

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

83770



Casa abierta al Tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN
FITOFARMACOLOGÍA

**“EVALUACIÓN FARMACOTOXICOLÓGICA DE DIFERENTES
EXTRACTOS DE LA SEMILLA DE *Thevetia peruviana*
(Apocynaceae)”**

**COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS**

PRESENTA:
MARÍA ELENA MARTÍNEZ ENRÍQUEZ
MATRÍCULA 200182228

COMITÉ TUTORIAL
TUTOR: DR. GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO
ASESOR: DR. ALFONSO EFRAÍN CAMPOS SEPÚLVEDA
ASESORA: M EN C. VICTORIA JAYME ASCENCIO

MÉXICO, D.F.

JULIO DEL 2003

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN LO AGRADEZCO Y DEDICO CON TODO RESPETO Y CARIÑO:

- ❖ A Dios por que nunca me abandona y siempre va delante de mi abriéndome paso en la vida; por llenarme de fuerza y fortaleza en los momentos difíciles y por rodearme de personas que me guían al camino del éxito, gracias por todo lo que me has entregado.

- ❖ A mis padres: Maria Elena Enríquez Hernández y Manuel Martínez López; reciban este trabajo en respuesta a su cariño, comprensión, sacrificios y su apoyo en todo momento de mi vida tanto en lo material como espiritual.

- ❖ A mis hermanos: María de Jesús Socorro, Maricela, María Luisa, Luis Manuel, Javier y Sonia, por su comprensión, el sacrificio y el apoyo moral que me han brindado.

- ❖ A mi prometido Alejandro Servin Sánchez por su apoyo, comprensión, motivación y sobre todo por el amor que me ha demostrado, siendo un aliciente para la conclusión de la presente tesis.

- ❖ A mi maestro y asesor Dr. Alfonso Efraín Campos Sepúlveda por el impulso profesional brindado, por su atinada dirección y sabios consejos que me han permitido la conclusión de este trabajo.

- ❖ A mis asesores de tesis Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero y a la M en C. Victoria Jayme Ascencio por su apoyo, impulso, tiempo y asesoría otorgada en la realización de la presente tesis.

- ❖ A la M en C. Abigail Aguilar Contreras y al Dr. Marte Lorenzana Jiménez por el apoyo otorgado en la conclusión del presente trabajo.

- ❖ A mi guía y amigo espiritual Tiguer Dorado que sin su apoyo y consejos no seria posible la conclusión de este trabajo.

- ❖ A mis amigos que me apoyaron, ayudaron e impulsaron a seguir por este camino de estudio.

La presente tesis

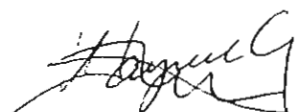
**EVALUACIÓN FARMACOTOXICOLÓGICA DE DIFERENTES
EXTRACTOS DE LA SEMILLA DE *Thevetia peruviana*
(Apocynaceae).**

Se realizó en el Laboratorio de Toxicología, Departamento de
Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM

Bajo la dirección de:


Dr. Gil Alfonso Magos Guerrero


Dr. Alfonso Efraim Campos Sepúlveda


M en C. Victoria Jayme Ascencio

ÍNDICE

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. ANTECEDENTES.....	3
1. CARACTERÍSTICAS DE la <i>Thevetia peruviana</i>	
A. Descripción botánica.....	3
B. Hábitat.....	4
C. Distribución.....	5
D. Usos etnofarmacológicos.....	5
E. Estudios toxicológicos.....	7
F. Estudios farmacológicos.....	10
G. Normatividad.....	11
III. JUSTIFICACIÓN.....	12
IV. OBJETIVOS	
A. General	13
B. Particulares	13
V. MATERIAL Y MÉTODOS	
A. Identificación taxonómica de la semilla de <i>T. peruviana</i>	14
B. Obtención de los extractos.....	14
C. Determinación de la DL ₅₀ aguda de la semilla suspendida y los extractos obtenidos de la semilla de <i>Thevetia peruviana</i> .	
1. Animales.....	14
2. Determinación de la DL ₅₀	15

3. Análisis estadístico.....	16
D. Estudios cardiotóxicos	
1. Animales	16
2. Patrón electrocardiográfico.....	16
3. Registro electrocardiográfico	17
4. Análisis de resultados.....	17
E. Estudios <i>in vitro</i> sobre órganos aislados	
1. Animales	17
2. Determinación de la fase del ciclo estral.....	17
3. Aislamiento y montaje de útero.....	18
4. Aislamiento y montaje de íleon	18
5. Aislamiento y montaje de vejiga	19
6. Respuesta contráctil	20
7. Análisis estadístico	21
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
1. Extracción	
A. Obtención e identificación de la semilla de <i>T. peruviana</i>	22
B. Características físicas y rendimiento de los extractos secos.....	22
2. ESTUDIOS <i>In vivo</i>	
A. Manifestaciones de toxicidad (signos y síntomas)	23
B. Determinación de la DL ₅₀	29
C. Cardiotoxicidad.....	30
3. ESTUDIOS <i>in vitro</i>	

A. Efectos sobre el músculo uterino.....	37
B. Efectos sobre músculo intestinal.....	37
C. Efectos sobre músculo de vejiga.....	50
VII. CONCLUSIONES.....	60
VIII. CONSIDERACIONES	61
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
ANEXOS	
A. Publicación Internacional.....	67
B. Congresos.....	71

EVALUACIÓN FARMACOTOXICOLÓGICA DE DIFERENTES EXTRACTOS DE LA SEMILLA DE *Thevetia peruviana* (Apocynaceae).

I. INTRODUCCIÓN

Se estima que en el planeta tierra existen alrededor de 250,000 plantas superiores con un límite inferior de 215,000 y superior de 600,000. De estas, solo al 6 % se le ha explorado la actividad biológica y al 15 % se le ha evaluado fitoquímicamente.^{1,2} No obstante la alta correlación entre los usos etnomédicos y la actividad descrita para algunos de los componentes aislados de las plantas medicinales, la investigación científica aún es limitada. Se carecen de estudios dirigidos que evalúen las múltiples propiedades etnomédicas, conferidas a un 10 % del total de las plantas superiores.¹

Debido al amplio consumo mundial de plantas con fines terapéuticos, países como Alemania, Francia, Inglaterra, Suiza e Italia, han trabajado para generar formulaciones herbolarias que están abriendo un nuevo mercado de productos de origen natural, llamados fitofármacos. Sin embargo, hoy en día, para una gran cantidad de preparados herbolarios, no se cuenta con los estudios preclínicos y menos aún los estudios clínicos que permitan reconocer científicamente sus propiedades medicinales y tóxicas. Esto demuestra que la población en general, consume indiscriminadamente las plantas como remedio terapéutico, aún más en países como el nuestro, que carecen de un sistema normativo de regulación, el riesgo de toxicidad se incrementa.³ Probablemente ante la necesidad de mejores recursos terapéuticos la población mexicana tanto de zonas rurales como urbanas, continúan utilizando plantas para mitigar uno o varios de los síntomas propias de las enfermedades, esto ha llevado a que en la República Mexicana la herbolaria sea una auténtica opción de "salud", por lo que es común adquirir en mercados, tianguis, negocios naturistas, etc, todo tipo de plantas con fines medicinales para tratar diversas enfermedades como: la

diabetes, el cáncer, o con fines estéticos, como plantas utilizadas para reducir de peso.⁴

Cabe aclarar que la obesidad (estado corporal caracterizado por depósitos y almacenamiento excesivo de grasa),⁵ es una de las alteraciones metabólicas más frecuentes que representa un problema grave de salud pública, ya que constituye un factor de riesgo para diversas alteraciones metabólicas que dan lugar a enfermedades crónico-degenerativas, como la diabetes *mellitus*, la hipertensión arterial, las hiperlipidemias, el cáncer y las cardiopatías. En México, las principales causas de muerte ya no son las enfermedades infecciosas, sino las crónico degenerativas, entre ellas las enfermedades del corazón. Estas patologías se han incrementado notablemente en diversos países y esto ha propiciado que se busquen alternativas para el control de la obesidad.⁶ Para esto se ha recurrido a la auto prescripción, remedios médicos como los masajes, dietas, fármacos (anfetaminas, agonistas serotoninérgicos, tratamientos hormonales) y remedios naturistas. Esta automedicación propicia un consumo indiscriminado de plantas medicinales, en dosis inadecuadas y por tiempos prolongados, lo que puede causar intoxicaciones, envenenamientos, alteraciones orgánicas e incluso la muerte.⁷

