



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**



**Neurotoxicidad de *Thevetia peruviana* en un modelo de
intoxicación aguda, en ratones CD1.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

GUZMÁN CRUZ ARELÍ

Director de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

Asesor de tesis: MC. Maurilio Flores Pimentel

MÉXICO, D. F. 2012

Agradecimiento al proyecto PE-200310 PAPIME, DGAPA UNAM



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.

*Dos excesos: excluir la razón,
no admitir más que la razón.
Blaise Pascal*

Agradecimientos.

A mi madre y a mi padre por su comprensión, paciencia y apoyo que me brindan en todo momento. Por hacer de mí la persona que soy, pero sobre todo gracias por su infinito cariño y amor desmedido que me dan. ¡Papá tu dedicación, mamá tus consejos!

A mis hermanas por su cariño y apoyo diario, por ser las mejores cómplices y amigas que pueda tener. Hilda, Yamile, Fanny gracias por la paciencia única que me tienen y por la valiosa solidaridad que representan juntas.

A mis primos, tíos y abuelos por la convivencia diaria, el apoyo y la motivación para terminar todo lo empezado y jamás dejarme rendir.

A Oscar por estar desde un inicio a mi lado indirectamente y aún seguir junto a mí por el mismo camino. ¡Por las sonrisas!

A Jacobo y Alejandro por ser los únicos sobrevivientes hasta ahora y nunca dejarme a la deriva.

Agradecimientos.

Al M.C. Ricardo Calvillo Esparza por los conocimientos brindados durante toda la observación experimental.

Al Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara por compartir su sabiduría día a día y por sus conocimientos en estadística fundamentales en el análisis de resultados de esta tesis.

A la Mtra. Yolanda Flores Cabrera por su dedicación en la revisión y corrección de esta tesis, por sus enseñanzas y conocimientos.

Al M.C. Maurilio Flores Pimentel por compartir sus habilidades en el manejo de animales, por la ayuda en la búsqueda de información y por los ratos agradables en mi estancia en el laboratorio.

Al Químico Carlos Salvador Valadez Sánchez y todo su equipo de trabajo de el laboratorio de síntesis orgánica por brindarnos un tiempo, espacio y dedicación en la elaboración del extracto de Thevetia peruviana.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura por brindarme su confianza y permitirme trabajar en este proyecto, por hacer tan placentera y amena mi estancia en el laboratorio, por compartir su enorme conocimiento y sabiduría, pero sobre todo por inculcarme su infinita calidad humana y sencillez que tanto lo caracteriza.

A la FES Zaragoza y a la UNAM.

Vea: "La mayor parte de los hombres no quieren nadar antes de saber." ¿No es esto espiritual? ¡No quieren nadar, naturalmente! Han nacido para la tierra, no para el agua. Y, naturalmente, no quieren pensar; como que han sido creados para la vida, ¡no para pensar! Claro, y el que piensa, el que hace del pensar lo principal, ése podrá acaso llegar muy lejos en esto; pero ése precisamente ha confundido la tierra con el agua, y un día u otro se ahogará.

*Hermann Hesse.
Fragmento de El Lobo Estepario.*

Tabla de abreviaturas.

AChE	Acetilcolinesterasa
ACTH	Corticotropina u hormona estimulante de la corteza suprarrenal
AMPC	Adenosín 3'-5'-monofosfato cíclico
cm	Centímetros
g	Gramos
GMPc	Monofosfato de guinidina cíclico
IL-1, IL-2	Interleucina 1 y 2
Kg	Kilogramos
L	Litros
mg	Miligramos
mL	Militros
Mmol	Milimoles
°C	Grados centígrados
OP	Organofosforados
PMN	Polimorfonucleares
TNF	Factor necrótico tumoral
μL	Microlitros

Contenidos.

1. Introducción	2
2. Marco teórico	4
2.1 Thevetia peruviana	4
2.2 Toxicología	7
2.3 Proceso inflamatorio agudo	14
2.3.1 Respuesta de fase aguda	20
2.4 Mecanismo de acción de los tóxicos	23
2.5 Técnica inmunológica de laboratorio	30
2.6 Modelo animal	32
3. Planteamiento del problema	33
4. Objetivos	34
5. Hipótesis	35
6. Materia, equipo y reactivos	36
7. Métodos	38
8. Diagrama de flujo	42
9. Resultados	43
10. Análisis estadístico	50
11. Análisis de resultados	52
12. Conclusiones	55
13. Glosario	56
14. Referencias	59

Resumen.

Se evaluó el efecto neurotóxico de un extracto acuoso de semilla de *Thevetia peruviana* en ratones CD 1, para ello se realizaron determinaciones de la enzima acetilcolinesterasa en sangre total. Ya que se había observado una sintomatología en los ratones muy parecidas a las presentadas en intoxicaciones con pesticidas organofosforados.

Se dividieron a los ratones en tres grupos: 1) Testigos, se les administró sólo solución salina para obtener los valores de referencia de la enzima. 2) Control positivo, se les dio una dosis de pesticida organofosforado el cual inhibe la acetilcolinesterasa. 3) Tratados, con tres dosis del extracto de *Thevetia peruviana* (50 mg/Kg cada hora), teniendo como hipótesis que esta planta posiblemente inhibe la acetilcolinesterasa por el síndrome muscarínico y nicotínico que presentan los ratones.

Se obtuvieron los siguientes resultados de las determinaciones de AChE: Grupo testigo su media fue de 1547.94 ± 72.407 U/L, para el control positivo su media fue de 1046.97 ± 49.860 U/L, la media para el grupo de tratados fue de 1902.67 ± 63.632 U/L. Pudiendo observar una notoria inhibición de la enzima en el grupo de control positivo comparando con los valores del grupo testigo, tal como se esperaba al ser intoxicados con un organofosforado. Mientras que para el grupo de tratados se observó una elevación de la concentración de la enzima, por lo que se cree que existe un mecanismo diferente al producido por los organofosforados, en el cual la acetilcolina no se une a la enzima haciendo que no se degrade y se de una acumulación de esta en la sangre.

1. Introducción.

En México, de acuerdo a las Encuestas Nacionales de Nutrición realizadas en los últimos once años, se ha sufrido una gran transición de mala nutrición por deficiencia, a una mala nutrición por exceso y desequilibrio alimenticios. Por tanto México se encamina a ser un país con obesos, de acuerdo con datos de la Secretaría de Salud, 26% de la población es obesa y el 52% (cerca de 54 millones de mexicanos) tiene sobrepeso. Se trata, sin duda, de un serio problema de salud pública, ya que la obesidad se asocia con enfermedades que constituyen las primeras causas de mortalidad en México, como las enfermedades del corazón y la diabetes *mellitus*.

Actualmente este problema de obesidad, ha provocado en la población una alarmada preocupación y con esto un consumo desmedido de los llamados productos “milagro”, que prometen curar distintos males y bajar de peso ofreciéndose como opción terapéutica casi milagrosa e inofensiva además de caracterizarse por ser productos de origen natural, lo cual resulta ser un concepto muy seductor en muchos sentidos ya que es asociado a una imagen de vida y bienestar al mismo tiempo que se aleja de lo artificial e industrial.

Sin embargo las personas que utilizan estos productos “milagro”, que aparentan ser inocuos, desconocen que pueden llegar a ser tóxicos para el organismo, peligrosos e incluso mortales. Ya que las semillas o infusiones de hierbas con las que están elaborados estos productos (alcachofa, té rojo, vinagre de manzana, ortosifón, etc.) y las personas consumen con la esperanza de bajar de peso, en otras regiones del mundo constituyen un método habitual de autointoxicación con fines suicidas y con un elevado porcentaje de mortalidad.

Tal es el caso de la *Thevetia peruviana* consumida con fines suicidas, particularmente en Sri Lanka, con una mortalidad cercana al 10%. Esta planta originaria del centro y sur de América. De uso ornamental, con elevados riesgos tóxicos al ser usada con otros fines, por ejemplo en la medicina herbaria como antiparasitaria, reductora de peso, como abortiva, para tratar enfermedades de piel y hemorroides, etc.

Esta planta pertenece a la familia de las *Apocynaceae*, conocida comúnmente como Codo de Fraile, Adelfa Amarilla, Yellow Oleander, entre otros. La podemos encontrar como un arbusto o árbol, sus hojas son alargadas, puntiagudas y brillantes; las flores son amarillas o anaranjadas, están agrupadas y parecen campanas. Los frutos son redondeados y carnosos, en su interior se encuentra

una almendra conocida como “codo de fraile” y que contiene en su interior de 2 a 4 semillas.

La *Thevetia peruviana* se puede comprar en puestos naturistas ya sea como semilla o como producto procesado que se anuncia y se vende en nuestro país libremente sin ninguna restricción, tal es el caso de Capslim®, Redugrass®, entre otros. Aunque se sabe que esta planta fue retirada del mercado y prohibida su venta desde el año 2000, COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección Contra Riesgo Sanitario) en el 2009 registro en Guadalajara 16 casos de intoxicación y dos muertes por el consumo de esta planta.

De acuerdo a lo ya mencionado en cuanto al registro de intoxicaciones y con el objetivo de complementar los estudios ya realizados sobre la *Thevetia peruviana* en cuanto a su toxicidad y las consecuencias que puede ocasionar, así como las observaciones que se han realizado últimamente sobre su posible toxicidad a nivel neuromuscular. Se utilizará un estudio sobre un modelo de ratón CD1 para conocer sus efectos tóxicos principalmente neurotóxicos induciendo en ellos una intoxicación aguda, administrándoles 150 mg/Kg de peso del ratón, de extracto de semilla de *Thevetia peruviana* en dosis de 50 mg/Kg cada hora, hasta completar la dosis deseada.

2. Marco teórico

2.1 Thevetia peruviana

En México la herbolaria ha sido y sigue siendo un recurso para buscar la cura a las enfermedades más comunes, la cual se ha enriquecido por la observación y conocimiento de los pueblos durante siglos. Con ello se encontraron mejores usos para el tratamiento de diversos padecimientos, al igual que los efectos secundarios que muchas de las plantas pueden causar.

Actualmente las estadísticas en México han demostrado un aumento en la obesidad de la población, esto consecuencia del sedentarismo y las hábitos alimentarios; esto ha abierto las puertas al mercado de los productos “milagro”. Los cuales prometen bajar de peso ofreciéndose como opción terapéutica milagrosa e inofensiva, además de ser productos de origen natural a base de plantas y que las personas consumen y usan sin saber las consecuencias que estos pueden causar^{1,2}.

Las plantas que comúnmente son usadas en estos productos “milagro” son la alcachofa (*Cynarascolumus*), papaya (*Carica papaya*), encina de mar (*Fucusvesiculosus*), tamarindo malabar (*Garciniacambogia*), té verde (*Camelliasinesis*), codo de fraile (*Thevetia peruviana*), naranjo amargo (*Citrus aurantium*), piña (*Ananascomosus*), etc.

Thevetia peruviana conocida comúnmente como Codo de fraile, contenida en diversos productos anunciados por televisión, como: Capslim®, Sin hambre®, Redugrass®, Total Slim®, Dietsen® y té rojo Pu-Erh Magistral®.

Esta planta es originaria del centro y sur de América, aunque también se menciona que es originaria del oeste de la India. Actualmente se encuentra distribuida en distintas regiones tropicales y subtropicales del mundo y debe su nombre científico al misionero francés que colectó plantas en Sudamérica, André Thévet, y a su procedencia peruana.

Pertenece a la familia Apocynaceae y también se la conoce como Yellow Oleander, Adelfa amarilla, Azuceno, Laurel Amarillo, Flor del Perú, Codo de fraile; la podemos encontrar como un arbusto o árbol pequeño siempre verde que crece hasta 10 m de altura; sus hojas son de color verde, lineares lanceolada, miden unos 15 cm de largo y a menudo sus bordes son enrollados; sus flores son tubulares con forma de embudo, de color amarillo a naranja, miden 7.5 cm,

ubicadas en el extremo de las ramas. El fruto es globular y carnoso, puede medir hasta 4 cm, en su interior se encuentra una nuez o almendra de forma triangular y que contiene en su interior de 2 a 4 semillas³.



Figura 1: Thevetia peruviana donde se observan: flor, fruto, semilla y hojas⁴.



Figura 2: Semillas secas de Thevetia peruviana⁴.

Investigaciones revelan que toda la planta es tóxica para el hombre, los animales y ciertos insectos; la inhalación, ingestión o contacto con las mucosas de la savia o extractos de la planta puede causar muchas reacciones adversas. En este sentido diversos autores han referido irritación de mucosas, eritema bucal, náuseas,

vómito, salivación profusa, dolor abdominal, diarrea, dolor de cabeza, alteraciones mentales, disturbios visuales, neuritis periférica y síntomas cardiovasculares⁵.

Esto debido a que las semillas de *T. peruviana* contienen ácido cianhídrico, en pequeñas proporciones, que puede provocar intoxicación en personas que la ingieren de manera constante y por periodos prolongados.

También la planta contiene en sus tejidos altas concentraciones de cardenólidos, glucósidos cardiotónicos, en cuanto a la cantidad en orden decreciente la planta contiene: Peruvosido, Rubosido, Thevetina A, Nerifolina, Cerebrina y Thevetina B. Se encuentran distribuidos en toda la planta pero no de manera homogénea: en semillas se encuentra un 4,8%, en hojas hay 0,070%, en frutos solo 0,045% y en la savia 0,036%^{4,5}.

Estos cardenólidos provocan como mecanismo de acción la inhibición en la bomba de Na/K ATPasa, produciendo efectos secundarios los más frecuentes son los vómitos, cambios electrocardiográficos, bradicardia, mareos, vértigo y diarrea.

La *Thevetia peruviana* es utilizada ampliamente con fines ornamentales debido al elegante follaje que ofrecen. Sus semillas son usadas por artesanos en la producción de collares e indumentarias de adorno y danza. No tiene ninguna indicación terapéutica aceptada en el tratamiento de enfermedades, ni margen de seguridad que justifique su uso. En medicina tradicional y herbaria se la suele usar como antiparasitaria, reductora de peso, como abortiva, para tratar enfermedades de piel y hemorroides, etc⁴.

Con la finalidad de comprender mejor el tipo de intoxicación que se inducirá usando esta planta en el modelo de ratón CD1, mencionaremos conceptos importantes sobre toxicología.

Mucha sintomatología que se llega a presentar en personas también se presenta en ratones CD1 intoxicados con extracto acuoso de semilla de *Thevetia peruviana*, de acuerdo al tipo de intoxicación que se induzca con esta planta se han llegado a observar una serie de efectos muscarínicos, nicotínicos y síntomas nerviosos centrales muy similares a los presentados en intoxicaciones con pesticidas organofosforados que inhiben a la enzima acetilcolinesterasa. Para encontrar una explicación a ello es importante conocer las relaciones dosis-efecto y dosis-respuesta que se dan cuando se administra una sustancia toxica al organismo, esto por medio de la toxicología.

