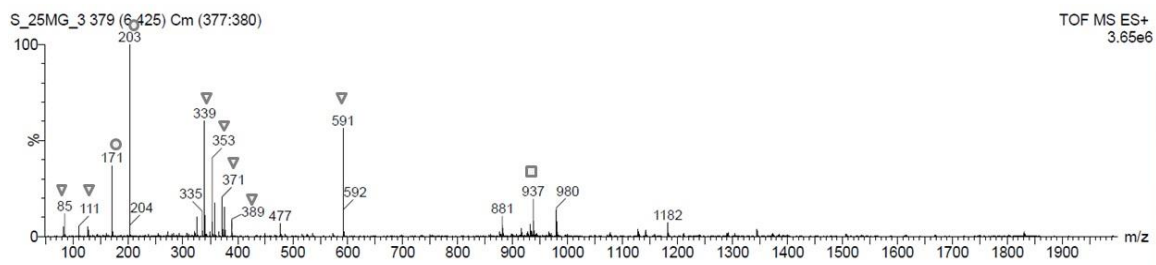
Anexo 1: Espectro de masas de Thevetina A



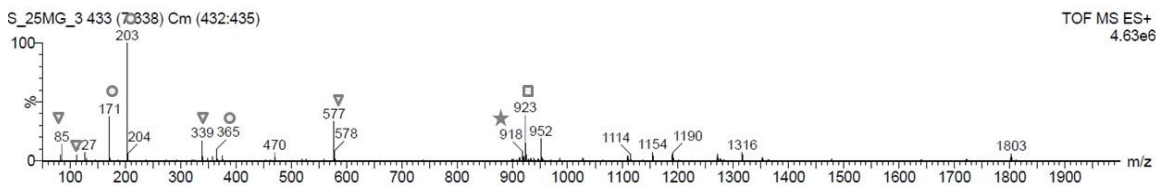
Anexo 2: Espectro de masas de Thevetina B



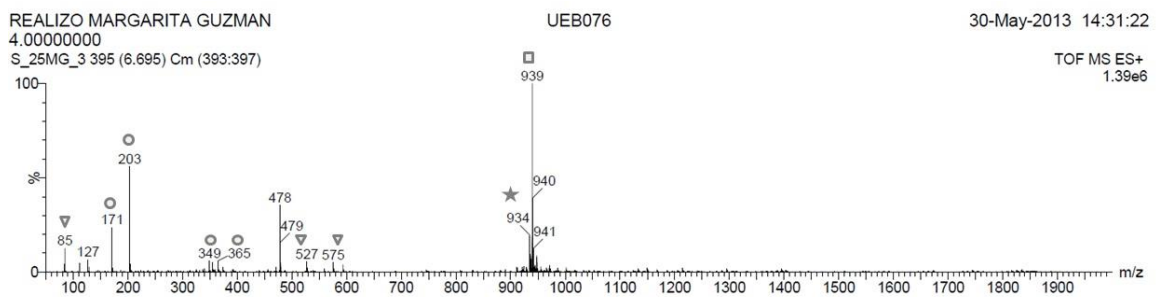
Anexo 3: Espectro de masas de Thevetina C



Anexo 4: Espectro de masas de Acetilthevetina A



Anexo 5: Espectro de masas de Acetilthevetina B



Anexo 6: Espectro de masas de Acetilthevetina C

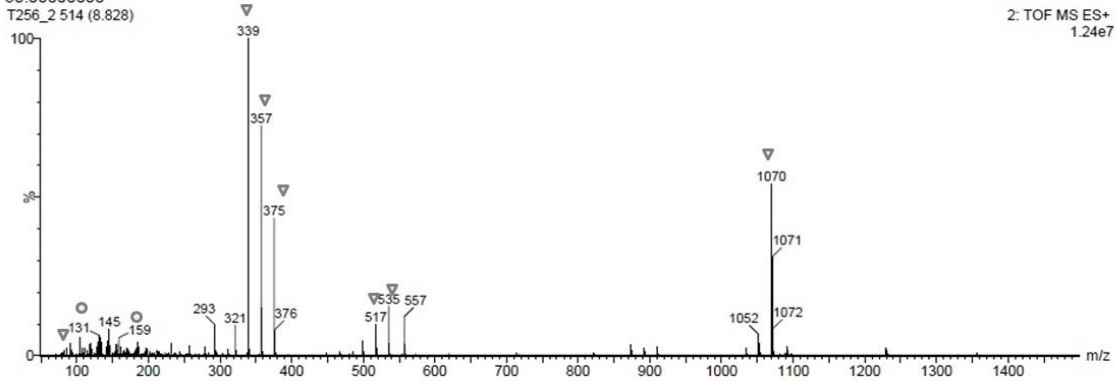


REALIZO: MARGARITA GUZMAN
30.00000000
T256_2_514 (8.828)

UEB076

10-Sep-2013 19:24:15

2: TOF MS ES+
1.24e7



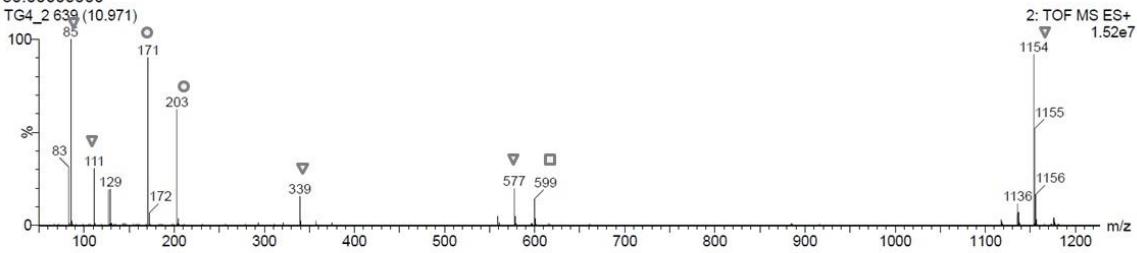
Anexo 7: Espectro de masas de Nerifolina

REALIZO: MARGARITA GUZMAN
30.00000000
TG4_2_639 (10.971)

UEB076

10-Sep-2013 19:08:15

2: TOF MS ES+
1.52e7



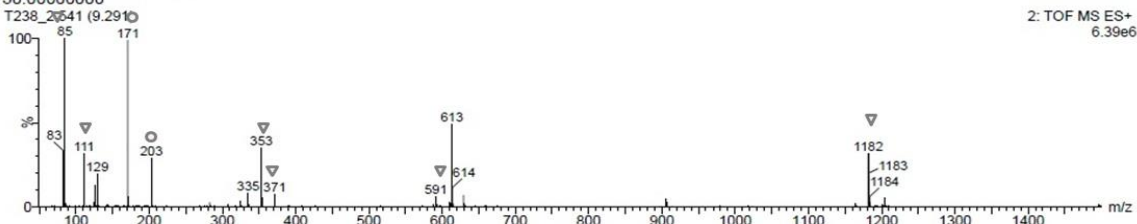
Anexo 8: Espectro de masas de Acetilnerifolina

REALIZO: MARGARITA GUZMAN
30.00000000
T238_2_641 (9.291)

UEB076

10-Sep-2013 19:56:10

2: TOF MS ES+
6.39e6



Anexo 9: Espectro de masas de Acetilperuvosido