En los últimos años, la semilla de *T. peruviana* llamada comúnmente codo de fraile, se ha utilizado para reducir el peso corporal, sin embargo su uso empírico e indiscriminado ha propiciado numerosas intoxicaciones con resultados fatales.⁷ La evidencia actual, parece indicar que el efecto anorexigénico, aparentemente inducido por la semilla, podría originarse por la misma intoxicación, ya sea causando diarreas frecuentes, aumentando el catabolismo de las grasas, o incluso causando anorexia tóxica. Sin embargo, en la literatura consultada, no existe evidencia experimental toxicológica y farmacológica de la semilla de *T. peruviana* en animales que avalen lo anterior. Además, la cantidad de principios tóxicos aunado al manejo terapéutico inexperto de esta semilla, hace que su uso sea extremadamente peligroso para la salud y la vida de las personas que lo ingieren. Por lo anterior, es necesario y relevante, estudiar los efectos

farmacológicos y toxicológicos de los diferentes extractos de la semilla *T. peruviana* en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

II. ANTECEDENTES

1. Características de *Thevetia peruviana*

A. Descripción botánica

La planta conocida como codo de fraile pertenece a la familia de las Apocynaceae; al genero: *Thevetia*; y a la especie *peruviana*. Esta planta, es un arbusto de 5 a 9 m de alto. Con peciolo no siempre bien definidos, que miden hasta 0.5 cm de largo, láminas linear-lanceoladas de 6 a 13 cm de largo y de 0.5 a 1.3 cm de ancho, ápice agudo, base largamente atenuada, venación pinnada, por lo regular visible en ambas caras, los nervios laterales evidentes, algo realzados, a veces de color oscuro, con frecuencia ruguloso, envés liso, glabro o piloso sobre las nervaduras. Las inflorescencias en cimas terminales densas, umbeliformes, de numerosas flores, pedúnculos toscos de 1cm, pedicelos robustos, cortos de 1 cm de largo; segmentos del cáliz oblongos u ovado-lanceolados, de 7 a 9 mm de largo. La corola de las flores presenta un color amarillo brillante que miden de 8 a 10 cm de largo, tubo de 2 a 2.5 cm de largo y de unos 2.5 mm de diámetro, garganta cónico-campanulada, de 1.5 a 2 cm de largo y alrededor de 1 cm de ancho. Los lóbulos obovado-dolabriformes, extendidos, de 4 a 5.5 cm de largo; anteras ampliamente oblongas, de alrededor de 1.5 mm de largo. El ovario levemente inmerso en un disco anular. El fruto drupáceo, subesférico a oblato en la juventud, posteriormente volviéndose oboveideo-deprimido y también levemente comprimido, hasta de 4 cm de largo y 6 5 de ancho, pedicelo grueso, rígido, hasta de 2.5 cm de largo, hueso obtrulado en vista frontal, hasta de 5 cm de ancho, de color pardo claro; El fruto contiene de 2 a 4 semillas. de color blancuzco con una película muy delgada protegiéndola (Fig 1).^{8, 9 10}

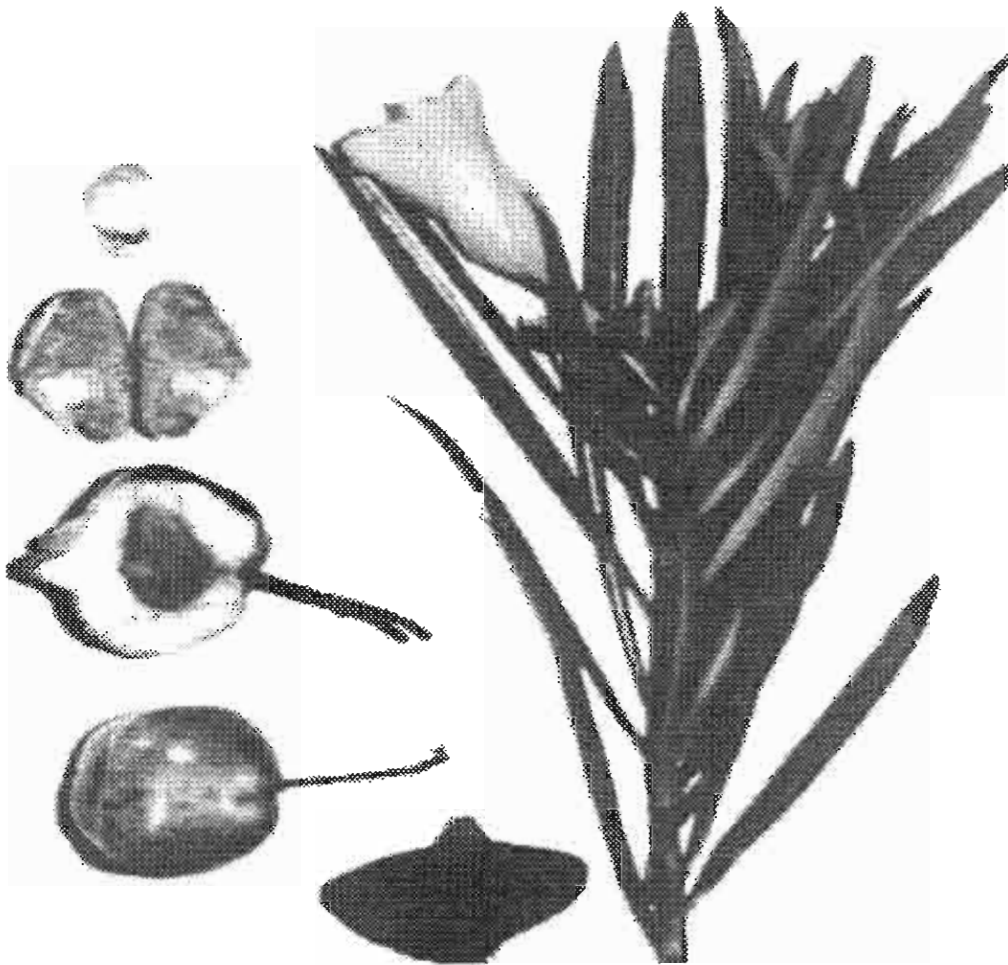


Fig. 1 La *Thevetia peruviana* originaria de América tropical, es un arbusto o árbol pequeño, que presenta flores de color amarillo-anaranjado y su fruto contiene dos semillas.

B. Hábitat

Forma parte del bosque tropical caducifolio, en donde la *T. peruviana* es más frecuente en comunidades secundarias. El bosque tropical caducifolio presenta abundante vegetación primaria, principalmente encontramos especies como *Juniperus*, *Ficus*, *Ceiba* y *Quercus* que regularmente acompañan a la *T. peruviana*. La vegetación secundaria de bosque tropical refleja pastoreo intenso sobre brechas volcánicas. El arbusto de *T. peruviana*, cultivado o semicultivado en el solar de una casa, crece en suelo tepetatoso; plantado en suelo arenoso.

Florece y fructifica principalmente en la época lluviosa, de junio a septiembre. Se encuentra hasta los 2300 metros sobre el nivel del mar.^{8, 9, 10}

C. Distribución

En México se distribuye en regiones tropicales y subtropicales de Baja California, Campeche, Chiapas, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosí, Tabasco, Veracruz y Yucatán, en donde se le han asignado distintos nombres comunes (Tabla I). En América del sur se localiza en las zonas tropicales de Brasil, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia, Paraguay y al Norte de Argentina.⁸⁻¹¹

D. Usos etnofarmacológicos

En países como la India, Tailandia, Brasil y México, desde hace muchos años esta planta ha sido utilizada como remedio herbolario.⁴⁻⁷ Por ejemplo, en México en el periodo prehispánico, el látex de este arbusto fue utilizado para el tratamiento de la sordera, la sarna y en úlceras de la piel, así como en rituales-religiosos; las hojas se emplean como anestésico dental; Las semillas ("huesos") se han utilizado como amuletos y también para la elaboración de pequeños instrumentos musicales de percusión. Actualmente, a la semilla se le da uso empírico en diferentes padecimientos como anestésico local, abortivo, antineurálgico, antiartrálgico, para el tratamiento de las hemorroides, del acné y para reducir el peso corporal.^{7, 11-15} Sin embargo no existen estudios farmacológicos formales que fundamenten tales usos terapéuticos.