2.2 Toxicología.

La palabra toxicología proviene del término griego “toxion” que significa arco de flecha, término dado por la utilización de las flechas envenenadas como una de las primeras aplicaciones intencionadas de una sustancia tóxica. Los efectos de ciertos venenos eran conocidos por los griegos y los romanos desde la antigüedad y su empleo con fines criminales fue usado durante la Edad Media y el Renacimiento. En el siglo XVIII y especialmente en el XIX, la toxicología logró el rango de disciplina científica⁶.

Para llegar a una definición de lo que es la toxicología es necesario saber primero que es un tóxico. Una toxina se refiere generalmente a las sustancias tóxicas que son producidas por los sistemas biológicos, tales como plantas, animales, hongos o bacterias. Se utiliza el término tóxico para hablar de sustancias tóxicas que son producidas, o es un subproducto de actividades antropogénicas (hecho por el hombre)⁷.

La toxicología, es el conocimiento de las relaciones cuantitativas entre la intensidad de la exposición a las sustancias químicas y el riesgo de alteración de la salud, además examina la bioquímica celular, y los mecanismos moleculares de acción, así como los efectos funcionales, tales como comportamiento neurológico e inmunológico, y evalúa la probabilidad de su ocurrencia. Caracteriza la relación de la exposición a la respuesta, es decir caracteriza la relación dosis-efecto y dosis-respuesta permitiendo definir los niveles tolerables de exposición^{6,7}.

Características de la exposición a tóxicos

Cuando se produce una reacción tóxica esta depende de las propiedades químicas y físicas del agente, la situación de exposición, la forma en que el agente es metabolizado por el sistema y en general la susceptibilidad del sistema biológico.

Las características de la exposición y el espectro de efectos tóxicos coinciden en una relación conocida como relación dosis-respuesta. Existen dos tipos de relación dosis-respuesta: 1) La relación individual de dosis-respuesta, describe la respuesta de un organismo individual en mayor o menor dosis de una sustancia química, se refiere como la respuesta gradual por el efecto continuo medido en un rango de dosis. 2) La relación dosis-respuesta cuantitativa, y se caracteriza por la distribución de las respuestas individuales a diferentes dosis en una población de organismos individuales.

Para caracterizar completamente el peligro potencial de un agente químico

específico, tenemos que saber qué tipo de efecto produce y la dosis requerida para producir ese efecto, y tener información sobre el agente, así como la exposición y su disposición por el sujeto. Dos factores principales que influyen en la toxicidad son la vía de exposición, y la duración y frecuencia de exposición.

- Vías y sitios de exposición.

Las principales vías de acceso de agentes tóxicos en el cuerpo son el tracto gastrointestinal (ingestión), pulmones (inhalación), la piel (tópico, percutánea, o dérmica), y otras vías parenterales (que no sea el canal intestinal). Los agentes tóxicos generalmente producen mayor efecto y respuesta más rápida cuando se administra directamente en el torrente sanguíneo (vía intravenosa). Además, la vía de administración puede influir en la toxicidad de los agentes.

Los efectos tóxicos por cualquier vía de exposición pueden estar influenciados por la concentración del agente en su vehículo, el volumen total del vehículo y las propiedades del vehículo al que el sistema biológico se expone, y la velocidad a la que ocurre la exposición.

- Tipos de acción.

Puede ser local cuando la sustancia ejerce una acción tóxica en el lugar de contacto, como piel, tubo digestivo, vías respiratorias, etc.

O bien puede ser general o sistémica, cuando la acción del tóxico se manifiesta en sitios alejados del lugar del contacto inicial. Existen factores que favorecen la acción sobre un órgano determinado: 1) El grado de perfusión, lo que conlleva a una concentración aumentada de la sustancia en ciertos órganos. 2) La composición química del órgano. 3) La situación en la vía de transporte del tóxico, el hígado sustituirá a menudo el órgano diana de los tóxicos ingeridos⁷.

- Duración y frecuencia de la exposición.

Dependerán de la rapidez de aparición, la gravedad y duración de los síntomas y la rapidez de absorción de la sustancia tóxica, se divide en cuatro categorías.

- **Intoxicación aguda:** Exposición de corta duración y absorción rápida del tóxico, dosis única o múltiple en un período no superior a 24hs. En general los síntomas de intoxicación aparecen rápidamente y la muerte o la curación se producen con rapidez. Las vías principales de exposición son intraperitoneal, intravenosa y subcutánea; la intubación oral y la aplicación dérmica.

Pruebas de toxicidad aguda.

Los objetivos de los ensayos de toxicidad aguda son: 1) estimar la toxicidad intrínseca de la sustancia, a menudo expresada como una dosis letal media (DL₅₀), 2) proporcionar información sobre los órganos diana y otras manifestaciones clínicas de toxicidad, 3) identificar las diferencias de susceptibilidad entre cada especie y las especies susceptibles y 4) establecer la reversibilidad de la reacción tóxica. Las especies más utilizadas son el ratón y la rata, los estudios se realizan tanto en machos adultos y hembras.

- **Intoxicación subaguda:** Exposición repetida a una sustancia química durante 1 mes o menos y se realiza para obtener información sobre la toxicidad de un producto químico después de la administración repetida y como una ayuda para establecer las dosis para los estudios de toxicidad subcrónica.
- **Intoxicación subcrónica:** Exposición de 1 a 3 meses, puede realizarse en períodos diferentes de tiempo, pero 90 días es la duración de la prueba más común. Los objetivos principales son establecer un "nivel de efecto adverso no observable" e identificar y caracterizar el órgano u órganos específicos afectados tras la administración repetida.
- **Intoxicación crónica:** Exposición de al menos 1 año de dosis repetidas (en general durante toda la vida del animal de laboratorio). En este estudio la selección de la dosis es fundamental para garantizar que la mortalidad no limite el número de animales que sobrevivan teniendo una esperanza de vida normal. Los signos de intoxicación se manifiestan porque el veneno se acumula en el organismo, ya que la cantidad eliminada es inferior a la absorbida y la concentración del tóxico en el organismo aumenta progresivamente hasta generar manifestaciones tóxicas (la tasa de absorción es superior a la tasa de biotransformación y/o excreción).

Estas últimas tres categorías pueden ser por cualquier vía, pero a menudo se producen por vía oral, con el producto químico añadido directamente a la dieta.

Los efectos tóxicos que se presentan con una sola exposición son muy diferentes de los producidos por las exposiciones repetidas. La exposición aguda a sustancias químicas que se absorben rápidamente, normalmente producen efectos tóxicos inmediatos, pero también puede producir toxicidad tardía que pueden o no ser similar a los efectos tóxicos de la exposición crónica. Por el contrario, la exposición crónica a una sustancia tóxica puede producir algunos efectos inmediatos después de cada administración, además de los efectos de largo plazo, o los efectos crónicos de la sustancia^{6, 7}.

Disposición de las sustancias tóxicas.

El efecto de un tóxico sobre el organismo depende primordialmente de la cantidad de tóxico o de sustancias reactivas que elabora (metabolitos activos y radicales libres) fijados en el lugar de acción (enzima, membrana, placa matriz, etc.). Este efecto está en función no sólo de la cantidad de tóxico activo que alcanza el lugar de acción, si no también de su afinidad por el lugar. Así como de su disposición de dicho tóxico, que se define como la combinación de su absorción, distribución, biotransformación y eliminación.

Los diversos factores y procesos que afectan a los órganos involucrados en la disposición de una sustancia tóxica, normalmente ocurren simultáneamente. En conjunto, todos los procesos que comprende la disposición están interrelacionados y se influyen mutuamente⁷.

- Absorción

Es el proceso por el cual las sustancias tóxicas atraviesan las membranas del cuerpo y entran al torrente sanguíneo, como la piel, los pulmones y el tubo digestivo que son las principales barreras que separan a los órganos superiores del entorno. La absorción del tóxico dependerá del tipo de administración, ya sea enteral que incluye todas las rutas relativas al tubo digestivo (sublingual, oral y rectal), o parenteral que implica todas las demás vías (intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, etc.). Finalmente estas sustancias tóxicas entran al torrente sanguíneo para distribuirse a través del cuerpo y se puede llevar a cabo por diferentes mecanismos:

- **Filtración:** Este mecanismo implica el flujo global de agua, causado por la fuerza osmótica. En contraste, no existen poros acuosos en las estrechas uniones celulares, y los canales en la mayoría de las células son muy pequeños, con lo que sólo permite el paso de moléculas con pesos moleculares de unos pocos cientos de Daltons. Esto en función del gradiente de concentración.
- **Difusión simple:** La mayoría de las sustancias tóxicas atraviesan las membranas por este mecanismo, donde los productos químicos atraviesan las regiones de mayor concentración a regiones de menor concentración sin gasto de energía y la velocidad de transporte es directamente proporcional al gradiente de concentración. Moléculas hidrofílicas atraviesan las membranas a través de poros, por difusión para-celular, mientras que las moléculas hidrofóbicas se difunden a través de los lípidos en membranas (difusión transcelular). En consecuencia, un compuesto pequeño, soluble en agua se absorbe rápidamente en la sangre desde el tracto gastrointestinal y se

distribuye con la misma rapidez por todo el cuerpo por difusión simple de la sangre a todos los tejidos.

- **Difusión facilitada:** Transporte mediado que puede realizarse gracias al gradiente de concentración, pero también intervienen sustancias portadoras. Y el proceso es específico de las sustancias que pueden fijarse a las proteínas portadoras. Este mecanismo puede saturarse a concentraciones elevadas del cuerpo químico.
- **Transporte activo:** Intervienen sustancias portadora y se necesita una fuente de energía. Se caracteriza por el movimiento de las sustancias químicas contra gradientes electroquímicos o de concentración, la saturabilidad a altas concentraciones de sustrato, la selectividad de características estructurales de los productos químicos, la inhibición competitiva por compuestos químicos que son llevado por el mismo transportador y por requerir gasto de energía.
- **Procesos de transporte adicional** (fagocitosis y pinocitosis): mecanismos propuestos para las membranas celulares donde fluyen partículas alrededor y las envuelven, es el resultado de la formación de invaginaciones de la membrana plasmática que engloba gotitas de líquido extracelular o moléculas que se han fijado a los receptores membranosos (pinocitosis absorbente) y concierne principalmente a los macrófagos^{6,7}.

- Absorción vía oral.

A través de la boca las sustancias no están sometidas a la influencia de los jugos digestivos y no deben pasar por el hígado (biotransformación) antes de alcanzar la circulación general. En el estómago, muchos cuerpos químicos derivados de ácidos débiles son absorbidos rápidamente porque con el pH gástrico se encuentran preferentemente en forma no ionizada. Los ácidos fuertes y las bases ionizadas no son absorbidas. En el intestino delgado la velocidad de absorción de las sustancias que difunden a través de la pared intestinal está determinada por su constante de disociación y su liposolubilidad.

- **Factores que influyen en la absorción gastrointestinal:** además de la liposolubilidad, tenemos la solubilidad al pH estomacal y del intestino, la naturaleza del disolvente, la motilidad del tubo gastrointestinal, la acción de las enzimas del tubo gastrointestinal sobre las sustancias químicas, la formación de compuestos insolubles y el ayuno. Las sustancias muy solubles en los lípidos no se absorben de manera importante por vía linfática. Por esta razón cuando se absorben por vía digestiva (excluyendo la mucosa bucal y rectal), el tóxico llega primordialmente al hígado⁶.

- Distribución:

Después de entrar en la sangre por absorción, una sustancia tóxica se distribuye a los tejidos de todo el cuerpo y por lo general la distribución se produce rápidamente. La tasa de distribución a los órganos o tejidos está determinada por el flujo sanguíneo y la velocidad de difusión por capilaridad en las células de un órgano o tejido en particular, siendo esta la distribución inicial. Mientras que la distribución final es determinada en gran medida por la afinidad de la sustancia.

La penetración de sustancias tóxicas en las células se produce por difusión pasiva o procesos especiales de transporte. También las sustancias tóxicas se acumulan selectivamente en determinadas partes del cuerpo como resultado de la unión a proteínas, o por el transporte activo, o la elevada solubilidad en grasas. Por tanto el órgano diana puede ser el sitio de acumulación, aunque no siempre es así.

- **Redistribución:** Como ya se mencionó la fase inicial de la distribución está determinada principalmente por el flujo de sangre a las diversas partes del cuerpo. Por lo tanto, un órgano bien irrigado, como el hígado puede alcanzar elevadas concentraciones iniciales de sustancia tóxica, sin embargo, los productos químicos pueden tener elevada afinidad por un sitio de unión o un componente celular (por ejemplo, la grasa), y con el tiempo, se va a redistribuir a estos sitios de gran afinidad⁷.

- Excreción:

Las sustancias tóxicas se eliminan del cuerpo por varias rutas, el riñón es quizá el órgano más importante para la excreción. La biotransformación a productos más solubles en agua suele ser un requisito previo a la excreción a través de la orina, la segunda vía importante de eliminación es a través de las heces, y el tercero, sobre todo para los gases, es a través de los pulmones. La excreción biliar de sustancias tóxicas o sus metabolitos es más a menudo la fuente principal de la excreción fecal. Por lo tanto las sustancias extrañas o sus productos de transformación son eliminados por la orina, la bilis, el aire espirado, el sudor, las faneras, la saliva, la leche y diversas secreciones más.

Excreción urinaria.

Los compuestos tóxicos se excretan en la orina por los mecanismos que utiliza el riñón para eliminar los productos finales del metabolismo usualmente, incluyendo la filtración glomerular, la excreción tubular por difusión pasiva, y la secreción tubular activa.

Una sustancia tóxica filtrada en el glomérulo puede permanecer en la luz tubular y ser excretada con la orina. Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de un compuesto, puede ser reabsorbido a través de las células tubulares de la nefrona al torrente sanguíneo. Las sustancias tóxicas con un elevado coeficiente de partición en lípido/agua se reabsorben de manera eficiente, mientras que los compuestos polares e iónicos se excretan con la orina.

Excreción biliar.

La excreción fecal es la vía más importante para la eliminación de sustancias tóxicas en el cuerpo y la excreción biliar es quizá la más importante que contribuye a la excreción fecal de sustancias tóxicas y es aún más importante para la excreción de metabolitos.

El hígado es el órgano principal de transformación de las sustancias químicas extrañas. Los productos de transformación (metabolitos y conjugados) son transportados a la circulación sanguínea (a través de los sinusoides hepáticos, la vena hepática y la vena cava superior) o a la bilis.

Un compuesto puede ser extraída por el hígado, lo que impide su distribución a otras partes del cuerpo. El hígado; principal sitio de biotransformación de sustancias tóxicas, y sus metabolitos puede excretarlos directamente en la bilis. De esta manera, el hígado puede eliminarlos antes de entrar en la circulación general. Por otra parte, las sustancias tóxicas y/o sus metabolitos en la bilis, entran en el intestino y pueden ser excretadas con las heces. Sin embargo, si las propiedades fisicoquímicas favorecen la reabsorción habrá una circulación enterohepática.

Una disminución de la excreción biliar puede aumentar la toxicidad de las sustancias normalmente excretadas por esta vía, contrario al bloqueo del ciclo enterohepático puede producir la toxicidad de un cuerpo químico aumentando su excreción fecal^{6,7}.

Resumiendo, una sustancia química provoca toxicidad no sólo por su potencia y especificidad por el sitio, sino también por cómo se absorbe, distribuye, y se elimina en el cuerpo. Tal es el caso de la *Thevetia peruviana* que como ya se mencionó anteriormente contiene altas concentraciones de cardenólidos y glucósidos cardiotónicos, los cuales inician una respuesta inflamatoria en el organismo, comenzando con un proceso inflamatorio agudo³.

2.3 Proceso inflamatorio agudo.

La inflamación, puede considerarse como la serie compleja de acontecimientos que se desarrollan cuando el cuerpo es lesionado por agentes mecánicos o químicos, o por procesos autoinmunitarios. La inflamación es, en esencia, una respuesta protectora, con la cual el cuerpo intenta regresar al estado previo de lesión después de que ha sido producida y se caracteriza por una serie de eventos que incluye la reacción inflamatoria.

Sus signos clásicos incluyen calor, rubor, edema, dolor, función alterada y pérdida de la función celular. En la inflamación aguda los vasos sanguíneos se dilatan razón por la cual se presenta el calor y el rubor; el edema es ocasionado por el escape de fluidos y células al tejido extravascular. El dolor y la pérdida de función se deben a la presión ejercida en las terminaciones nerviosas por la acumulación de líquido extravascular y a la liberación de mediadores químicos⁸.

La reacción inflamatoria se caracteriza por fases sucesivas:

- **Fase silenciosa:** Donde las células que residen en el tejido dañado liberan los primeros mediadores inflamatorios.
- **Fase vascular:** Se produce vasodilatación, por contracción del músculo liso vascular, provocando aumento del flujo sanguíneo, calor y rubor. También se produce un aumento en la permeabilidad vascular por relajación de los endotelios, originando acumulación local de fluido y por tanto edema y dolor, y también un incremento de la concentración de proteínas sanguíneas como inmunoglobulinas.
- **Fase celular:** Caracterizada por infiltración de leucocitos en el sitio de la lesión. E inducción de la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, lo que facilita la unión de los fagocitos y linfocitos y su posterior extravasación desde la sangre hasta los tejidos a través de las paredes de los capilares sanguíneos.
- **Respuesta sensorial:** Incluye el dolor, la hiperalgesia, que se define como una respuesta exagerada a un estímulo nocivo. Y la alodinia, dolor provocado por un estímulo que, en condiciones normales, no lo provoca.
- **Proceso de resolución y restauración:** Consiste en la restauración de la normalidad tisular a través del drenaje linfático, la fagocitosis del tejido dañado y la migración de macrófagos inflamatorios. Y la restauración del área

afectada a través de la cicatrización o regeneración dependiendo del tipo de tejido afectado^{9, 10, 11}.

Las células que residen en el tejido dañado, como los mastocitos y los macrófagos juegan un papel determinante en alertar al cuerpo de una lesión tisular, esto por la liberación de mediadores químicos de la inflamación.

Los principales efectos que ejercen estos mediadores químicos son vasodilatación arteriolar, aumento de la permeabilidad vascular y quimiotaxis. Otros efectos incluyen contracción del músculo liso, opsonización, dolor y citotoxicidad.

Son de origen plasmático o bien de origen tisular. Aquellos de origen plasmático surgen a raíz de la activación en cascada de diversas proteínas plasmáticas. Los de origen tisular están almacenados en células o bien su síntesis se inicia durante el proceso inflamatorio.

Mediadores de origen plasmático:

En primer término iniciado y propagado por componentes del sistema de la coagulación (factores de contacto), el sistema fibrinolítico, el sistema de complemento y sistema de las quininas. Formados por una serie de proteínas que en condiciones normales circulan en forma inactiva, pero en la inflamación, estas moléculas se activan exponiendo sitios enzimáticos que actúan sobre el siguiente componente de la cascada activándolo.

Los sistemas de mediadores están interrelacionados y cuentan con mecanismos de retroalimentación de manera de obtener una respuesta eficiente y rápida. Estos sistemas tienen otra particularidad: pueden ser activados a raíz de la activación de un sólo componente, el factor XII de la coagulación o factor de Hagemann⁹.

- Sistema del complemento:

Este sistema esta formado por proteínas presentes en el suero que se activan en cascada, la acción del complemento incluye destrucción celular, inflamación y efectos inmunológicos. La activación del complemento produce péptidos que median la quimiotaxia, la anafilaxia, la vasodilatación y la secreción celular de citoquinas.

Los componentes C3a y C5a actúan como anafilotóxicas, causando desgranulación de basófilos, liberando histamina y otros mediadores, produciendo la vasodilatación, enrojecimiento, hinchazón y la contracción de musculo liso.

La activación del complemento puede iniciarse por dos vías: la vía clásica y la vía alternativa; la vía clásica se activa por la unión antígeno-anticuerpo, mientras que la vía alternativa se activa por productos bacterianos, ya sea por acción de endotoxinas bacterianas, polisacáridos complejos y plasmina entre otros.

En ambas vías el factor C5, que induce la liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 1 (IL-1) incrementando la respuesta inflamatoria, se transforma en C5b lo que permite, en uno y otro caso, poder entrar en la vía terminal o lítica que conduce a la lisis celular o bacteriana^{8, 12}.

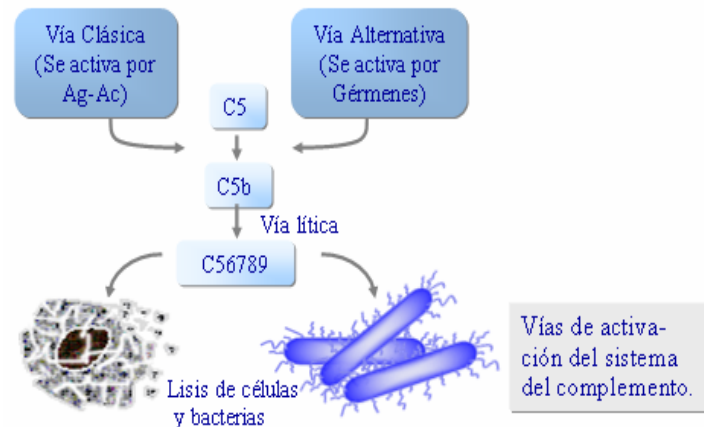


Figura 3: Esquema de la vía clásica y alternativa del complemento¹².

- Sistema fibrinolítico:

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

- Sistema de activación por contacto:

Formado por una serie de proteínas que se activan por contacto con sustancias naturales, tales como cristales de urato de sodio, cristales de pirofosfato de calcio, sulfato de colesterol y homocisteína. También conformado por la pre-caliceína, el factor XI (antecedente plasmático de tromboplastina), el factor XII (factor Hagemen) responsable de la activación no inmunológica de la vía clásica del complemento y estimula la agregación y desgranulación de los neutrófilos, y un cininógeno de alto peso molecular que se une a los neutrófilos específicamente, lo que contribuye a la estimulación óptima de los neutrófilos por la caliceína.

- Sistema de las quininas:

La bradiquinina juega un papel muy importante como mediador de la inflamación, se genera por el clivaje del quininógeno de alto peso molecular por acción de la calicreína. Tiene la capacidad de liberar citoquinas tales como IL-1 y TNF y otros mediadores.

Promueve todas las señales de transducción a nivel celular: movilización de calcio, transporte de cloruro, síntesis de óxido nítrico para la formación de GMPc, estimulación de fosfolipasa para formar prostaglandinas y leucotrienos y la estimulación de la adenil-ciclasa que produce aumento de AMPc^{8, 11}.

Mediadores de origen tisular:

Los podemos dividir en dos grupos, los mediadores preformados que se encuentran almacenados en gránulos de diversas células y que son liberados al medio desde el inicio de la respuesta inflamatoria y los mediadores sintetizados y liberados durante la inflamación.

- Mediadores preformados:

Se encuentran principalmente en células cebadas, PMN: basófilos y neutrófilos, las primeras, al recibir estímulos químicos o físicos en su membrana provenientes del tejido dañado, liberan al medio el contenido de sus gránulos e inician la síntesis de otros mediadores pertenecientes a la segunda categoría, el mas importante es:

- **Histamina:** es una amina natural producida por descarboxilación de la histidina. Induce la clásica respuesta vascular de la respuesta aguda, incrementando el flujo sanguíneo, la permeabilidad vascular y produciendo edema. También produce ardor y picazón.

- Mediadores sintetizados durante el proceso inflamatorio:

Diversos mediadores actúan sobre algunas células, principalmente macrófagos, células endoteliales y células cebadas induciéndolas a sintetizar prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) y citoquinas.

- **Prostaglandinas y tromboxanos:** La vía para la producción de estos se inicia cuando la enzima ciclo-oxigenasa convierte el ácido araquidónico en endoperóxido cíclico (PGG₂) por introducción de oxígeno molecular. Las prostaglandinas actúan como receptores de superficie en los linfocitos, las PGE₂, PGA₂, PGD₂ y PGI₂, incrementan los niveles intracelulares de AMPc (este incremento en linfocitos esta asociado a inhibición de mitogénesis, reducción de formación de linfocinas); a causa de alteraciones en lípidos, proteínas, composición de glicoproteínas y por la alteración de captación de

nutrientes esenciales y calcio provocan la vasodilatación, la permeabilidad vascular y son quimioatrayentes de neutrófilos.

- **Leucotrienos:** a partir del ácido araquidónico por acción de una enzima llamada lipoxigenasas, se forman ácidos hidroperoxitetraoicos (HPETE). Los leucocitos a partir de 5-HPETE forman exclusivamente una familia de ácidos llamados leucotrienos. Existen diferentes tipos, los leucotrienos C₄, D₄ y E₄ son potentes agentes estimulantes de la contracción de la musculatura lisa y de los vasos sanguíneos, también constituye la sustancia de liberación lenta de anafilaxis. El leucotrieno B₄ es un activador del funcionamiento y comportamiento del leucocito, además de ser el factor quimiotáctico conocido más potente. También es un mediador natural de la inflamación y es sintetizado por los leucocitos presentes en el exudado que se produce en el proceso inflamatorio.

- **Citoquinas:** son señales intercelulares no específicas, por las cuales, las células activadas pueden atraer otras células y controlar algunos procesos fisiológicos, no presentan especificidad por los antígenos y operan en muy bajas concentraciones:

- * *IL-1:* es producida por monocitos, neutrófilos, células epiteliales y queratocitos. Promueve la unión de los neutrófilos sanguíneos a las células endoteliales de la pared de los vasos sanguíneos, seguida de infiltración y edema. En médula promueve factores estimulantes del crecimiento de colonias (CSF) y diferenciación.

- * *TNF:* Producido por macrófagos activados. Tiene efecto citotóxico sobre ciertas células tumorales y es uno de los más importantes mediadores de la inflamación, induce fiebre, promueve la respuesta de los hepatocitos produciendo proteínas de fase aguda. En los neutrófilos produce el estallido respiratorio y desgranulación. El TNF en células endoteliales vascular produce procoagulantes, supresión de la actividad anticoagulante y bloquea el aporte de sangre.

- * *IL-6:* Produce e induce características parecidas a las del TNF e IL-1.

Estos mediadores son de gran importancia en la inflamación, resumiendo que producen efectos tales como vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y contracción del músculo liso, quimiotaxis y dolor. Además de liberar el Factor Activador de Plaquetas (PAF)^{8,9}.

- **PAF:** compuesto de naturaleza lipídica es un potente activador de los neutrófilos, debido a que estimula la adhesión, la liberación de enzimas lisosomales, la generación de especies reactivas de oxígeno, además produce

marginación de los neutrófilos en la pared del endotelio vascular y promueve la migración al espacio extravascular e incita la activación y agregación plaquetaria; también actúa como regulador del funcionamiento de los linfocitos, es el quimioatrayente más potente de eosinófilos¹³.

2.3.1 Respuesta de fase aguda.

La respuesta inflamatoria se acompaña de una respuesta sistémica o general llamada respuesta de fase aguda. Es una respuesta rápida, compleja, no específica a diversos tipos de daño tisular y se caracteriza por presentar modificaciones locales y sistémicas con la finalidad de controlar el daño, producir la limpieza de los desechos y comenzar la reparación tisular.

Se caracteriza por inducción de fiebre (inhibe el crecimiento de diversos agentes patógenos y al parecer fomenta la reacción inmunitaria a estos agentes), aumento de la síntesis de hormonas como ACTH e hidrocortisona, elevación de la producción de leucocitos y elaboración de gran cantidad de proteínas de fase aguda en el hígado.

Muchos efectos generales de la fase aguda se deben a la acción combinada de IL-1, TNF, IL-6, estas citosinas actúan sobre el hipotálamo para inducir una reacción febril. Después de las primeras 12hs de la reacción inflamatoria de fase aguda, las concentraciones incrementadas de IL-1, TNF e IL-6 inducen la producción de proteínas de fase aguda por los hepatocitos. También el TNF actúa sobre las células endoteliales vasculares y los macrófagos para promover la secreción de factores estimulantes de colonias, lo que favorece la hematopoyesis aumentando la producción de leucocitos necesarios para combatir la infección.

La función que cumple la respuesta de fase aguda, depende de la función que cumple cada proteína de fase aguda. Conociendo la función que cumple la proteína se evalúa el propósito de su cambio durante la inflamación.

Podemos dividir estas proteínas de fase aguda dependiendo de su síntesis, por tanto si su síntesis es disminuida se denominan reactantes negativos de la fase aguda, si por el contrario están reguladas y aumentan se denominan reactantes positivos de la fase aguda, a continuación hablaremos de las más importantes^{8, 14}:

Proteínas de fase aguda negativas:

- **Albúmina:** Es el 50-60% del total de la proteína plasmática se sintetiza en hígado y permanece en circulación unos diecinueve días, hasta que se metaboliza en los tejidos para los que es fuente de aminoácidos. Dentro de sus funciones más importantes tenemos que, contribuye a retener líquido en el torrente circulatorio, y gracias a su carga eléctrica negativa, la capacita como un gran transportador inespecífico de hormonas, iones, fármacos, etc. También conserva un proceso de síntesis activo, esto es que en caso de que se necesite el aumento de otras proteínas, la albúmina disminuye su propia síntesis, preservando así la presión oncótica.