TABLA I. Nombres comunes de la *Thevetia peruviana*⁸ en diferentes estados de la República Mexicana

Akitz (Yucatán)
Cabalonga de la huasteca
Calushnan-quini (lengua totonaca).
Came (Guerrero, Michoacán)
Campanilla (Guerrero, Morelos y Yucatán)
Codo de fraile
Cojón de gato (Veracruz).
Chilca (Chiapas).
Chilindrón (Chiapas)
Flor de campana (Tabasco)
Guayapol (San Luis Potosí)
Guayocule (Hidalgo).
Naranja amarillo (San Luis Potosí).
Narciso amarillo (Jalisco).
Ojo de águila (Veracruz)
Palo de San Antonio (San Luis Potosí)
Palo fortuna (Baja California Sur).
San Diego (San Luis Potosí).
San Nicolás (San Luis Potosí).
Solimán (Veracruz).
Tzenantzuch (San Luis Potosí).
Venenillo (Oaxaca).
Yambigo (Oaxaca).
Yoyotli (Guerrero, Veracruz).

E. Estudios toxicológicos

Los estudios toxicológicos de *T. peruviana* han demostrado que todas las partes de la planta presentan principios activos tóxicos, principalmente de naturaleza glucosídica. Estos se encuentran distribuidos en las hojas (0.07%), en el fruto (0.045 %), el látex (0.036 %) y preponderantemente en la semilla (4.8 %). Entre los glucósidos que se han aislado y caracterizado de la planta están: thevetina A (que contiene canogenina, tevetosa y gentiobiosa) y tevetina B (digitoxenina, gentiobiosa, tevetosa y neriifolina), además de otros compuestos como tevefolina, acetilnerifolia y teveneriina. Del látex se han aislado terpenoides y acetato de β -amirina.^{12, 16, 17} Los glucósidos son sustancias con núcleo esteroidal que poseen importantes acciones sobre el corazón, presenta además una porción del azúcar que contiene de 3 a 5 moléculas de monosacáridos, por lo general metilpentosa y desoxiazúcares. La glicona esteroidal, presenta en su estructura diversos hidroxilos, uno de ellos en el carbono 14 y otro en el carbono 3, en el cual siempre va unida la porción de azúcar (Fig. 2).¹⁸⁻¹⁹

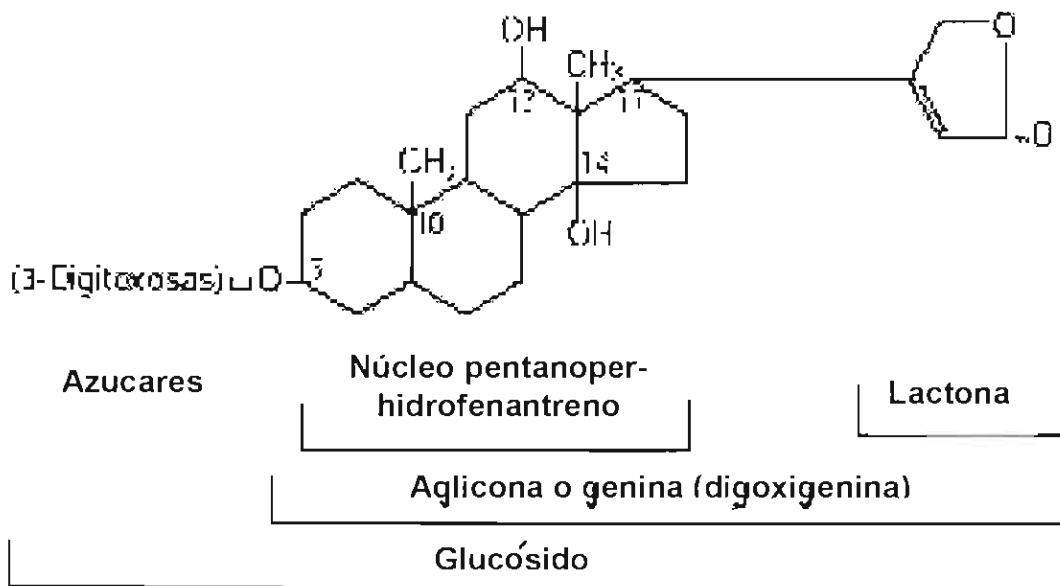


Fig. 2 Estructura de los glucósidos cardioactivos. Presentan un núcleo esteroidal con un anillo de lactona de cinco miembros en posición 17 (proporciona la actividad) y una serie de azúcares en posición 3.

La ingesta de *T. peruviana*, ya sea accidental o intencional, ha sido causa de muerte. Desde la década de los 70s, se han presentado casos clínicos de cardiotoxicidad, acontecido en personas que habitan diversas áreas rurales, por ejemplo, en Texas, USA. se informó de 303 casos de intoxicación por dicha planta, en Australia, entre 1972-78 se reportó que el 27 % del total de las intoxicaciones presentadas en este periodo; en Jaffna en India, represento el 10 % de las muertes, principalmente de niños y mujeres jóvenes. Casos similares, se han identificado en Hawai, África y en otras partes del mundo.²⁰⁻²⁸

Por otra parte estudios de las manifestaciones clínicas de 170 casos reportados por intoxicación por *T. peruviana*, señalan la presencia de vómitos, cambios en el electrocardiograma (ECG), bloqueo aurículo-ventricular (AV), bradicardia, vértigo o desvanecimiento. Otras manifestaciones menos comunes fueron: depresión de la onda T, diarrea, pulso ectópico, dolor abdominal, dolor oral y palpitaciones, en la tabla II se muestran los porcentajes para cada una de estas manifestaciones.^{17, 29, 30} Además de lo anterior, también se han encontrado alteraciones electrolíticas ocasionadas por altas concentraciones plasmáticas de glucósidos cardíacos provenientes de la planta. Es importante mencionar que las manifestaciones clínicas sobre el corazón, resumidos en la tabla III, son similares a las presentadas por la intoxicación por sustancias de uso clínico conocidas como digitálicos.¹⁹ Los cuales pueden causar la muerte por su acción en el corazón. En la tabla II se resumen las acciones que producen los digitálicos sobre las fibras musculares y el sistema de conducción cardíaco y en la tabla IV, los efectos producidos sobre otros órganos.^{19, 30-32}

TABLA II. Manifestaciones clínicas de 170 casos reportados por intoxicación de la semilla de *T. peruviana*¹⁷

Manifestaciones clínicas	Frecuencia (%)
Vómitos	68.2
Cambios en el ECG	61.8
Bloqueo AV	52.4
Bradicardia	49.5
Vértigo o desvanecimiento	35.9
Menos frecuentes	
Depresión de la onda T	23.8
Diarrea	22.3
Pulso ectópico	6.6
Dolor abdominal	5.9
Dolor oral	4.1
Palpitaciones	2.9

TABLA III. Efectos de los digitálicos sobre el corazón¹⁹

1. Incremento de la fuerza de contracción (efecto inotrópico positivo).
2. Disminución de la frecuencia cardiaca (efecto cronotrópico negativo)
3. Acortamiento del *P.R. de aurícula y del ventrículo.
4. Exaltación del automatismo auricular, nodo *AV y ventricular
5. Depresión temprana de la excitabilidad de aurícula y tardía del ventrículo
6. Depresión temprana de la velocidad de conducción auricular y tardía ventricular.
7. Depresión progresiva de la conducción AV hasta bloqueo total

*P.R. :periodo refractario; AV: nodo auriculo-ventricular

TABLA IV. Efectos de los digitálicos sobre otros órganos¹⁹

Gastrointestinales	Sistema Nervioso Central	Otros
Anorexia	Cefalea	Visión borrosa
Náuseas	Fatiga	Ginecomastia
Vómitos transitorios	Somnolencia	
Diarrea	Debilidad muscular	
Dolor abdominal	generalizada	
	Desorientación	
	Confusión	
	Alucinaciones	
	Convulsiones (rara vez)	

F. Estudios farmacológicos

Existe poca evidencia experimental sobre la actividad farmacológica de la semilla de *Thevetia peruviana*, sin embargo se han reportado evidencias sobre algunos de los componentes de las Thevetias, por ejemplo, se ha reportado que la Thevetina A, además de sus efectos sobre el corazón tiene un efecto estimulante sobre el intestino y la vejiga urinaria, probablemente la actividad diarreica y diurética se deba a la presencia de los glucósidos presentes en estas plantas, efectos similares a los producidos por digitálicos.²¹