- **Pre-albúmina:** También llamada transtiretina, es una glicoproteína sintetizada en el hígado, de baja concentración en el suero, mas de 100 veces menor que la albúmina, tiene una vida media corta de aproximadamente de 2 días lo que la hace un indicador sensible de algunos cambios que afectan sus síntesis y catabolismo. Se le atribuye una función transportadora, en especial de un tercio de la hormona tiroidea activa, por tal razón la disminución de pre-albúmina disminuye los niveles de hormona tiroidea en la periferia, modificando el metabolismo en el sitio de la inflamación¹⁵.
- **Transferrina:** Pertenece al grupo de las β -globulinas, se sintetiza en el hígado y juega un papel importante en el metabolismo del hierro en cuanto capta el hierro en células de la mucosa intestinal (intestino delgado) o procedente de la proteína de depósito (ferritina) lo transporta hacia todos los tejidos. Por tanto, como el hierro es necesario para el crecimiento de las células y de las bacterias, la disminución de la transferrina circulante disminuye la disponibilidad del hierro en el sitio de la infección.

Proteínas de fase aguda positivas:

- **Ceruloplasmina:** Es una α -globulina, la más importante en el transporte de cobre tiene la capacidad de actuar en la eliminación de radicales libres del oxígeno de forma no catalítica y estequiométrica y tiene actividad de superóxido dismutasa, protegiendo del daño tisular.
- **Haptoglobina:** Es una proteína que se liga a la hemoglobina liberada por la lisis de los eritrocitos, cumple la función en el aporte de hemoglobina al sitio de inflamación, además posee actividad de antiproteasa y poder bacteriostático natural. También puede ser inmunoreguladora.
- **Fibrinógeno:** Una β -globulina producida por el hígado, es una proteína clave de la coagulación. Actúa como opsonina aumentando el agrupamiento de ciertos microorganismos y bloquea la actividad mitogénica de las células T y la quimiotaxis de los macrófagos.
- **Componente amiloideo A:** Su nivel aumenta de 100 a 1000 veces durante la inflamación, se encuentra asociada a las lipoproteínas de alta densidad (HDL), por lo que le atribuye propiedades para eliminar los componentes lipídicos de los microorganismos y toxinas que forman complejos con las lipoproteínas.
- **Proteína C reactiva (CRP):** Debe su nombre a su capacidad de precipitar al polisacárido de microorganismos, también se puede unir a fosfolípidos

y plicaciones. La CPR unida aumenta la opsonización y causa la generación de factores quimiotácticos, se une a tejido necrótico y de ese modo puede aumentar la velocidad de su remoción por fagocitosis^{13, 14}.

Cuadro 1: Cambios de la concentración de diferentes proteínas plasmáticas durante la respuesta de la fase aguda¹⁴.

	Incrementada	Disminuida
Inhibidores de proteasas	α_1 -antitripsina	Inter α_1 -antitripsina
Proteínas de la coagulación	α_1 -antiquimotripsina Fibrinógeno Protrombina Factor VIII Plasminógeno	
Proteínas del complemento	C1s C2 C3 C4 C5 Factor B Inhibidor de C1	Properdina
Proteínas transportadoras	Haptoglobina Hemopexina Ceruloplasmina	
Misceláneos	Proteína C reactiva Amiloide sérico A Fibronectina α_1 -glucoproteína ácida	Albúmina Transtirretina HDL LDL

Además de presentarse un proceso inflamatorio por la administración de *Thevetia peruviana*, dentro de los diferentes estudios que se han realizado en cuanto a la toxicidad se han observado en ratones CD1 intoxicados con un extracto acuoso de semilla, una sintomatología muy parecida a la descrita por intoxicación con pesticidas organofosforados: debilidad, taquicardia, dificultad para respirar, parálisis del tren trasero, salivación abundante y poco control de esfínteres, entre otros.

Por esta razón se tiene como hipótesis que la *Thevetia peruviana* produzca una inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, en consecuencia se presentan los efectos muscarínicos, nicotínicos y síntomas nerviosos centrales, descritos anteriormente.

2.4 Mecanismo de acción de los tóxicos.

Acción primaria de un tóxico. Acción sobre las enzimas.

- Inhibición:

Puede ser competitiva o no competitiva, reversible o irreversible. Se llama inhibición competitiva cuando *in vitro* puede ser eliminada por un exceso de sustrato. La inhibición se describe como no competitiva cuando se elimina por un exceso de sustrato.

Puede ser reversible; en este caso la enzima activa puede ser regenerada *in vitro* por simple diálisis, puede ser irreversible; la inhibición es consecuencia generalmente de una unión covalente del tóxico con la enzima. A veces la inhibición enzimática es mixta (competitiva y no competitiva).

La inhibición de la acetilcolinesterasa por ciertos pesticidas organofosforados es un ejemplo de inhibición irreversible esta enzima actúa en la hidrólisis de la acetilcolina, el mediador de los influxos nerviosos. La inhibición de la enzima causa la acumulación de la acetilcolina responsable de las manifestaciones clínicas de la intoxicación⁷.

Agentes tóxicos. Pesticidas.

Los pesticidas pueden definirse como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir, repeler o mitigar plagas. Idealmente su acción perjudicial debería ser altamente específico para los objetivos deseados, sin embargo, la mayoría de los pesticidas no son muy selectivos, en general también son tóxicos para los seres humanos.

Se refiere a los plaguicidas como una clase unitaria de productos químicos, mientras que en realidad el término pesticida debe equipararse a la de las drogas farmacéuticas. Ya que existen diferentes clases de plaguicidas, con diferentes usos y mecanismos, por tanto, diferentes efectos tóxicos en los organismos que no son objetivo⁶.

- Pesticidas. Compuestos Organofosforados (OP).

Estos compuestos fueron sintetizados en 1800, su desarrollo como insecticidas se produjo hasta finales de 1930 y principios de 1940. El químico alemán Gerhard

Schrader se le atribuye el descubrimiento de la estructura química general de compuestos anticolinesterásicos OP, y la síntesis de la primera comercialización de insecticidas OP, uno de los más conocidos el Paratión, en 1944. Desde entonces, cientos de compuestos OP han sido fabricados y comercializados en todo el mundo en una variedad de formulaciones.

Toxicocinética y toxicodinámica de los compuestos OP.

Los compuestos organofosforados ingresan al organismo por las vías cutánea, respiratoria y digestiva. Las dos primeras constituyen las rutas más comunes de penetración en intoxicaciones laborales.

La vida media de los compuestos OP y de sus productos de biotransformación es relativamente corta. Dicho proceso de transformación se lleva a cabo mediante la presencia de enzimas oxidasas, hidrolasas y glutatión-S-transferasas, principalmente hepáticas y puede dar como resultado metabolitos más tóxicos.

La eliminación de los OP es rápida y tiene lugar por la orina y, en menor cantidad, por heces y aire expirado. Su máxima excreción se alcanza a los dos días; luego disminuye rápidamente¹⁷.

La inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE) por un compuesto OP provoca la acumulación de acetilcolina en las sinapsis colinérgicas, con la sobreestimulación de los receptores colinérgicos de tipo muscarínicos y nicotínico. Dado que estos receptores se localizan en la mayoría de los órganos del cuerpo, un "síndrome colinérgico" sobreviene, que incluye aumento de la sudoración y salivación, secreción bronquial profunda, bronco-constricción, miosis, aumento de la motilidad gastrointestinal, diarrea, temblores, espasmos musculares, y diversos efectos en el sistema nervioso central⁶.

Para comprender mejor como es que se llega a esta sintomatología es necesario comprender el mecanismo de acción de los compuestos OP en el organismo.

- Mecanismo de acción de los compuestos OP.

Como ya se mencionó la principal acción tóxica es la inhibición de la enzima AChE. Hay dos tipos de acetilcolinesterasa:

- **Acetilcolinesterasa:** También llamada colinesterasa verdadera, colinesterasa eritrocitaria o de tipo e. Tiene una afinidad casi exclusiva para el sustrato natural, la acetilcolina. Se halla en la sinapsis en el tejido nervioso, en la unión neuromuscular y en los eritrocitos. Esta se inhibe cuando existe un exceso de sustrato.

- **Seudocolinesterasa:** O enzima no específica, también denominada butirilcolinesterasa, colinesterasa plasmática o de tipo s. Se localiza en el plasma, el intestino, el hígado y otros tejidos, en poca concentración en el sistema nervioso central y periférico. Se activa en presencia de un exceso de sustrato^{7, 19}.

Para entender el mecanismo de este pesticida se debe comenzar con saber de que manera la enzima AChE actúa sobre la acetilcolina.

En el citoplasma de la terminal axónica de las neuronas presinápticas del tipo colinérgico, que utilizan la acetilcolina como neurotransmisor, existen unas vesículas especiales que contienen acetilcolina. El impulso nervioso causa la liberación de este neurotransmisor al espacio sináptico y se difunde en el espacio sináptico hasta ponerse en contacto con un receptor colinérgico específico, situado en la membrana postsináptica.

Las sinapsis colinérgicas se localizan en las fibras nerviosas autónomas preganglionares, en todas las fibras parasimpáticas posganglionares, en las terminaciones nerviosas a la médula adrenal y en terminaciones nerviosas a ciertas glándulas sudoríparas y vasos sanguíneos. Las sinapsis neuromusculares también son colinérgicas.

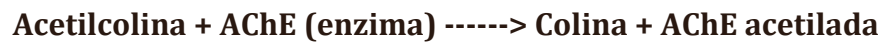
Se conocen dos tipos de sinapsis colinérgicas: las muscarínicas y las nicotínicas, se diferencian entre sí por el tipo de receptor, su localización y su función fisiológica. Reciben su nombre debido a que la nicotina y la muscarina producen una respuesta similar a la acetilcolina las sinapsis neuromusculares y las preganglionares son nicotínicas, las post-ganglionares son generalmente del tipo muscarínico^{17, 19}.

Podemos resumir que la acetilcolina es el mediador químico del sistema nervioso parasimpático y es necesaria para la transmisión del impulso nervioso:

- De las fibras preganglionares a los ganglios del sistema vegetativo.
- De las fibras posganglionares, colinérgicas, al músculo cardíaco, los músculos (lisos y las células secretoras)
- De los nervios motores a los músculos estriados (unión neuromuscular)
- En ciertas estructuras del sistema nervioso central.

En presencia de una concentración normal en acetilcolinesterasa, la acetilcolina liberada durante el proceso de transmisión del influjo nervioso es rápidamente inactivada por hidrólisis⁷.

La acetilcolinesterasa produce la inactivación de la acetilcolina, con la consiguiente disminución de la transmisión del impulso nervioso. La acción de la acetilcolina es muy rápida, la reacción química producida en este proceso es:



La colina puede regresar a la membrana presináptica y ser reutilizada en la síntesis de la acetilcolina.

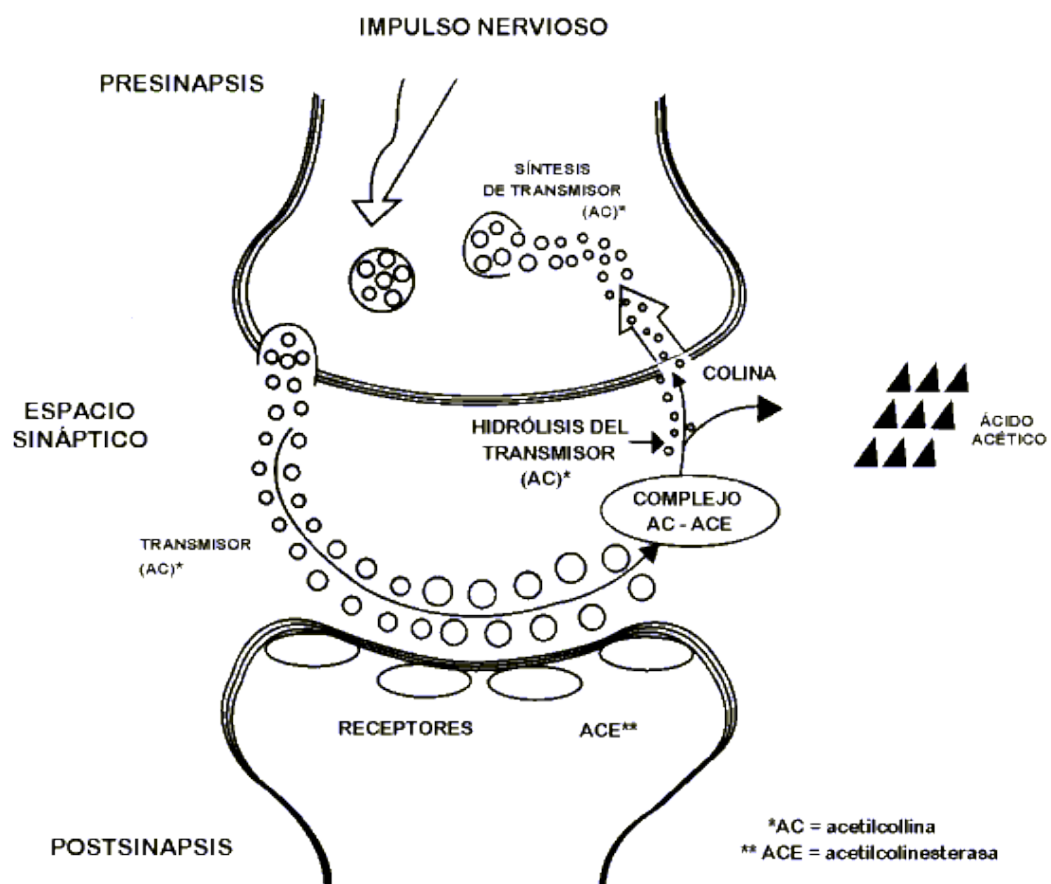
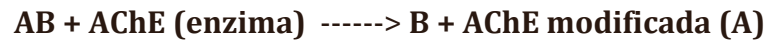


Figura 4: Podemos observar un esquema en el que se representa la transmisión nerviosa en la sinapsis colinérgica¹⁷.

Entonces los plaguicidas de tipo organofosforados actúan sobre el organismo humano inhibiendo la actividad colinesterásica, comportándose como sustancias

anticolinesterásicas (permitiendo así que la acetilcolina siga ejerciendo su actividad).

Estos compuestos reaccionan con la enzima de manera similar a la acetilcolina:



AB representa la molécula del compuesto OP. En el primer paso, la parte ácida (A) del plaguicida se incorpora covalentemente en el sitio activo de la enzima, mientras que se libera su fracción alcohólica (B).

En el segundo paso, una molécula de agua libera la parte ácida (A) del plaguicida, dejando la enzima libre y, por lo tanto, reactivada este proceso de reactivación puede ser mucho más prolongado e incluso llegar a ser irreversible. De ahí que, clínicamente hablando los organofosforados se les llame inhibidores irreversibles porque el proceso de reactivación tarda mucho más tiempo, lo que hace que la enzima pierda sus propiedades catalizadoras^{17, 18, 19}.