Aun cuando no se han realizado suficientes estudios toxicológicos sobre la *T. peruviana*, se tiene evidencia de que la thevetina A, aislada de *Thevetia neriifolia*, produce sobre el corazón, acciones similares a los que produce esta sustancia aislada de *T. peruviana*.^{26, 31} Estudios realizados en la India en los 30s', la semilla de *T. peruviana* mostró efectos terapéuticos sobre el corazón, análogos a los producidos por la digitoxina y la ouabaina, sin embargo, debido a la gran toxicidad de esta planta no se utiliza con fines terapéuticos sobre el corazón.²⁰

G. Normatividad

El consumo de preparados a partir de plantas medicinales (extractos, tinturas, infusiones, etc.) es una práctica arraigada en nuestra sociedad, la cual, se ha incrementado últimamente debido a diferentes razones, entre las más importantes pueden mencionarse: la tendencia a la automedicación, inducida en algunos casos por propagandas engañosas; prácticas de medicina alternativa y el empleo popular o folklórico de especies no solo autóctonas, sino también de otras introducidas comercialmente. La evidencia de que la *Thevetia peruviana* es una planta tóxica, permite considerarla entre las especies no aptas para el consumo humano y de acuerdo a esto, el uso de esta especie debe ser regulado por las normas oficiales. Actualmente existe un organismo nacional con competencia como es, la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica (ANMAT), quién se encarga de emitir las normas aclaratorias y complementarias correspondientes, teniendo en cuenta las recomendaciones de la OMS. con respecto al control de la calidad,³³ Sin embargo, este tipo de problemas deben ser regulados por las normas oficiales mexicanas NOM-005-RECNAT-1997 (que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de corteza, tallos y plantas completas de vegetación forestal) y NOM-009-RECNAT-1997 (que establece los procedimientos, criterios y especificaciones para el aprovechamiento, transporte y almacenamiento de látex y otros exudados de vegetación forestal).^{34, 35}

III. JUSTIFICACIÓN

Los antecedentes de *T. peruviana* encontrados en la literatura científica consultada, indican que: 1) la semilla llamada comúnmente codo de fraile, se utiliza con propósitos medicinales en varios estados de la República Mexicana; 2) la búsqueda de la reducción del peso corporal en personas obesas, ha incrementado notoriamente su consumo; 3) existen informes clínicos de numerosas intoxicaciones fatales, producidas por el consumo de la semilla; 4) los estudios fitoquímicos señalan la presencia de compuestos glucosídicos, con características químicas análogas a los digitálicos y 5) se carece de evidencia experimental toxicológica y farmacológica, que corrobore las propiedades conferidas a la planta. Creemos que la aportación de información experimental, facilitaría la integración del conocimiento, y la explicación fundamentada del alto grado de peligrosidad que adquiere la gente que consume empíricamente esta planta. Por estas razones, la presente tesis pretende estudiar preclínicamente, los efectos farmacológicos y toxicológicos de diferentes extractos de la semilla *T. Peruviana*, en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*, para obtener información relevante, que permita iniciar la caracterización fármaco toxicológica de la planta y diferenciar los efectos tóxicos de posibles efectos terapéuticos.

IV. OBJETIVOS

A. GENERAL

Determinar los efectos farmacológicos y toxicológicos de la administración aguda de la semilla completa suspendida y de los extractos secos obtenidos con acetato de etilo, metanol y agua de la semilla de *Thevetia peruviana*.

B. PARTICULARES

- Adquisición e identificación de la semilla de *T. peruviana*
- Obtener los extractos secos con acetato de etilo, metanol y agua de la semilla de *T. peruviana*.
- Obtener el efecto letal (DL₅₀) y las manifestaciones de toxicidad producidos por la semilla y los diferentes extractos secos, en el ratón.
- Estudiar la toxicidad aguda de la semilla y los extractos sobre el registro electrocardiográfico de la rata (ECG).
- Determinar el efecto de los extractos sobre el músculo liso uterino, de la vejiga y del íleon de rata.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. IDENTIFICACIÓN DE LA SEMILLA DE *T. peruviana*.

La semilla será obtenida del mercado de la Merced, en México, Distrito Federal y se identificará en el Herbario del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del IMSS.

B. OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS

Se eliminó el endocarpo de la semilla fresca de *T. peruviana* y se sometió a un proceso de molienda a 3000 rpm durante 30 segundos. Los extractos fueron obtenidos por un proceso de maceración dejando reposar durante 48 hr. 100 g de semilla con 200 ml de disolventes de polaridad creciente: acetato de etilo, metanol y agua. Para cada uno de los disolventes mencionados, se repitió la maceración en dos ocasiones. Una vez transcurrido el periodo de maceración, se obtuvo el sobrenadante, el cual fue centrifugado a 3000 rpm a 10 °C, durante 10 min (Centrifuga Sorvall Superspeed RC-2). Todos los disolventes orgánicos se eliminaron por destilación con un rotavapor a presión reducida y el acuoso por un proceso de liofilización (Virtis modelo 10-155, provista de una bomba de vacío CGP134 Koblenz). Los extractos secos fueron pesados, se calculó el rendimiento, se etiquetaron y fueron mantenidos en refrigeración.^{36, 37}

C. DETERMINACIÓN DE LA DL₅₀ AGUDA DE LA SEMILLA COMPLETA SUSPENDIDA Y DE LOS EXTRACTOS SECOS DE *Thevetia peruviana*.

1. Animales

Se utilizaron ratones Taconic, machos, adultos, de 25 a 30 g de peso corporal, obtenidos de la Colonia del Bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron mantenidos en las mismas condiciones ambientales en cuanto a temperatura (20 ± 3 °C), humedad e iluminación (ciclo luz-oscuridad 12X12) y con acceso libre al agua y al alimento (purina Chow).

2. Determinación de la DL₅₀

Con el propósito de ubicar la susceptibilidad a los efectos tóxicos y letales de la semilla de *T. peruviana*, se realizaron experimentos utilizando dos ratones por dosis a los cuales se les administro por vía oral dosis de 1, 3, 10, 30, 100. y 1000 mg/kg de la semilla completa suspendida y de los extractos secos (acetato de etilo, metanólico y acuoso) en un volumen de 0.1 ml/10 g de peso corporal, utilizando como vehículo solución salina para la los extractos sólidos y para el oleoso aceite de maíz.

Los animales se colocaron en jaulas individuales y se observaron continuamente durante las primeras cuatro horas después de la administración de los diferentes extractos secos, se registro la letalidad ocurrida a las seis y a las 24 hr. Los datos obtenidos en este estudio preliminar permitieron identificar los signos y síntomas de toxicidad aguda, así como seleccionar el esquema de dosis definitivo para obtener la DL₅₀.

Para la siguiente etapa experimental, se utilizo un lote de 60 ratones con las características señaladas anteriormente y clínicamente sanos. Los animales se distribuyeron aleatoriamente en seis grupos de 10 ratones cada uno. Con base en el estudio preliminar se diseñó un esquema de prueba, empleando cinco niveles de dosis espaciadas logarítmicamente. Uno de los grupos se utilizó como grupo testigo y solamente recibió el vehículo por la misma vía.

Los animales fueron observados continuamente durante las primeras cuatro horas, en este lapso de tiempo se tomo la temperatura rectal antes y a los 30, 60 y 120 min después de la administración de la semilla y de los extractos secos, se registro la letalidad ocurrida cada 24 hr., durante 30 días.^{38,-39}

3. Análisis estadístico:

El cálculo de la DL_{50} para la semilla suspendida fue realizado por el método de Millier & Tainter y para cada uno de los extractos por el método de Litchfield & Wilcoxon con los límites de confianza al 95 %.^{40, 41}

D. ESTUDIOS DE CARDIOTOXICIDAD

1. Animales:

Para cada uno de los extractos se utilizaron 6 ratas de la cepa Wistar, machos de 250 a 300 g y que se mantuvieron en condiciones experimentales similares a las mencionadas anteriormente y clínicamente sanos.