La disminución de la actividad colinesterásica se acompaña de una acumulación de acetilcolina:

- En las terminaciones de las fibras posganglionares del sistema parasimpático.
- En los ganglios del sistema parasimpático y ortosimpático.
- En la unión neuromuscular.
- En el sistema nervioso central.

En caso de inhibición de la acetilcolinesterasa por los ésteres organofosforados aparecen, sucesivamente:

- Síntomas debidos a una estimulación del sistema parasimpático; es el síndrome muscarínico.
- Después aparecen los síntomas debidos a la estimulación de los ganglios del sistema vegetativo y de las terminaciones nerviosas de los nervios motores; es el síndrome nicotínico.
- A continuación se observa parálisis de los músculos voluntarios debido a una hiperestimulación.

- Finalmente aparecen efectos debidos a la acumulación de la acetilcolina en el sistema nervioso central.

La gravedad de la intoxicación depende no sólo del grado de inhibición de la acetilcolinesterasa, si no también de la velocidad con la que se inhibe la enzima⁷.

Síntomas de intoxicación por compuesto OP.

En la **intoxicación aguda** se deben considerar tres tipos de síndromes el clásico, el intermedio y el retardado.

- Síndrome clásico:

- Los efectos muscarínicos aparecen primero. Consisten en: calambres abdominales, náuseas, vómitos y diarreas. Sensación de constricción torácica, broncoespasmo, hipersecreción bronquial, disnea y sibilancias (puede producirse edema pulmonar). Visión borrosa, cefalalgias, sialorrea, sudación, lagrimeo, bradicardia, incontinencia vesical y rectal.
- Los efectos nicotínicos se manifiestan cuando los síntomas muscarínicos han alcanzado un grado moderado de gravedad, por: fibrilación muscular, debilidad muscular y ataxia, en caso de intoxicación grave puede aparecer parálisis de los músculos respiratorios, que pueden causar la muerte.
- Los síntomas nerviosos centrales consisten en: ansiedad, vértigos, cefalalgias, temblor, convulsiones, coma y respiración de Cheynes-Stockes y eventualmente parálisis del centro respiratorio.

- Síndrome intermedio.

Consecuencia de una intoxicación aguda. Después del síndrome colinérgico clásico, algunos pacientes pueden padecer, 24 a 46 horas después del contacto con el tóxico, un síndrome paralítico que afecta principalmente los músculos de las raíces de los miembros, el cuello, ciertos nervios motores craneales y los músculos de la respiración.

Se observa en el 20-50% de los casos agudos de envenenamiento; en algunos casos, cuando los pacientes están completamente recuperados de la crisis inicial. La mortalidad debido a la parálisis respiratoria y las complicaciones tienen un rango de 15-40% y la recuperación en pacientes que sobrevivieron suele tardar hasta 15 días.

Cuadro 2: Signos y Síntomas de Intoxicación Aguda con Compuestos Anti-Colinesterásicos⁶

Sitio y receptor afectado	Manifestaciones
Glándulas exocrinas (M)	Aumento de salivación, lagrimeo, transpiración.
Ojos (M)	Miosis, visión borrosa
Tracto gastrointestinal (M)	Calambres abdominales, vomito, diarrea
Tracto respiratorio (M)	Incremento de secreción bronquial, broncoconstricción
Vejiga (M)	Frecuencia urinaria, incontinencia
Sistema cardiovascular (M)	Bradicardia, hipotensión
Sistema cardiovascular (N)	Taquicardia, hipertensión transitoria
Musculo esquelético (N)	Fasiculación muscular, contracciones, calambres, debilidad generalizada, parálisis flácida
Sistema nervioso central (M, N)	Mareos, letargo, fatiga, dolor de cabeza, confusión mental, depresión de los centros respiratorios, convulsiones, coma.

M = Receptores muscarínicos; N = Receptores nicotínicos.

- Síndrome retardado.

Es un efecto neurotóxico retardado, conocido como polineuropatía retardada inducida por organofosforados (OPIDP, por sus siglas en ingles). Los signos y síntomas incluyen hormigueo de las manos y los pies, seguido de pérdida de la sensibilidad, debilidad muscular progresiva y la flacidez de los músculos esqueléticos distal de las extremidades inferiores y superiores, y ataxia.

Esto llega a producirse después de 2-3 semanas de una exposición única, cuando los signos tanto de la colinérgica aguda y los síndromes intermedios han disminuido^{6,7}.

En el caso de la **intoxicación crónica** la exposición repetida a los compuestos organofosforados puede tener efecto acumulativo: cada exposición causa un aumento del grado de inhibición de la actividad colinesterásica del sistema nervioso, y cuando ésta inhibición llega a cierto grado, aparecen síntomas análogos a los de la intoxicación aguda⁷.

2.5 Técnica inmunológica de laboratorio.

Determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica.

En los últimos tiempos, ha aumentado el uso de plaguicidas, especialmente en los países en vías de desarrollo, tanto a nivel agrario como en campañas de salud pública. De ahí la importancia de la determinación de la AChE.

Para su determinación se emplea su capacidad de hidrolizar la acetiltiocolina en ácido acético y tiocolina. Se han desarrollado varios métodos, entre los que se incluyen la determinación del cambio de pH que acompaña la hidrólisis de los ésteres de colina^{22, 23} y aquellos basados en la detección de la liberación de tiocolina de sus ésteres empleando como indicador el reactivo de Ellman (5,5-ditiobis-(2-ácido nitrobenzoico)), DTNB^{22, 25}. Aunque este último método es el más aceptado, conlleva varios inconvenientes:

- La absorbancia máxima del producto de la reacción indicadora, el tionitrobenzoato, coincide con el pico de absorbancia máxima de la hemoglobina de los eritrocitos a 410 nm.
- Los métodos generalmente se realizan con eritrocitos lavados y es necesario hacer una dilución de los mismos, lo que contribuye a la imprecisión y hace difícil la automatización.
- El DTNB es tan sensible a la luz que la luz del día puede aumentar el color si se emplea una incubación de varios minutos o si los tubos de las muestras no se mantienen en la oscuridad mientras se espera para realizar la determinación de la absorbancia²⁷.

Para evitar estos inconvenientes se ha propuesto el empleo del ácido 6-6'-ditiopicotínico (DTNA) como sustituto del DTNB, este es el método utilizado en el presente trabajo.

Bajo las condiciones de reacción, a partir de acetiltiocolina la AChE libera tiocolina, la cual reacciona inmediatamente con el DTNA formando ácido tionicotínico, que presenta un pico máximo de absorbancia a 340nm, permitiendo así el monitoreo directo de la reacción²¹:



Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica.

Espectro de absorción del producto de reacción.

Se realizó el espectro de absorción del producto de la reacción determinando las absorbancias en el intervalo de 300 a 700 nm, se encontró que el pico de absorbancia máxima del ácido tionicotínico se presenta a 340 nm.

Efecto de la concentración de DTNA.

Se analizaron diferentes concentraciones del compuesto en el intervalo de 0.0125 a 0.30 mmol/L. Los mejores resultados se obtuvieron con concentraciones de 0.20 a 0.30 mmol/L. Se eligió la concentración de 0.20 mmol/L como adecuada.

Efecto de la concentración de sustrato.

Se analizaron diferentes concentraciones de acetiltiocolina en el intervalo de 0.25 a 2.5 mmol/L en la mezcla final de reacción. Se observa que con concentraciones entre de 0.5 y 2.0 mmol/L se obtienen valores similares de actividad. Un valor superior a 2.0 mmol/L causa inhibición de la enzima. Por lo tanto, se decidió utilizar en la mezcla final una concentración de sustrato de 0.5 mmol/L.

Efecto del volumen de muestra.

Se analizó el efecto del volumen de muestra sobre la determinación, se emplearon volúmenes en el intervalo de 0.5 a 5.0 μ L. Se observó que con volúmenes dentro de este intervalo se obtienen resultados similares. Se eligió un volumen de muestra de 5.0 μ L como adecuado por comodidad en la medición.

Efecto del pH.

Se analizaron valores de pH en el intervalo de 7.2 a 8.2 conforme aumenta el pH aumenta levemente la actividad de la enzima y en menor medida la hidrólisis espontánea del sustrato. Se eligió un pH de 7.6 como adecuado por ser empleado en otros procedimientos²¹.

2.6 Modelo animal.

Ratón CD1.

- *Origen de la cepa:*

Se creó a partir de un grupo original de ratones suizos que sirvió como progenitores, el cuál se componía de 2 machos y 7 hembras de ratón albino. En el laboratorio de Doctor de Coulon, en el Centro Anticancéreux Romand, en Lausana, Suiza. Estos animales fueron importados de Estados Unidos por la doctora Clara Lynch del Instituto de Rockefeller en 1926.

- *Aspecto y características:*

Es albino, su crecimiento es rápido, es dócil y por lo tanto fácil de trabajar. Posee alta actividad de reproducción.



Foto 1: Ratón perteneciente a la cepa CD 1, utilizado en la experimentación.

3. Planteamiento del problema.

En la actualidad la obesidad representa un problema serio de salud que se asocia con enfermedades catalogadas como las primeras causas de muerte en México, las personas recurren a tratamientos con productos desconocidos para bajar de peso, como los productos “milagro” que están elaborados con extractos e infusiones de plantas que producen daños y problemas a largo plazo en el organismo, como los elaborados con la planta *Thevetia peruviana* que llega a producir gran cantidad de problemas en el organismo por la severa intoxicación que originan algunas de sus sustancias químicas. A pesar de que fue retirada del mercado en el 2000, se siguen reportando casos de intoxicación y muerte de personas por su consumo.

Dentro de los problemas ocasionados por esta planta que se han observado en ratones, se encuentra una neurotoxicidad que por la sintomatología que presenta es muy parecida a la descrita por intoxicaciones con pesticidas organofosforados donde se producen efectos muscarínicos y nicotínicos consecuencia de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa. Con la finalidad de saber si la acción neurotóxica de la *Thevetia peruviana* también se encuentra relacionada con la enzima acetilcolinesterasa, se realizó un estudio en un modelo de ratón donde se comparó la concentración de esta enzima en sangre usando intoxicaciones con pesticida OP, extracto de semilla de *Thevetia peruviana* y un control negativo.

Población de estudio: Ratones CD1 machos, de 10-15 semanas de edad, de entre 35-40 g de peso, exentos de enfermedad, mantenidos en condiciones de bioterio, divididos en tres grupos de cuatro ratones por día hasta completar los ensayos.

Tipo de estudio: Experimental, prospectivo y transversal.

Criterios de inclusión: Ratones CD1 machos, de 4-5 semanas de edad, de entre 35-40 g de peso, sanos.

Criterios de exclusión: Hembras, ratones que presenten alguna enfermedad, que no cumplan con el peso o con la edad.

Criterios de eliminación: Aquellos animales que durante el proceso de experimentación mueran.

Variable: Concentración de acetilcolinesterasa en sangre total, dada en U/L.

4. Objetivos.

- Evaluar la toxicidad a nivel de sistema nervioso del extracto acuoso de semilla de *Thevetia peruviana* en ratones CD1 mediante una intoxicación aguda, tomando como referencia la neurotoxicidad que se presenta en intoxicaciones con pesticidas organofosforados.
- Montar un método experimental en ratones CD1 para evaluar el daño neurotóxico de un extracto acuoso de *Thevetia peruviana*, por medio de la observación y comparación de la sintomatología presentada con el extracto y un pesticida OP así como la medición de la concentración de acetilcolinesterasa en sangre.

5. Hipótesis.

Debido a que en antiguas intoxicaciones agudas inducidas en ratones CD1 con extracto acuoso de semilla de *Thevetia peruviana* se observaron sintomatologías relacionadas con problemas neuromusculares, las cuales se asemejan a las producidas por pesticidas organofosforados al inhibir la acetilcolinesterasa, se cree que la *Thevetia peruviana* produce una acción sobre la enzima AChE produciendo efectos muscarínicos y nicotínicos.

6. Material, equipo y reactivos.

Reactivos

Nombre	Proveedor
Ácido 6,6'ditiodinicotínico	Sigma
Agua destilada	
Éter etílico	Productos Químicos Monterrey, S.A.
Extracto acuoso de semilla de <i>Thevetia peruviana</i>	
Fosfato de potasio	Técnica Química S. A.
Fosfato de sodio disódico	J. T. Baker Chemical Co.
Hidrocloruro de quinidina	Sigma
Hidróxido de sodio	J. T. Baker Chemical Co.
Pesticida organofosforado	Dragon (Foley)
Solución salina	PISA
Tritón X-100	J. T. Baker Chemical Co.
Yoduro de acetiltiocolina	Sigma

Equipo

Nombre	Marca
Bascula analítica	ae ADAM
Baño metabólico	PRECISION Circulating System-253
Bomba de vacío	
Espectrofotómetro	JENWAY 6305 UV/Vis

Material

Material	Marca
Celdas para espectrofotómetro	
Cronómetro	
Gradilla de metal	
Matraz aforado de 10 mL	PYREX
Matraz aforado de 1000 mL	PYREX
Matraz bola de 25 mL	PYREX
Micropipeta de 5-15 μL	SOCOREX SWISS
Micropipeta de 40-200 μL	EXTEND by MENARINI
Micropipeta de 100-1000 μL	TIPOR-V ⁺
Pipeta volumétrica de 5 mL	KIMAX
Puntas para micropipeta	
Recirculador	
Tubos con EDTA	Vacutainer
Tubos de ensayo 13X100	PYREX
Vasos de precipitado de 50 mL	PYREX

7. Métodos.

- Extracto acuoso de semilla de *Thevetia peruviana*.

Se tomaron 10 semillas de *Thevetia peruviana*, y con ayuda de un martillo se golpearon para poder romperlas y sacar su contenido, para esto se usó guantes y cubre-bocas. Se fue macerando el contenido de las semillas poco a poco mientras se le agregaba agua destilada hasta obtener un homogéneo de las semillas, esto usando la mínima cantidad de agua posible. La mezcla obtenida se vertió a un matraz bola y se colocó en un sistema para destilar a presión reducida hasta que toda el agua se evaporó por completo y se observó una masa homogénea de color café. Esta masa se puso a secar a ultra vacío por 3 días.

- Manejo de los animales en experimentación.

Se emplearon ratones machos de 10 a 15 semanas de edad, de la cepa CD1, mantenidos en condiciones de bioterio, con controles de ciclos luz-oscuridad, cambio semanal de viruta de madera y con libre acceso a agua y alimento. La atención de los animales y el proceso experimental se llevó a cabo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).



Foto 2: Ratones utilizados para la experimentación.