2. Patrón electrocardiográfico normal

Para la lectura del electrocardiograma (ECG) se tomaron en cuenta la siguiente información: el ECG habitual es un trazo registrado de las variaciones del potencial eléctrico recogido en la superficie del cuerpo. Los cambios de este potencial eléctrico durante un ciclo cardíaco describe una serie de ondas que ascienden o descienden en relación con la línea basal (nivel isoeléctrico). Reciben los nombres de onda P (activación eléctrica de la aurícula; despolarización), complejo QRS (despolarización de los ventrículos) y onda T (representa el fin de la despolarización o la repolarización de ambos ventrículos). Además, tenemos el intervalo PR o PQ que representa el tiempo requerido para la despolarización auricular y la conducción del impulso a través del nodo aurículo-ventricular (AV), el intervalo QR, también llamado tiempo de activación ventricular, corresponde a la propagación de la onda de despolarización desde el endocardio hasta la superficie epicárdica y el segmento ST que representa un periodo de inactividad eléctrica, después de que la totalidad del miocardio se despolarizo. Con la información anterior se pueden identificar las alteraciones que se presentan a nivel del corazón.⁴²

3. Registro electrocardiográfico

Los animales se anestesiaron con la administración intraperitoneal de una mezcla de cloralosa- uretano (500 mg-8 g); en un volumen de 1 ml por cada 100 g de peso corporal. Se realizó una traqueostomía y se introdujo una cánula en la tráquea para mantener la ventilación. La rata se fijo en decúbito dorsal y se colocaron electrodos bipolares subcutáneos colocados en derivación uno sobre los miembros anteriores y posteriores. La actividad electrocardiográfica se registro mediante un amplificador acoplado a un polígrafo Grass 79D, a una velocidad del papel de 25 a 50 mm/seg. ^{43, 44}

4. Análisis de resultados

En cada registro se determinaron los cambios en el ECG de las ratas que recibieron la semilla suspendida (500 mg/kg) y los extractos de acetato de etilo (4000 mg/kg), metanólico y acuosos (500 mg/kg).

E. ESTUDIOS *In vitro* SOBRE ORGANO AISLADO

1. Animales

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar de 250-300 g para la preparación de útero (hembras), vejiga e íleon (machos). Los animales se mantuvieron en las mismas condiciones ambientales de temperatura (20 ± 3 °C), humedad e iluminación (ciclo luz oscuridad 12 X 12), provistos de alimento y agua *ad libitum*.

2. Determinación de la fase del ciclo estral

Previo al sacrificio y obtención del útero, se realizó un frotis vaginal para determinar en que fase del ciclo estral se encontraban (proestro, estro, metaestro ó diestro). Con una pipeta Pasteur se introdujo 0.1 ml de solución fisiológica salina al 0.9 % en la vagina de las ratas, se extrajo el líquido y la muestra obtenida se colocó en un porta objetos y se observó al microscopio 40 X (Swift-741580). La

fase se determinó por las características morfológicas que presentaban las células epiteliales y solo se emplearon las ratas que se encontraban en fase de estro.⁴⁵

3. Aislamiento y montaje del útero

Los animales en fase de estro se pesaron y se sacrificaron por dislocación cervical, se disecó el útero y se colocó en una caja de Petri con solución Ringer De Jalon (composición en mM: NaCl 153, KCl 5.6, glucosa 2.7, NaHCO₃ 5.9, CaCl₂ 100), se eliminó del órgano el tejido adiposo y conectivo. Se tomaron segmentos de 1.5 a 2 cm de longitud. Estos se colocaron en cámaras para órgano aislado de 30 ml que contenía la solución Ringer De Jalon, burbujeada con carbógeno (5 % de CO₂ y 95 % de O₂), mantenidos a una temperatura constante de 32 °C y un pH de 7.4. Cada segmento se sometió a una tensión inicial de 1 g y se perfundieron con solución nutriente durante quince minutos, antes de la exposición a los extractos (Fig 3)^{45, 46}

4. Aislamiento y montaje del ileon

Los animales se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical y el ileon se disecó e inmediatamente se colocaron en una caja de Petri con solución de Krebs con la siguiente concentración mM: NaCl 118, KCl 4.7, glucosa 11, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2 y KH₂PO₄ 1.3. El ileon se limpió del tejido adiposo y conectivo y se cortaron segmentos de aproximadamente 1.5-2 cm de longitud, los cuales fueron colocados en cámaras para órgano aislado de 30 ml con solución de Krebs burbujeada con carbógeno (5 % de CO₂ y 95 % de O₂), mantenidos a un pH de 7.4 y a una temperatura de 37 °C. Cada segmento se sometió a una tensión inicial de 2 g y se perfundieron con solución nutriente durante quince minutos, antes de la exposición a los extractos (Fig 3).^{46 47}

5. Aislamiento y montaje de la vejiga

Los animales se pesaron y sacrificaron por dislocación cervical. La vejiga se aisló y se colocó en una caja de Petri que contenía solución de Krebs en concentraciones mM NaCl 118, KCl 4.7, glucosa 11, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2 y KH₂PO₄ 1.3. La vejiga se limpió del tejido adiposo y se tomaron segmentos transversales (detrusor superior e inferior y trigono), los cuales se colocaron en una cámara para órgano aislado de 30 ml que contenía la solución de Krebs burbujeada con carbógeno (5 % de CO₂ y 95 % de O₂), se mantuvieron a un pH de 7.4 y a una temperatura de 37 °C. Cada segmento se sometió a una tensión inicial de 2 g y se perfundieron con solución nutriente durante quince minutos; antes de la exposición a los extractos (Fig 3).^{46, 47}

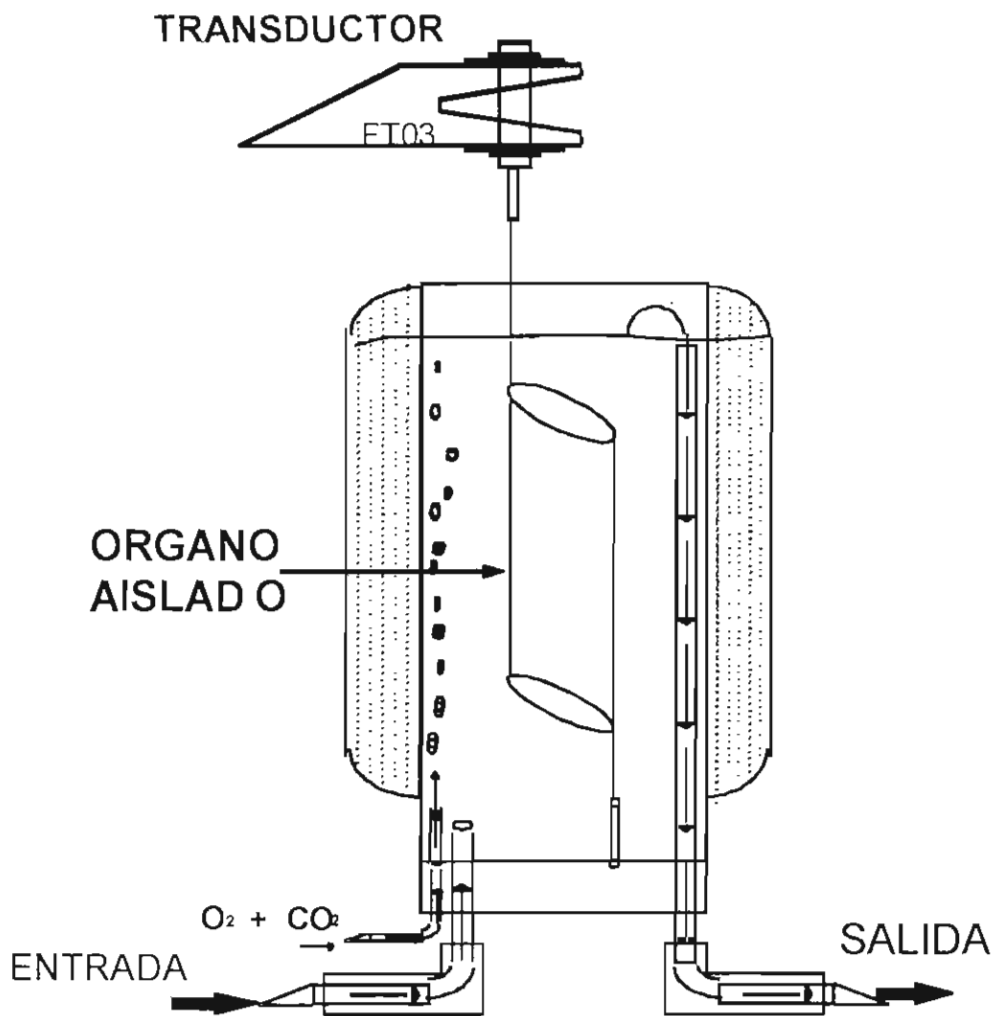


Fig 3. Representación general de la preparación de músculo liso (útero, íleon o vejiga), perfundido con solución nutritiva, burbujeada con carbógeno, mantenido a una temperatura de 32 o 37 ° C y a un pH de 7.4.

6. Respuesta Contráctil

La actividad basal y la respuesta contráctil del músculo liso uterino, de la vejiga y del íleon, inducida por los diferentes extractos, se registró a través de un transductor FTO3 conectado a un polígrafo Grass 79D. Las condiciones fisiológicas para cada uno de los tejidos se resumen en la tabla V.

En todos los casos, se realizaron curvas dosis respuesta a la acetilcolina a las siguientes concentraciones 1×10^{-6} , 1×10^{-5} , 1×10^{-4} y 1×10^{-3} y en presencia de los diferentes extractos (metanólico y acuoso a una concentración de 666.66 $\mu\text{g/ml}$ y para el acetato de etilo 1000 $\mu\text{g/ml}$).⁴⁹

La actividad espontánea del músculo liso o la inducida por las diferentes concentraciones de acetilcolina se determinó de la siguiente manera: para el útero la respuesta se cuantificó como el área bajo la curva (ABC), para ello, se utilizó un método planimétrico (Burell, Corp); para íleon y vejiga la respuesta se cuantificó en gramos de tensión.

TABLA V. Condiciones fisiológicas para músculo de útero, íleon y vejiga⁴⁶

Órgano	Solución nutritiva	Segmento (cm)	Temperatura (°C)	Tensión inicial (g)
Útero	De Jalon (mM): Na Cl: 153 KCl: 5.6 Glucosa: 2.7 NaHCO ₃ : 5.9 Ca Cl ₂ : 100	2-3	32	1
Íleon	Krebs (mM) Na Cl: 118 KCl: 4.7 Glucosa: 11 NaHCO ₃ : 25 Ca Cl ₂ : 2.5 MgCl ₂ : 1.2 KH ₂ PO ₄ : 1.3	1.5-2	37	2
Vejiga	Krebs	0.8- 1	37	2

7. Análisis estadístico

Los resultados se sometieron a un análisis de varianzas (ANOVA) y a la prueba de t de Student y se calculó el promedio y el error estándar (E.E.), considerándose estadísticamente significativos los valores de $p < 0.05$.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Extracción

A. Obtención e identificación de la semilla de *T. peruviana*

La semilla fue obtenida del mercado de la merced, en la Ciudad de México, Distrito Federal de un lote de procedencia de la Costa chica de Guerrero la cual fue identificada por la Dra. Abigail Aguilar Contreras, jefa del Herbario del Centro Médico Nacional Siglo XXI, del IMSS como:

Familia: Apocinaceae

Genero: *Thevetia*

Especie: *peruviana*

Número de clasificación: 14524

B. Características físicas y rendimientos de los extractos

Las características físicas y el rendimiento para cada uno de los extractos secos obtenidos de la semilla de *Thevetia peruviana* se describen en la tabla VI. Los rendimientos se expresan en por ciento de los extractos secos obtenidos a partir de 100 g de semilla. La extracción por maceración con acetato de etilo, permitió obtener el mayor rendimiento seguido por metanol y por último el acuoso.

TABLA VI Características físicas y rendimiento de los extractos secos obtenidos de la semilla de *Thevetia peruviana*

Disolvente	Acetato de etilo	Metanol	Agua
Estado	Líquido	Sólido	Sólido
Aspecto	Oleoso	Polvo	Polvo
Color	Amarillo	Amarillo claro	Café claro
Rendimiento (%)	31.9	2.3	1.9

2. ESTUDIOS *in vivo*

A. Manifestaciones de toxicidad (signos y síntomas)

Las manifestaciones de toxicidad que se presentaron en los ratones que recibieron los extractos metanólico y acuoso fueron: temblor, aumento de la base de sustentación, relajación, taquipnea, hipotermia, retención urinaria, mioclonias, convulsiones generalizadas y muerte, tales efectos fueron claramente dependientes de la dosis. Estos efectos se observaron en mayor frecuencia con el extracto metanólico.⁵⁰ Los resultados anteriores confirman los efectos inducidos por la semilla completa, realizados por nuestro grupo de trabajo.⁴⁰ Sin embargo el período de latencia de las manifestaciones de toxicidad se presentó aproximadamente a los 10 min en el caso de la semilla completa y para los extractos secos fue entre 2 y 4 hr. después de la administración y la muerte en los dos casos después de 24 hr. En el caso de los efectos del extracto seco de acetato de etilo los animales, la frecuencia e intensidad de las manifestaciones de toxicidad fueron significativamente menores aun con dosis muy altas (2000-4000 mg/kg), los efectos mas consistentes fueron: diarrea, ataxia, sangrado en heces. Los resultados anteriores se resumen en la tabla VII.

La modificación de la temperatura corporal fue otra manifestación de toxicidad; la semilla suspendida y los extractos metanólico y acuoso produjeron un efecto hipotérmico significativo ($p < 0.05$) dosis dependiente, además podemos observar que este efecto se presenta más rápidamente (30 min) que para los extractos secos (120 min). (Fig 4, 6 y 7). En contraste en el caso del extracto seco de acetato de etilo no se observaron cambios importantes en la temperatura (Fig 5).

Estas manifestaciones de toxicidad pueden ser causadas por los efectos directos de los glucósidos contenidos en la semilla y los extractos secos metanólico y acuoso, sobre el tubo digestivo, pero también es el resultado de

acciones en el sistema nervioso central (SNC), incluyendo la estimulación de quimiorreceptores. El sistema parasimpático como el simpático se ven afectados y ocurre a todo lo largo de los intervalos de dosificación terapéutica y tóxica. Esta acción implica sensibilización de los barorreceptores, estimulación vagal central y facilitación de la transmisión muscarínica y adrenérgica.¹⁹

TABLA VII. Porcentaje de frecuencia de las manifestaciones de toxicidad inducidos por los extractos secos de la semilla de *Thevetia peruviana*

Manifestación de toxicidad	Metanólico	Acuoso	Acetato de etilo
Diarrea	*60	50	20
▲ Base de sustentación	*100	100	0
▼ la fuerza muscular	*100	100	0
Taquipnea	*100	100	10
Mioclónicas	*60	50	0
Convulsiones	20, últimas dosis	0	0
Letalidad (latencia)	2-6 hr.	6-7 hr. y en algunos casos más de 3 días	> 3 días
Distensión de la vejiga	100	60	0
Otros	Contracción abdominal	Exoftalmos	Contracción abdominal

*Manifestaciones que se presentaron a partir de la dosis de 62.5 mg/kg; n = 10 animales por dosis