Se utilizaron por día grupos de 4 ratones, esto por la precisión en las determinaciones de la enzima AChE. Cada ratón se marcó y pesó para poder calcular la dosis exacta que se les administró de acuerdo al grupo que pertenece:

- 1) Control positivo: se les indujo una intoxicación, por sonda gástrica, usando pesticida organofosforado de la marca Dragon (Foley) diluido en solución salina para obtener una dosis de 250 mg/Kg. El uso de esta elevada dosis se especificó después de suministrarle a un grupo de ratones diferentes dosis hasta que se obtuvieron los signos y síntomas deseados.
- 2) Grupo testigo: se les administró una dosis de solución salina (0.2 mL) por vía gástrica usando una sonda para someterlos al mismo estrés.
- 3) Grupo de experimentación: se hizo una solución del extracto de *Thevetia peruviana* con solución salina, la cual se les administró por vía gástrica por medio de una sonda, induciéndoles así una intoxicación aguda con dosis de 50 mg/Kg cada hora, hasta llegar a una dosis final de 150mg.

Transcurrido el tiempo de intoxicaciones, después de 15 minutos de ser administrada la última dosis del grupo de experimentación, cada ratón se adormeció usando una cámara de éter y posteriormente por medio de una incisión del plexo axilar se tomó una muestra de sangre. La muestra de sangre se tomó con una micropipeta de 1000 μL y se vertió en tubos Vacutainer® con EDTA mezclando por inversión del tubo la muestra de sangre con el anticoagulante y cambiando la punta de la micropipeta para cada ratón. Inmediatamente después de tener las muestras se les determinó la concentración de enzima.

- Determinación de la enzima acetilcolinesterasa.

Preparación de reactivos:

- **Solución amortiguadora de fosfato**, 100 mmol/L, pH 7.6. Se disolvieron 2.33 g de Na_2HPO_4 y 0.831 g de KH_2PO_4 en 800 mL de agua destilada, posteriormente con ayuda de un potenciómetro se ajustó el pH a 7.6 con solución de NaOH 0.02M previamente hecha. Una vez ajustado el pH se trasvasó a un matraz volumétrico de un litro, y se aforó hasta la marca con agua destilada, mezclando para homogenizar la solución.
- **Solución de trabajo**. En un matraz volumétrico de un litro se colocaron: 61.66 mg de ácido 6,6'ditiodinicotínico (DTNA), 25.8 mg de hidrocloreuro de quinidina y 1 mL de Tritón X-100. Se aforó hasta la marca con la solución amortiguadora de fosfatos (100 mmol/L, pH 7.6) anteriormente realizada y se

mezcló. Esta solución se mantuvo almacenada en una botella ámbar y en refrigeración (4-8° C), como lo indicaba la referencia bibliográfica, durante todo el tiempo que se realizaron las determinaciones.

- **Sustrato, yoduro de acetiltiocolina**, 10.5 mmol/L. Se pesaron 30.40 mg de yoduro de acetiltiocolina y se disolvieron en 10 mL de agua destilada usando un matraz aforado de 10 mL. Esta solución se mantuvo en congelación a -20° C, durante el tiempo que se estuvieron realizando las determinaciones.

Procedimiento:

- Para cada una de las muestras se usó un tubo de vidrio de 13x100 mm al cual se le colocaron 2.0 mL de la solución de trabajo y en conjunto todos los tubos utilizados para las determinaciones se pusieron a incubar en un baño metabólico previamente puesto a 30° C, hasta que se estabilizó la temperatura en todos los tubos.
- Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de utilizarse, tal es el caso del sustrato que se debió descongelar antes de usarse.

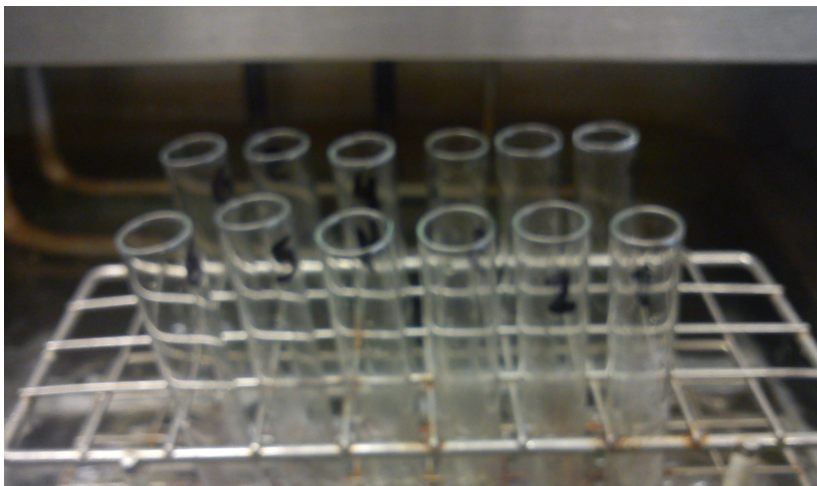


Foto 3: Tubos en baño metabólico a 30° C, con 2 mL de solución de trabajo.

- Posteriormente se trabajó cada tubo individualmente por los tiempos exactos de incubación que se necesitan. Se agregaron 5 µL de muestra correspondiente (sangre total) al tubo, se mezcló e incubó a 30° C por dos minutos. Después se le agregaron 100 µL de sustrato, se mezcló, y se esperaron 30 segundos manteniendo el tubo a 30° C.

- Finalmente se determinó el cambio de absorbancia por minuto usando un espectrofotómetro a una absorbancia de 340 nM y controlando la temperatura de la muestra a 30º C, usando un baño maría. Previamente se ajustó el espectrofotómetro a cero de absorbancia usando como blanco agua destilada²¹.



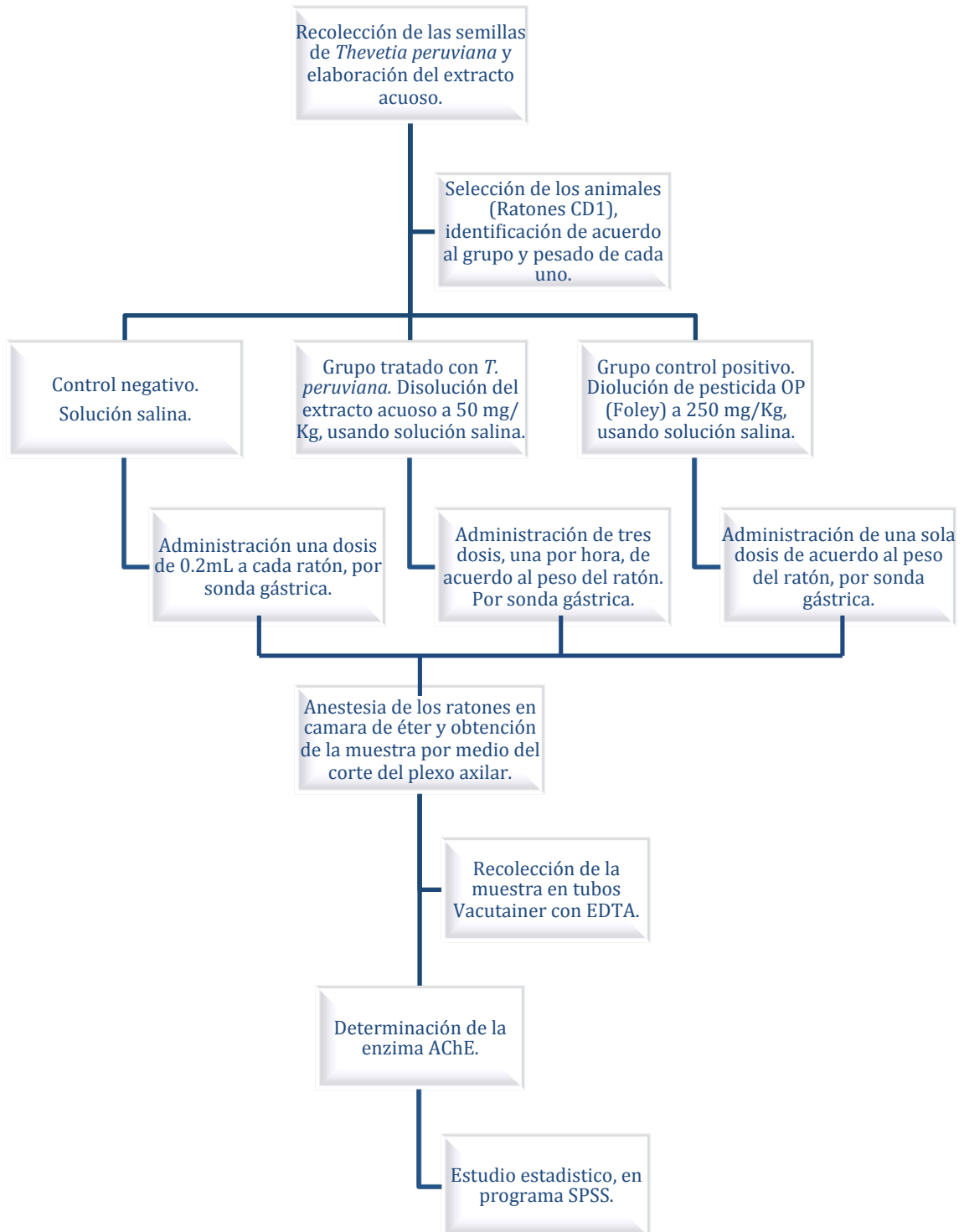
*Foto 4: Tubos Vacutainer con EDTA conteniendo muestra de sangre.
Material para hacer la determinación de acetilcolinesterasa.*

- *Obtención de resultados e interpretación.*

Una vez hechas las determinaciones, se obtuvieron dos absorbancias de cada muestra, las cuales de acuerdo con la fórmula Acetilcolinesterasa U/L = $\Delta A / \text{min} \times 39000$, se determinaron los valores de la enzima para cada ratón de cada grupo. Posteriormente los resultados obtenidos dados en U/L se corrieron en el programa estadístico SPSS usando una prueba de análisis de varianza (ANOVA), para comparar los resultados de cada grupo, y a la par se realizó una prueba de Tukey.

Mientras se realizaron las intoxicaciones se obtuvieron videos e imágenes donde se puede observar la sintomatología que presentaron los ratones con cada sustancia que se uso para inducirles la intoxicación.

8. Diagrama de flujo.



9. Resultados.

En intoxicaciones con pesticidas organofosforados se ha observado una sintomatología muy característica con presencia de un síndrome muscarínico y nicotínico consecuencia de la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa, una sintomatología muy parecida también se ha observado en intoxicaciones agudas con extracto de semilla de *Thevetia peruviana*.

Por tal razón durante toda la experimentación se realizaron observaciones detalladas de los grupos de ratones intoxicados para identificar los síntomas que presentaban, el tiempo en que se desarrollaba cada uno y la duración de estos permitiéndonos comparar el comportamiento de los ratones y la sintomatología desarrollada en los diferentes grupos.

- **Grupo testigo:** A los ratones CD1 utilizados como testigos sólo se les administró una dosis de 0.2 mL de solución salina, por lo tanto su comportamiento se apreció como normal, tanto su actividad física como su alimentación, sin presentar cambios en su conducta como postración, ciclos de sueño más largos, etc. En la foto 5 se muestra el grupo de ratones usados como testigos donde hay un comportamiento conductual normal: mostrándose activos, sin cambios en el apetito ni en su conducta y con ciclos de sueño regulares.



Foto 5: Ratones CD 1 usados en la experimentación, corresponden al grupo testigo.

- **Grupo control positivo:** Estos ratones fueron intoxicados con pesticida organofosforado usando solo una dosis de 250mg/Kg de peso. A esta dosis los ratones después de 15 minutos de ser administrado el pesticida entraban en postración, la cual se caracterizaba por la agrupación de los ratones en las esquinas de la caja encimándose unos sobre otros (Foto 6). Conforme transcurría el tiempo los ratones presentaban periodos de postración combinados con periodos donde se observaban activos sin periodos largos de sueño. Transcurridos 30 minutos se logró ver un cambio en el pelaje por la sudoración que empezaba a ser notoria.

Dentro de la sintomatología descrita en la bibliografía se habla de salivación y dificultad respiratoria lo cual solo se presentó en un 17% de los ratones que al igual presentaron ataxia. A las dos horas de intoxicación se observó una notoria mejoría en todos los ratones, sólo uno murió y en ninguno se observó algún tipo de parálisis.



Foto 6: Ratones CD1, pertenecientes al grupo tratado con pesticida organofosforado.

- **Grupo de experimentación:** Se indujo una intoxicación aguda a los ratones utilizando dosis de 50 mg/Kg cada hora hasta completar una dosis final de 150 mg/Kg, por lo cual se fueron observando los síntomas en cada periodo de tiempo desde la primera dosis hasta la tercera. En la **primera dosis** los ratones presentaron síntomas de intoxicación hasta los primeros 15 minutos donde presentaban postración caracterizada por la agrupación de los ratones

en las esquinas de la caja encimándose unos sobre otros. Transcurridos 30 minutos de la primera dosis se observaron problemas de respiración y taquicardias. Al termino de la primera hora los ratones comenzaban a reponerse y a verse con actividad física normal.

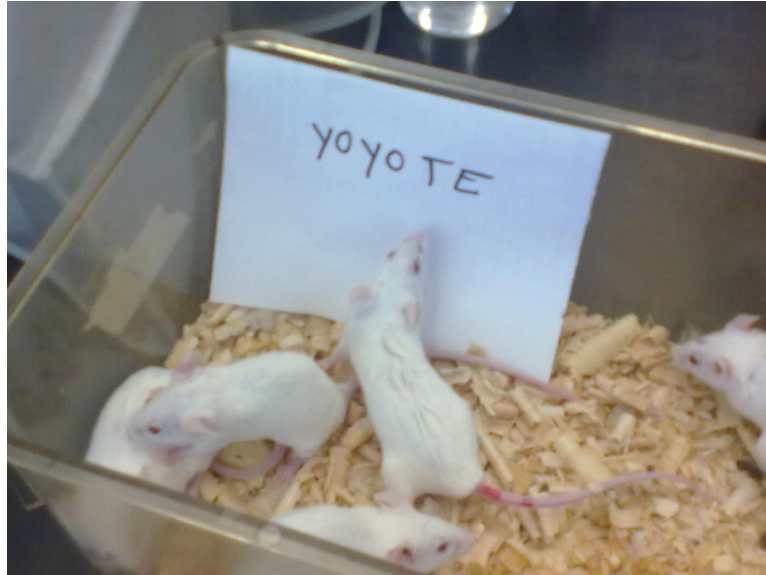


Foto 7: Ratones CD1, grupo tratado con Thevetia peruviana se observan tras una primera dosis del extracto.



Foto 8: Ratones CD1, grupo tratado con Thevetia peruviana. Se observan en postración tras una segunda dosis del extracto.