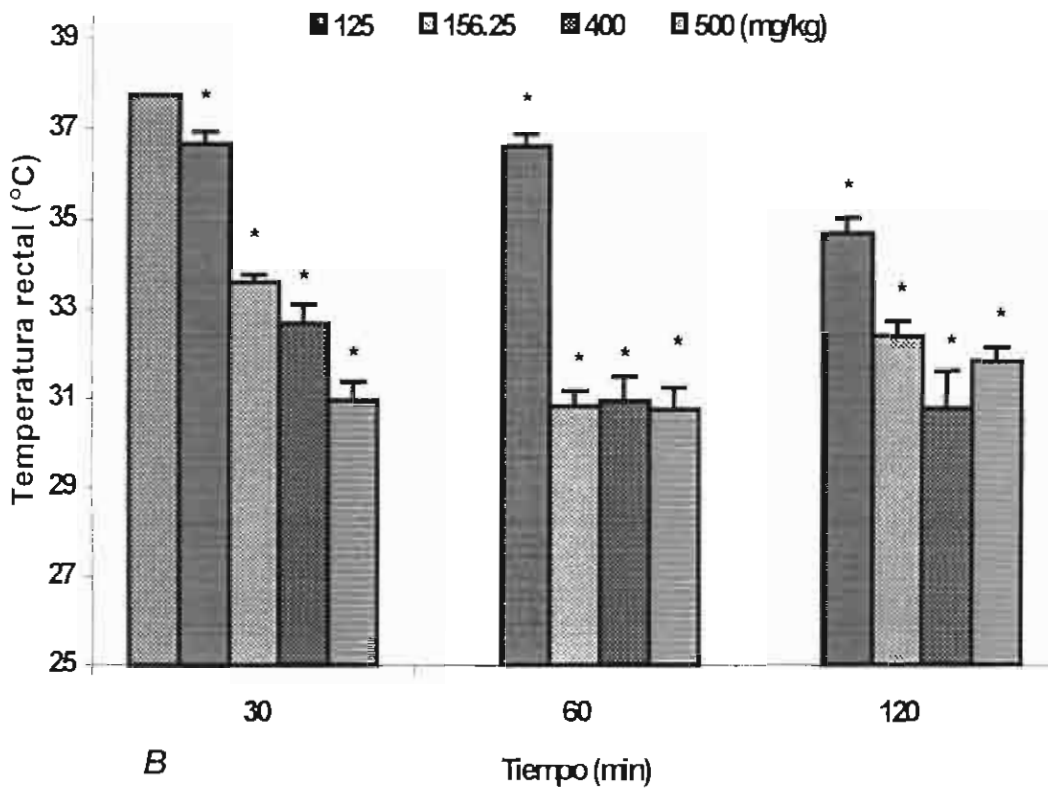


Fig.4 Evolución temporal de la temperatura rectal de ratones antes (B) y después de la administración oral de la semilla suspendida. Los resultados se expresan como el valor promedio de la temperatura \pm E.E. * $p < 0.05$ con respecto a la basal.

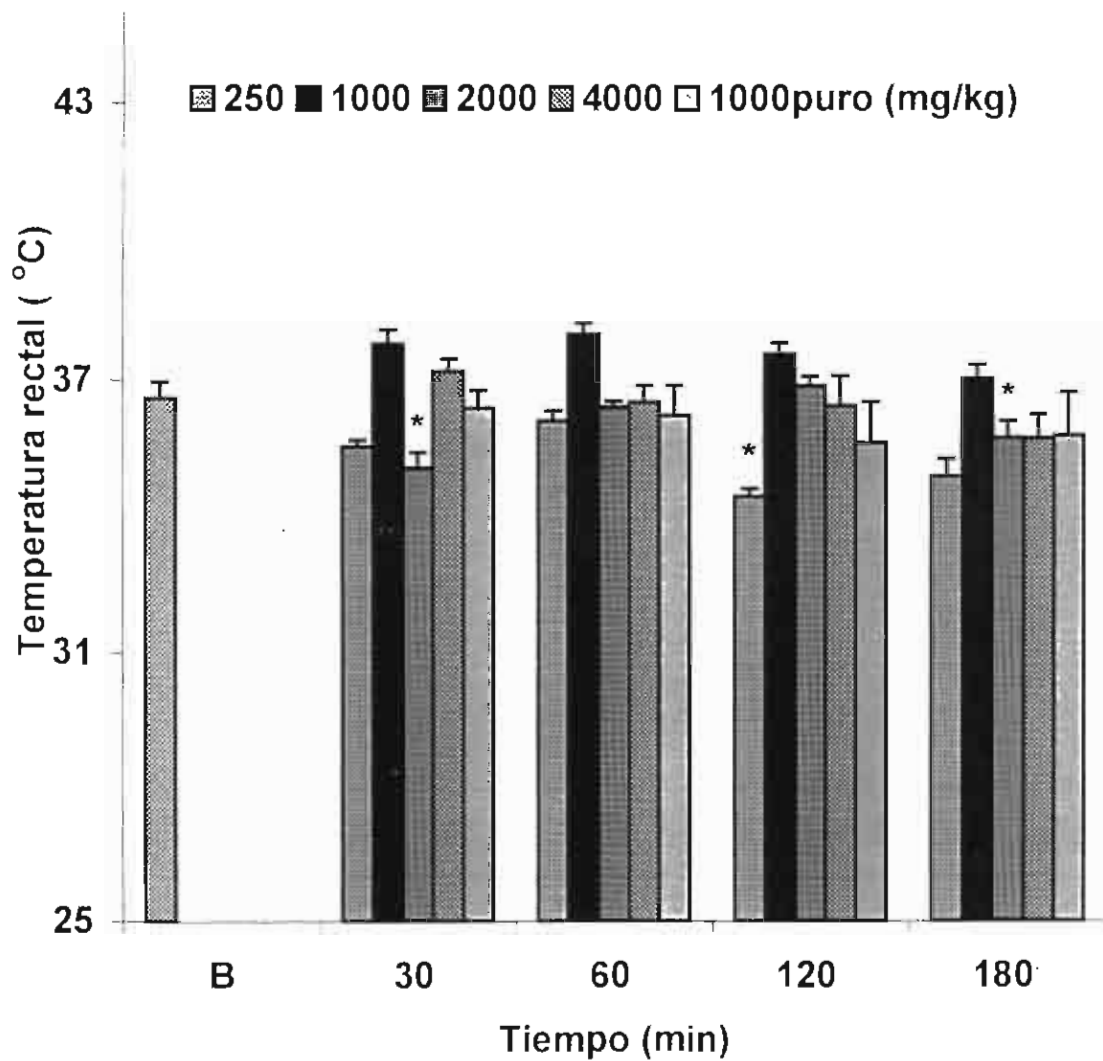


Fig.5 Evolución temporal de la temperatura rectal de ratones antes (B) después de la administración oral de diferentes dosis del extracto seco d acetato de etilo. Los resultados se expresan como el valor promedio de l temperatura \pm E.E. * $p < 0.05$.

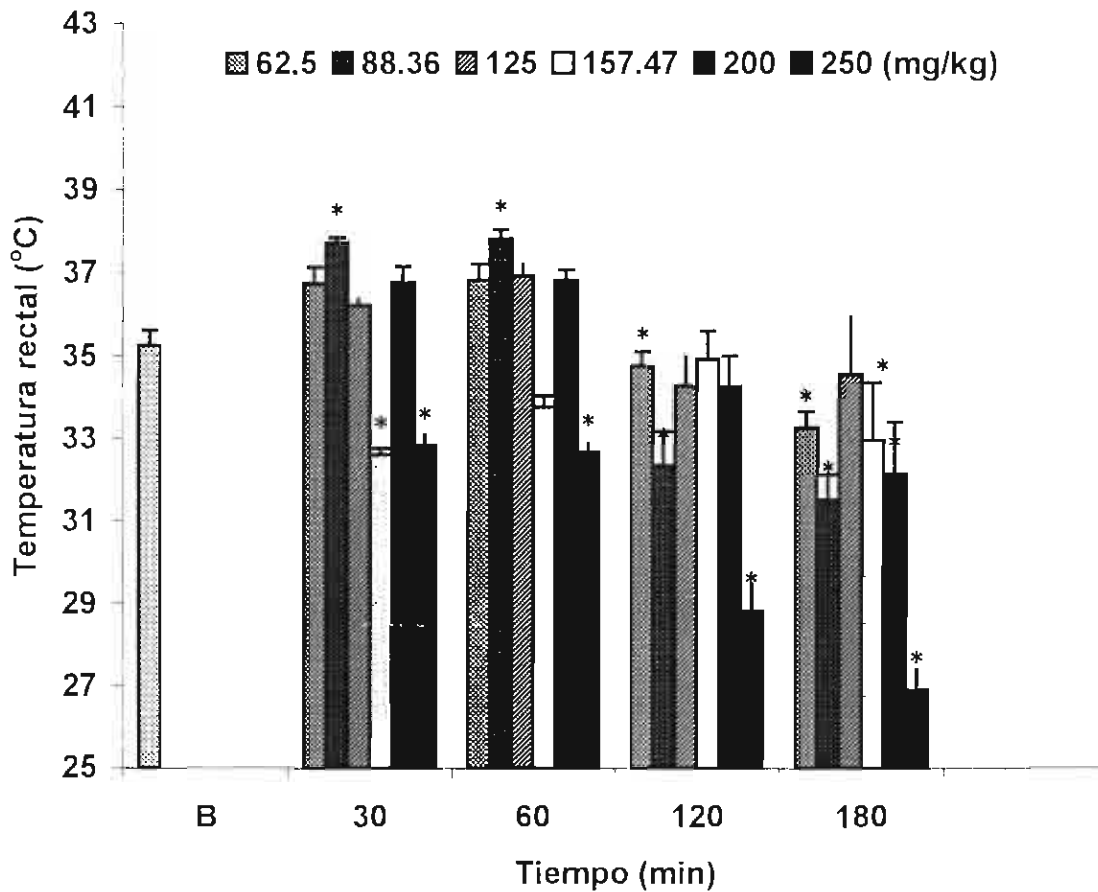


Fig.6 Evolución temporal de la temperatura rectal de ratones antes (B) y después de la administración oral de diferentes dosis del extracto seco metanólico. . Los resultados se expresan como el valor promedio de la temperatura \pm E.E. * $p < 0.05$.