En la **segunda dosis** la postración se presentaba a los 10 minutos de ser administrado el extracto junto con dificultad respiratoria. Después de 30 minutos transcurridos se observaron taquicardias, dificultad respiratoria de tipo abdominal y torpeza para caminar. A los 40 minutos los ratones mostraron ataques de temblores lo que no les permitía una buena

coordinación resaltando que caminaban en reversa, la respiración seguía abdominal y se mostraban aún las taquicardias. Ya para los 45 minutos era evidente el no control de esfínteres y una ataxia combinada con parálisis de la parte trasera del ratón haciendo que ya no caminara o se arrastrara un poco. Al finalizar la hora empezaba una ligera mejoría en la mayoría de los ratones. Para la **tercera dosis** sólo se observaba la sintomatología de los primeros 15 minutos ya que se debía tomar la muestra de sangre antes de que murieran, los síntomas se presentaron rápidamente y agudizados, llegando a darse en los ratones convulsiones con pérdida de control de esfínteres, salivación profusa, pérdida completa de movilidad y la muerte de un ratón.

Resultados de las determinaciones de enzima acetilcolinesterasa en sangre total de ratones CD1 intoxicados.

La determinación de la enzima se hizo por medio de la técnica estandarizada descrita anteriormente²¹.

Concentración de enzima acetilcolinesterasa dado en U/L:

	<i>Testigos</i>
1	1326
2	1501
3	1131
4	1072
5	1423
6	1033
7	1580
8	1716
9	1657
10	1579
11	1950
12	1521
13	1404
14	2184
15	1911
16	1638
17	1404

Cuadro 3: Concentraciones de enzima acetilcolinesterasa determinada en sangre total de ratones CD1 pertenecientes al grupo testigo, a los cuales se les administró solución salina por medio de sonda gástrica. Usando los resultados como un parámetro comparativo de ratones saludables.

Resultados de las determinaciones de enzima acetilcolinesterasa en sangre total de ratones CD1 intoxicados.

La determinación de la enzima se hizo por medio de la técnica estandarizada descrita anteriormente²¹.

Concentración de enzima acetilcolinesterasa dado en U/L:

	<i>Thevetia peruviana</i>
1	1385
2	2048
3	1775
4	1697
5	1716
6	2223
7	1755
8	1716
9	1443
10	2379
11	1989
12	2145
13	1794
14	2535
15	1833
16	1904
17	1833
18	2457
19	2223
20	2106
21	1794
22	1833
23	1404
24	1677

Cuadro 4: Concentraciones de enzima acetilcolinesterasa determinada en sangre total de ratones CD1 pertenecientes al grupo experimental, a los cuales se les administró extracto acuoso de semilla de *Thevetia peruviana* por medio de sonda gástrica induciéndoles una intoxicación aguda con dosis de 50 mg/Kg de peso cada hora hasta completar una dosis final de 150 mg/Kg.

Resultados de las determinaciones de enzima acetilcolinesterasa en sangre total de ratones CD1 intoxicados.

La determinación de la enzima se hizo por medio de la técnica estandarizada descrita anteriormente²¹.

Concentración de enzima acetilcolinesterasa dado en U/L:

	<i>Pesticida OP</i>
1	975
2	936
3	741
4	1092
5	1443
6	1189
7	1209
8	1521
9	1287
10	1014
11	1326
12	1131
13	897
14	1014
15	1248
16	897
17	741
18	859
19	1170
20	702
21	1014
22	936
23	1794
24	975
25	507
26	819
27	1131
28	819
29	975

Cuadro 5: Concentraciones de enzima acetilcolinesterasa determinada en sangre total de ratones CD1 pertenecientes al grupo control positivo, a los cuales se les administró una solución de pesticida organofosforado una dosis de 250 mg/Kg por medio de sonda gástrica. Usando los resultados como parámetro comparativo de una inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

10. Análisis estadístico.

Se usó el programa estadístico SPSS para Windows, donde se realizó un análisis de varianza (ANOVA), con un intervalo de confianza de 95% y la prueba de Tukey. Se obtuvo:

Cuadro 6 y 7: ANOVA de un factor.

Descriptivos

AChE (U/L)

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Testigos	18	1547.94	307.197	72.407	1395.18	1700.71	1033	2184
Pesticida O-F	29	1046.97	268.507	49.860	944.83	1149.10	507	1794
Thevetia p.	24	1902.67	311.730	63.632	1771.03	2034.30	1385	2535
Total	71	1463.23	472.784	56.109	1351.32	1575.13	507	2535

ANOVA

AChE (U/L)

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	9788695.151	2	4894347.576	56.814	0.000
Intra-grupos	5858013.243	68	86147.254		
Total	15646708.394	70			

Cuadro 8: Subconjuntos homogéneos.

AChE (U/L)

HSD de Tukey

Intoxicación con:	N	Subconjunto para alfa = .05		
		1	2	3
Pesticida O-F	29	1046.97		
Testigos	18		1547.94	
Thevetia p.	24			1902.67
Sig.		1.000	1.000	1.000

Usando el programa Sigma Plot 10.0 para Windows se realizó el siguiente gráfico:

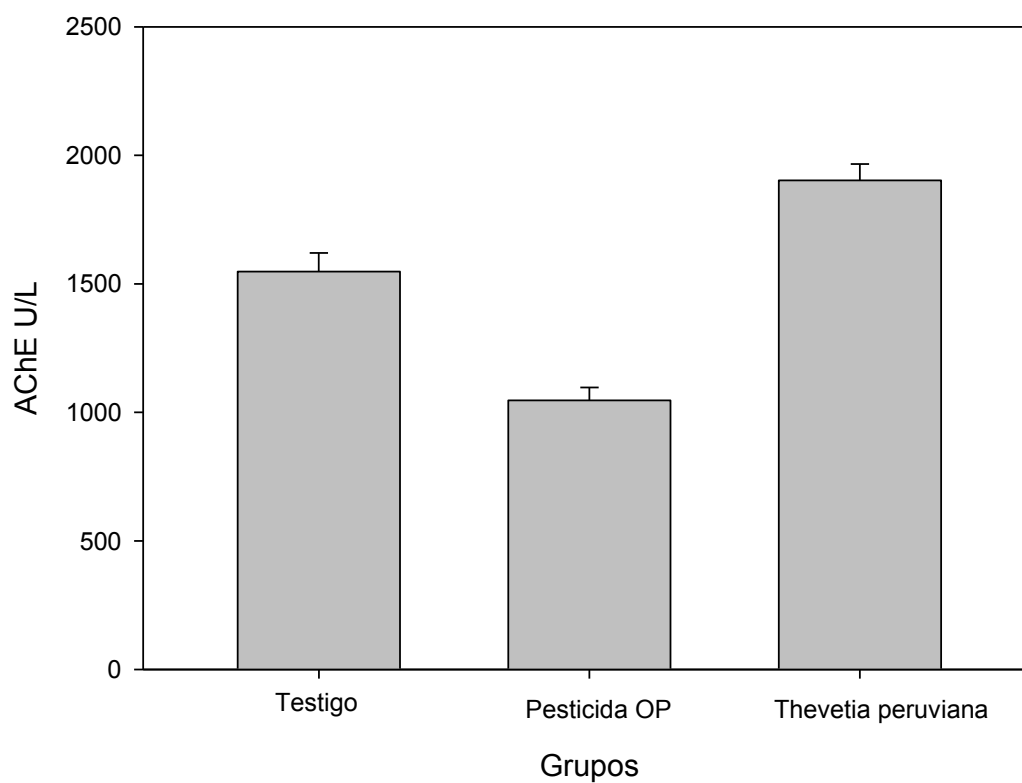


Gráfico 1: Se muestran las medias de cada grupo contrastadas con su error típico teniendo para el grupo testigo 1547.94 ± 72.407 , para el control positivo tratados con pesticida 1046.97 ± 49.860 y para el grupo tratado con el extracto de planta 1902.67 ± 63.632 . A un intervalo de confianza del 95% y un valor de significancia (sig.) de 0.0001 entre las medias.

11. Análisis de resultados.

En la actualidad la obesidad representa un problema cada vez mayor en México lo cual a llevado a las personas a ingerir productos que prometen bajar de peso ofreciéndose como naturales hechos a base de infusiones y extractos de plantas. A pesar de que la herbolaria a existido en México desde hace muchos años no se sabe con claridad los efectos adversos y benéficos que pueden llegar a tener la gran variedad de plantas existentes, tal es el caso de la *Thevetia peruviana* contenida en varios productos para bajar de peso que si bien cumple con su objetivo también ocasiona problemas en el organismo.

Intoxicaciones agudas con extracto de semilla de esta planta han ocasionado en ratones CD1 una sintomatología muy parecida a la ocasionada por pesticidas organofosforados los cuales tiene como mecanismo la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa.

Los pesticidas O-P que actúan sobre la AchE inhibiéndola, producen una acumulación de la acetilcolina en las sinapsis colinérgicas, que conlleva a una sobre-estimulación de los receptores de tipo muscarínico y nicotínico desencadenando una serie de sintomatologías características de este tipo de intoxicación. Se presenta un síndrome colinérgico caracterizado por: aumento de la sudoración y salivación, secreción bronquial profusa, bronco-constricción, miosis, aumento de la motilidad gastrointestinal, diarrea, temblores, espasmos musculares, y diversos efectos en el sistema nervioso central⁵.

Comparando la sintomatología provocada por la inhibición de la AChE descrita en la bibliografía con la observada en los ratones de estudio intoxicados con una solución de pesticida O-P podemos notar que existen bastantes variantes en cuanto a la intensidad de los síntomas, así como la duración y la recuperación o no de los ratones intoxicados. Esto se debe a que el pesticida que se ocupó no contenía la concentración que indicaba y por lo tanto la dosis efectiva donde se pudieran desarrollar todos los síntomas con la intensidad y duración característica no se pudo obtener, ya que la solución que se administraba a los ratones conforme se iba aumentando la dosis se hacía más espesa y era difícil administrarla por sonda gástrica.

A pesar de que los ratones intoxicados con el pesticida llegaron a presentar síntomas poco marcados como sudoración, salivación, postración y dificultad para respirar por citar algunos; no fue un factor indicativo para descartar que el pesticida ocupado no funcionaba como inhibidor de la AChE ya que como podemos observar (Cuadro 5) los resultados de las determinaciones de concentración de enzima en sangre del control positivo son notoriamente más

bajas, teniendo una media 1046.97 ± 49.860 , que las determinaciones del grupo testigo (Cuadro 3) donde la media fue de 1547.94 ± 72.407 .

Como el principal objetivo es saber si la *Thevetia peruviana* actúa de la misma manera que los pesticidas O-P a nivel neuromuscular, se eligió un grupo de ratones a los cuales se les administró un extracto acuoso de semilla de la planta, de acuerdo a los resultados descritos observamos una sintomatología más marcada e intensa comparada con los control positivo. Los síntomas que se presentaron eran más parecidos a los descritos en la bibliografía para intoxicaciones con pesticidas O-P como: problemas de respiración y taquicardias muy marcadas, ataxia y parálisis de la parte trasera del ratón inmovilizándolos combinada con la pérdida de control de esfínteres y convulsiones que llegaron a presentar algunos ratones provocándoles en su minoría la muerte.

Aunque la sintomatología era muy marcada y parecida a la provocada por intoxicaciones con pesticidas O-P los resultados obtenidos de las determinaciones de concentración de AChE en sangre de ratones intoxicados con la planta (Cuadro 4) mostraron un elevado aumento en la concentración, teniendo una media de 1902.67 ± 63.632 , comparándolo con las concentraciones del grupo testigo y con las del control positivo. Por lo cual el mecanismo de acción del extracto de planta difiere al de los pesticidas organofosforados dado que se produce una acumulación de la enzima en sangre y no una inhibición de esta.

Tomando en cuenta que la inhibición de la AChE, por pesticidas organofosforados, provoca acumulación de la acetilcolina en la unión sináptica y la interrupción de la transmisión normal de los impulsos nerviosos produciendo los síntomas de intoxicación porque la acción colinérgica se mantiene ininterrumpidamente a lo largo del tiempo. Entonces, ya que una sintomatología muy parecida se presenta con el extracto de semilla de *Thevetia peruviana*, se puede suponer que también se debe a una estimulación ininterrumpida sobre los receptores colinérgicos tanto muscarínicos como nicotínicos.

Ya que la estimulación continua de los receptores muscarínicos produce síntomas de envenenamiento colinérgico que incluye broncoconstricción y secreciones bronquiales, aumento de la salivación y el lagrimeo, náuseas, vómitos, diarreas, braquicárdias que pueden progresar hasta el bloqueo cardiaco, constricción de pupilas, etc. Y que la estimulación de receptores nicotínicos (en las uniones neuromusculares) causa debilidad muscular, tic involuntarios, gesticulaciones y calambres. Además de que la acumulación de acetilcolina en el SNC causa tensión, neurosis, apatía, confusión, jaqueca, convulsiones, depresión de los centros respiratorio y circulatorio, pudiendo llegar a coma y muerte.

De acuerdo a todo lo anterior se sugiere un mecanismo para la neurotoxicidad ocasionada por el extracto acuoso de semilla de *Thevetia peruviana*, el cual sugiere que en el extracto administrado a los ratones pueda haber sustancias con estructura química muy parecida a la acetilcolina y que estas sustancias se unan a los receptores nicotínicos y muscarínicos provocando una acumulación tanto de acetilcolina y de su enzima acetilcolinesterasa. En la bibliografía se buscaron varias sustancias que pudieran contener una estructura química similar a la acetilcolina pero no se encontró ninguna registrada (Bibliografía: 36-39).

También se realizó un estudio estadístico para conocer la veracidad de los resultados de acuerdo al modelo científico, el estudio estadístico que se realizó fue ANOVA, en el Cuadro 7 se puede observar las variaciones intra-grupo e inter-grupo, así como los grados de libertad (gl) y el nivel de significancia observado (Sig) parámetro que principalmente nos importa, cuyo valor es menor de 0.05 (0.0001)³⁵. Esto significa que se rechaza la hipótesis de igualdad de medias, y que las poblaciones definidas por la variable "tóxico administrado" no poseen las mismas concentraciones (U/L) de la enzima AChE en sangre. Esto quiere decir que las concentraciones de AChE en sangre del control positivo (Cuadro 5) difieren tanto de las concentraciones del grupo testigo (Cuadro 3) como de las concentraciones del grupo de experimentación (Cuadro 4), siendo las del control positivo las más bajas. De igual manera las concentraciones de la enzima en sangre de los ratones tratados con el extracto de *Thevetia peruviana* difieren con las concentraciones de AChE del grupo testigo y de las concentraciones del grupo control positivo, siendo las del grupo de experimentación las más altas.

También se realizó una prueba de Tukey, representada en el Cuadro 8 donde observamos una clasificación de los grupos de ratones utilizados (control positivo, testigos y experimentación) basada en el grado de parecido entre sus medias teniendo tres subconjuntos diferentes 1 para el grupo de pesticida O-P, 2 para el grupo testigo y 3 para el grupo de *Thevetia peruviana*, cada grupo de ratones pertenece a subconjuntos diferentes lo que indica que las medias de cada grupo difieren todas entre si. Debajo de cada subconjunto se encuentra un Sig de 1.000, por lo tanto para cada grupo de ratones los valores de concentración de AChE se mantienen homogéneos.

12. Conclusiones.

- La sintomatología presentada por los ratones tratados con el extracto de *Thevetia peruviana* es similar a la descrita por intoxicación con pesticidas OP, pero por un mecanismo de acción diferente.
- La estimulación continua de los receptores muscarínicos y nicotínicos tanto en la intoxicación con pesticida como con el extracto de la planta es lo que desencadena la sintomatología tan parecida.
- Las bajas concentraciones de acetilcolinesterasa en sangre de los ratones del grupo control positivo (Cuadro 5) se debe a la inhibición de la enzima, sin embargo las altas concentraciones de AChE en sangre de ratones del grupo de experimentación (Cuadro 4) sugieren una acumulación por algún mecanismo.
- No se sabe con seguridad el mecanismo por el cual se produzca la neurotoxicidad de la planta pero se puede deber a que el extracto contenga sustancias con estructura química similar a la acetilcolina.

13. Glosario.

Acetilcolina: primer neurotransmisor descubierto. Sustancia encargada de la transmisión de impulsos nerviosos de las neuronas preganglionares a las postganglionares, en los ganglios del sistema nervioso autónomo. A nivel del sistema nervioso parasimpático también media la transmisión entre la neurona y el órgano efector.

Acetilcolinesterasa: es una esterasa tipo B, situada en las hendiduras sinápticas. Hidroliza la acetilcolina, degradándola a colina y acetato.

Ataxia: la ataxia es un síntoma. Quiere decir torpeza o pérdida de coordinación. La ataxia puede afectar a los dedos y manos, a los brazos y piernas, al cuerpo, al habla, o a los movimientos oculares.

Biotransformación: conjunto de cambios químicos que una sustancia sufre en el organismo por la acción de enzimas, microorganismos, etc. Modificación que sufre todo xenobiótico en su paso a través del organismo.

Bradicardia: la bradicardia es una anormalidad en los latidos del corazón, concretamente se trata de un descenso en la frecuencia cardíaca. En los adultos se define por un ritmo cardiaco de menos de 60 latidos por minuto.

Broncoconstricción: es una característica clínica típica de las enfermedades broncopulmonares obstructivas. Es la reducción del diámetro bronquial por constricción de la musculatura lisa de su pared.

Cardenólidos: son metabolitos secundarios, producidos por las plantas del género *Digitalis*, que se utilizan ampliamente en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

Coefficiente de partición: razón de la distribución de una sustancia entre dos fases cuando un sistema está en equilibrio. El coeficiente de partición utilizado con mayor frecuencia en toxicología es la distribución lípido-agua.

Disnea: es la sensación subjetiva de una respiración difícil, laboriosa o molesta. Es el término que se aplica a la sensación de falta de aliento, así como a la reacción del paciente a esta sensación.

Dosis: la cantidad de sustancia a la que se expone el organismo y el tiempo durante el que estuvo expuesto. Determina el tipo y magnitud de la respuesta biológica.

Dosis letal media: (DL_{50}) es la dosis única que, obtenida por estadística, de una sustancia de la que puede esperarse que produzca la muerte del 50% de los animales a los que se haya administrado. Se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal.

Edema: signo que se manifiesta como un hinchazón de los tejidos blandos debido a una excesiva acumulación de líquidos en el compartimento intersticial. El líquido procede del plasma y se acumula por haberse facilitado su paso del compartimento vascular al intersticial.

Enzima: es una proteína que cataliza las reacciones bioquímicas del metabolismo. Las enzimas actúan sobre las moléculas conocidas como sustratos y permiten el desarrollo de los diversos procesos celulares.

Eritema: inflamación superficial de la piel como consecuencia del exceso de riego sanguíneo que provocará vasodilatación y que es acompañada por manchas rojas.

Fagocitosis: proceso en el cual una célula especializada llamada fagocitos, (donde se incluyen los macrófagos, neutrófilos y otros glóbulos blancos de la sangre) engulle desechos, bacterias u otros objetos grandes. La invaginación produce una vesícula llamada fagosoma.

Faneras: son estructuras complementarias y visibles sobre la piel o que sobresalen de ella, como las uñas y los pelos en los seres humanos. Las faneras, junto a la piel, constituyen en sistema integumentario.

Herbolaria: conjunto de conocimientos relativos a las propiedades curativas de las plantas. Es la utilización de plantas para prevenir o tratar diversas enfermedades.

Lanceolada: la hoja con forma de lanza, es decir, estrechamente elípticos y acabados en punta en ambos extremos.

Miosis: indica la contracción de la pupila del ojo. Esta acción es antagónica a la de la dilatación de la pupila o midriasis. Es una respuesta normal del organismo al aumento de luminosidad, pero puede ser generada también por una variedad de condiciones, incluyendo ciertos fármacos o sustancias químicas y varias enfermedades.

Neuritis periférica: es una enfermedad de los nervios periféricos, que son todos excepto los del cerebro y la médula espinal. Esta enfermedad se origina a causa de una serie de sufrimientos que atacan la mielina, que es el manto que recubre los nervios, lo que ocasiona una mala transmisión de los impulsos dolorosos al cerebro.

Obesidad: enfermedad crónica, que se caracteriza por un exceso de grasa, que a su vez se traduce en un aumento de peso, que sobrepasa en un 15% el peso teórico, debido al aumento de las reservas adiposas.

Opsonización: es el fenómeno por el cual los anticuerpos que envuelven un antígeno (bacteria, virus, etc.) activan la fagocitosis mediante los receptores Fc de los macrófagos, neutrófilos o polimorfonucleares.

Pinocitosis: es un proceso biológico, que permite a algunas células y organismos unicelulares, obtener líquidos orgánicos del exterior para ingresar nutrientes o para otra función.

Quimiotaxis: fenómeno en el cual las bacterias y otras células de organismos dirigen sus movimientos de acuerdo a ciertas sustancias químicas en su medio ambiente.

Radicales libres: son moléculas inestables y muy reactivas. Para conseguir la estabilidad modifican a moléculas de su alrededor provocando la aparición de nuevos radicales, por lo que se crea una reacción en cadena que dañará a muchas células y puede ser indefinida si los antioxidantes no intervienen.

Respiración de Cheynes-Stokes: un tipo común y extraño de respiración caracterizada por períodos alternantes de apnea e hiperapnea. Por lo general, en 1 minuto, se observa un período de 10 a-20 segundos de apnea.

Sialorrea: excreción excesiva de saliva por la boca como resultado de un aumento de su producción. Puede deberse a afecciones de la mucosa oral y de la lengua, estados de dentición y factores psicógenos.

Sibilancias: corresponden a un sonido silbante y chillón durante la respiración que ocurre cuando el aire fluye a través de las vías respiratorias estrechas. También conocidas como estertores sibilantes.

Taquicardia: aumento del ritmo de los latidos del corazón. Puede producirse como un proceso puramente fisiológico durante un esfuerzo físico intenso, o por causas patológicas, como en la enfermedad o en algunas insuficiencias cardíacas.

Vasodilatación: aumento del calibre de los vasos sanguíneos por relajación de la musculatura lisa de sus paredes, especialmente de las arteriolas. Provoca un incremento del riego sanguíneo en la zona afectada.

14. Referencias.

- 1) Cofepris alerta sobre productos adelgazantes. Available from: <http://www.eluniversal.com.mx/notas/622353.html>
- 2) Aguilar José Armando. Entrega especial de Profeco: Productos milagro para adelgazar. Available from: http://www.profeco.gob.mx/revista/publicaciones/adelantos_05/prod_milagro_ene05.pdf
- 3) Torres, Nicolás. Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*. Escuela de Medicina. Retel, 2009;19. Available from: <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=Content&pa=showpage&pid=658>
- 4) Singing to the plants. Steve Beyer's Blog on Ayahuasca and the Amazon. Available from: <http://www.singingtotheplants.com/2007/12/camalonga/>
- 5) González de Y Aular, Peña M., Pérez Ágreda J. y Díaz M. Intoxicación por la administración de tabletas de *Thevetia peruviana* como tratamiento para bajar de peso: presentación de un caso. Revista de Toxicología, 2003;20:003
- 6) Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. Septima Edición. New York: Editorial McGraw-Hill, 2000.
- 7) Lauwerys R, Toxicología industrial e intoxicaciones profesionales. Tercera edición. Barcelona: Editorial Masson, 1994
- 8) Margni R. Inmunología e inmunquímica fundamentos. Quinta edición. Buenos aires: Editorial Panamericana, 1996.
- 9) Pepper B. Ines. Apuntes de inflamación. Mecanismos de enfermedad y de reacción del organismo. Universidad de Chile. (serial online).
- 10) Verganulle N. The inflammatory response. Drug development research. 2003; 59:375-381
- 11) Reiguero G., López L., et al. Inmunología Biología y patología del sistema inmune. Tercera edición. Madrid España: Editorial Medica Panamericana; 2003.

- 12) Carroll, M.C. and Fischer, M.B. Complement and immune response. *Current Opinion in Immunology*, 1997;9:64-69.
- 13) Roitt IM, Delves PJ. *Inmunología fundamentos*. Decima edición. Argentina: Editorial médica panamericana; 2003.
- 14) Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA, Kuby J. *Inmunología*. Quinta edición. México: editorial Mac Graw hill; 2004.
- 15) Maure D, Marín V, Pinilla C, Verdugo R, Foradori M. Cinética de Reactantes de fase aguda en cirugía pediátrica. *RevChilPediatr* 2005;76 (6):580-588
- 16) Colin M. MacLeod and Oswald T. Avery. The occurrence during acute infections of a protein not normally present in the blood: III. Immunological properties of the C-reactive protein and its differentiation from normal blood proteins. *J Exp Med*.1991;73(2):191-200.
- 17) Córdoba D., Cadavid S. y Ramos J.I. Inhibidores de colinesterasas. In: Córdoba D. *Toxicología*. 2a. ed. Medellín: Ediciones Corporación de Estudios Médicos., 1991.
- 18) Jeyaratnam J. Maroni M. Organophosphorous compounds. *Toxicology* 91 (1994) 1527.
- 19) Repetto M y col. *Toxicología avanzada*. Madrid: Edirorial Diaz de Santos, 1995.
- 20) Eddleston M, Ariaratnam C A, Sjöström L, Jayalath S, Rajakanthan K, Rajapakse S, et al. Acute yellow oleander (*Thevetia peruviana*) poisoning: cardiac arrhythmias, electrolyte disturbances, and serum cardiac glycoside concentrations on presentation to hospital. *Heart* 2000;83:301-306
- 21) Jiménez D M, Martínez M V. Validación de la determinación de acetilcolinesterasa eritrocítica humana a 340 nm. *Rev Biomed* 2000; 11:161-168.
- 22) Lewis PJ, Lowing RK, Gompertz D. Automated discrete kinetic method for erythrocyte acetylcholinesterase and plasma cholinesterase. *Clin Chem* 1981; 27: 926-9.

- 23) Michel HO. An electrometric method for the determination of red blood cell and plasma cholinesterase activity. *J Lab Clin Med* 1949; 34:1564-8.
- 24) Pickering RG, Martin JG. Modifications of Michel pH method for the estimation of plasma, erythrocyte and brain cholinesterase activities of various species of laboratory animals. *Arch Toxicol* 1970; 26: 179-95.
- 25) Magnotti RA, Eberly JP, Quarm DEA, McConnell RS. Measurement of acetylcholinesterase in erythrocytes in the field. *Clin Chem* 1987; 33: 1731-5.
- 26) George PM, Abernethy MH. Improved Ellman procedure for erythrocyte cholinesterase. *Clin Chem* 1983; 29: 365-8.
- 27) Walmsley TA, Abernethy MH, Fitzgerald HP. The effect of daylight on the reaction of thiols with Ellman's DTNB reagent [5, 5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)]. *Clin Chem* 1987; 33: 1928-9.
- 28) Bandara V, Weinstein S A, White J, Eddleston M. A review of the natural history, toxicology, diagnosis and clinical management of *Nerium oleander* (common oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon* 56 (2010) 273–281.
- 29) Flores Soto ME, Segura Torres JE. Estructura y función de los receptores acetilcolina de tipo muscarínico y nicotínico. *Rev Mex Neuroci* 2005;6(4): 315-326.
- 30) Cáliz Peralto E. Intoxicación por Inhibidores de Acetilcolinesterasa (trabajo para optar por el título de Especialista en Medicina Interna). *Revista Medica Hondureña*. 1989;57.
- 31) Prall Y, Gambhir K, Ampy F. Acetylcholinesterase: An enzymatic marker of human red blood cell aging. *Life Sciences* 1998;63(3):177-184
- 32) McQueen M. Clinical and analytical considerations in the utilization of cholinesterase measurements. *Clinica Chimica Acta* 1995;237:91-105
- 33) Ferrer A. Intoxicación por plaguicidas. *ANALES Sis San Navarra* 2003;26(1): 155-171
- 34) Figueiró M, Ilha J, Pochmann D, Porciúncula L, Achaval M, Nunes D. Acetylcholinesterase inhibition in cognition-relevant brain areas of mice treated with a nootropic Amazonian herbal (Marapuama).

Phytomedicine 2010;17: 956–962

- 35) Fernandez M. SPSS . Manual Estadística en Español. Tercera edición. Madrid: Edirorial Diaz de Santos; 2000.
- 36) Fumiko Abe, Rong-Fuh Chen, Tatsuo Yamauch. Dinormonoterpenoids and their apiosylglucosides from *Thevetia peruviana*. Phytochemistry 1996;43(1):161-163
- 37) Tewtrakul Supinya, Nakamura Norio, Hattori Masao, Fujiwara Tamio, Supavita Tanomjit. Flavanone and flavonol glycosides from the leaves of *Thevetia peruviana* and their HIV-1 reverse transcriptase and HIV-1 integrase inhibitory activities. Chem. Pharm. Bull. 2002;50(5):630—635
- 38) Kohls Sarah, Scholz-Böttcher Barbara, Rullkötter Jürgen, Teske Jörg. Method validation of a survey of *Thevetia* cardiac glycosides in serum samples. Forensic Science International 2011.
- 39) Fumiko Abe, Yukiko Iwase, Tatsuo Yamauchi, Shoji Yaharaj, Toshihiro Nohara. Flavonol sinapoyl glycosides from leaves of *Thevetia peruviana*. Phytochemistry 1995;(2):577-581.
- 40) Donal M, Stewart J. Inmunología. Segunda edición. México, D. F.: Editorial El Manual Moderno; 1995.
- 41) Izquierdo Y, Pérez N, Jiménez E. Metabolismo de cardenólidos y transformación genética de *Digitalis*. Potencialidades y retos. Biotecnología Vegetal 2010;10(3): 131 - 141
- 42) Rajapakse S. Management of yellow oleander poisoning. Clinical Toxicology 2009;47:206–212