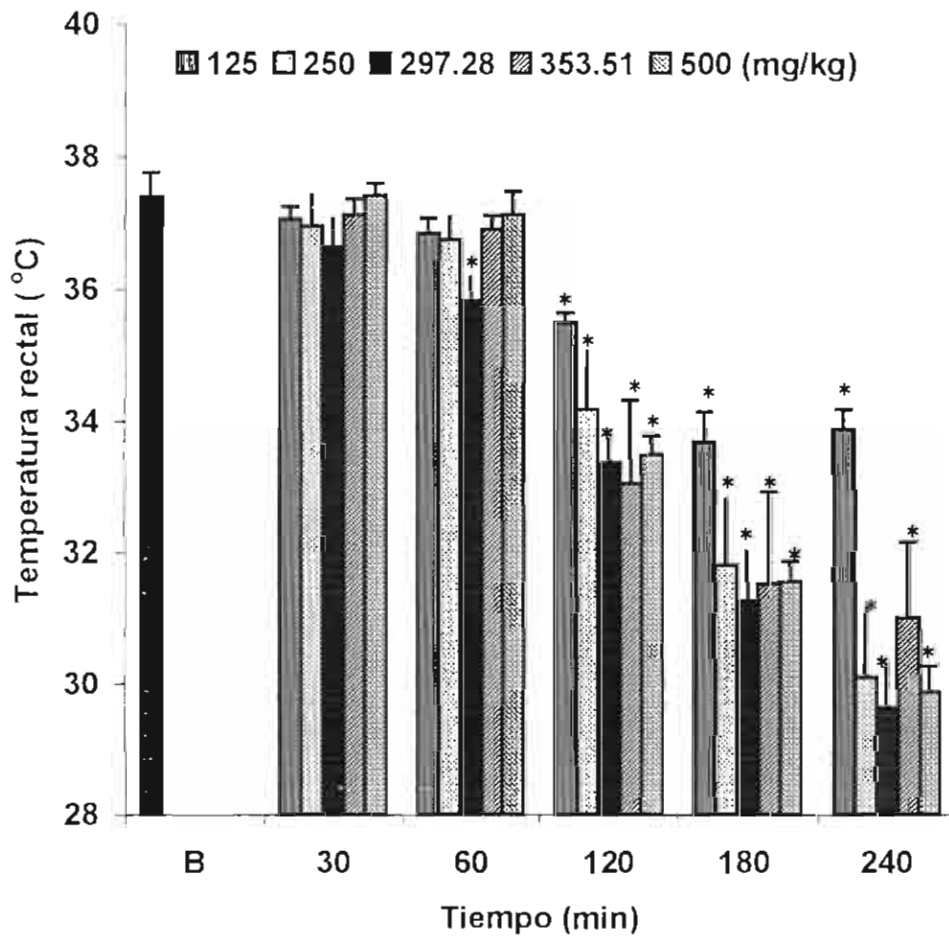


Fig.7 Evolución temporal de la temperatura rectal de ratones antes y después de la administración oral de diferentes dosis del extracto seco acuoso. Los resultados se expresan como el valor promedio de la temperatura \pm E.E. * $p < 0.05$

B. Determinación de la DL₅₀:

La dosis letal cincuenta (DL₅₀) fue obtenida mediante el método de Litchfield y Wilcoxon⁴¹ con límites de confianza al 95 %. Se obtuvo una toxicidad letal mayor con el extracto metanólico (118.37 mg/kg), intermedia con el extracto acuoso (226.45 mg/kg) y un efecto menor en el caso de la semilla suspendida (446.68 mg/kg). Como puede observarse existen diferencias en la potencia tóxica de la semilla suspendida con respecto a los diferentes extractos secos. La comparación de nuestros resultados, de acuerdo a el criterio internacional de potencia toxicológica ubica a la DL₅₀ obtenida con a la semilla suspendida y con los extractos secos, en un índice toxicológico de 4, es decir muy tóxico (Tabla VIII),⁵¹. Posiblemente las sustancias responsables del efecto letal son los glucósidos cardioactivos, thevetina A y thevetina B, sin embargo, para confirmar lo anterior es necesario realizar el fraccionamiento de los extractos y probar la toxicidad de cada una de las fracciones. Por otro lado, el extracto seco obtenido con el acetato de etilo mostró el menor grado de toxicidad. Lo anterior se resume en la tabla IX.

TABLA VIII. Clasificación de la toxicidad de las sustancias de acuerdo con el índice toxicológico con base en la dosis letal cincuenta (DL₅₀) en roedores extrapolada a la especie humana⁵²

Dosis letal probable por vía oral, para una persona de 70 kg		
Índice toxicológico	Dosis (mg/kg)	
6 super tóxica	< 5	Menos de 1 ml
5 extremadamente tóxica	5-50	Entre 1 y 5 ml
4 muy tóxica	50-500	Entre 5 y 30 ml
3 moderadamente tóxica	500-5000	Entre 30 y 480 ml
2 ligeramente tóxica	5000-15000	Entre 480 y 946 ml
1 prácticamente no tóxica	> 15000	> 946 ml

TABLA IX. DL₅₀ y categoría toxicológica de la semilla y los extractos de *Thevetia peruviana*.⁵²

	DL ₅₀ (mg/kg) L.C. 95 %	INDICE TOXICOLOGICO
SEMILLA SUSPENDIDA	*446.68	4
EXTRACTO SECO METANOLICO	**118.37 (86.44 a 162.1)	4
EXTRACTO SECO ACUOSO	**226.45 (156 a 328.59)	4
EXTRACTO SECO ACETATO DE ETILO	>4000	2

* Método gráfico de Miller & Tainter

** Método de Litchfield & Wilcoxon

C. Cardiotoxicidad

Los registros electrocardiográficos, obtenidos de las ratas que recibieron la semilla suspendida, muestran alteraciones aproximadamente a los 15 min después de recibir el tratamiento. Los trastornos predominantes son: aumento del voltaje y bradicardia sinusal, debida al efecto sobre el nodo SA. Taquiarritmias caracterizada por taquicardia y fibrilaciones ventriculares. Bloqueo de la conducción hasta llevar al paro cardiaco (Fig. 8). En el caso de los animales que recibieron el extracto seco metanólico, las alteraciones predominantes en el ECG muestran; tanto bradiarritmias como taquiarritmias. En la Fig. 9, se observan: bradicardia sinusal, bloqueo del nodo AV, bigeminismo y bloqueo completo de la actividad eléctrica del corazón. Es decir, a diferencia de la semilla suspendida, predominan las alteraciones que conducen a doble arritmias (Fig. 9).

Es importante mencionar que la duración de las alteraciones en el ECG son dependientes de la dosis administrada, ya que a menores dosis los fenómenos bradiarrítmicos se mantienen aproximadamente por 90 min del registro y a mayores dosis, una vez que se instala la alteración electrocardiográfica, se presenta el bloqueo completo de la función del corazón a los 5 min del fenómeno bradiarrítmico.

En la Fig. 10, se observan tanto taquicardias ventriculares como bloqueos de la conducción eléctrica del corazón de manera similar a la observada con la semilla suspendida. Las alteraciones en el ECG del extracto seco acuoso, son similares a los observados con el extracto seco metanólico y los reportados durante la intoxicación producida por digitálicos en uso clínico.³² Por otra parte, los animales que recibieron el extracto seco de la semilla, obtenido con acetato de etilo, no presentaron cambios en el ECG durante los 600 min que fueron registrados (Fig. 12).

La cardiotoxicidad implica la despolarización en reposo debido a la inhibición de la bomba de sodio y a la posdespolarizaciones oscilatorias, causadas por la sobre carga de calcio intracelular producida posiblemente por los glucósidos presentes en la semilla y que se encuentran concentrada en los extractos metanólico y acuoso. La despolarización en reposo puede ser responsable de una parte de las anomalías de conducción, como el bloqueo auriculoventricular. Quizá las posdespolarizaciones sean la causa de la mayoría de las arritmias por glucósidos que implican automaticidad anormal como las despolarizaciones ventriculares prematuras, el bigeminismo y la taquicardia ventricular.¹⁹

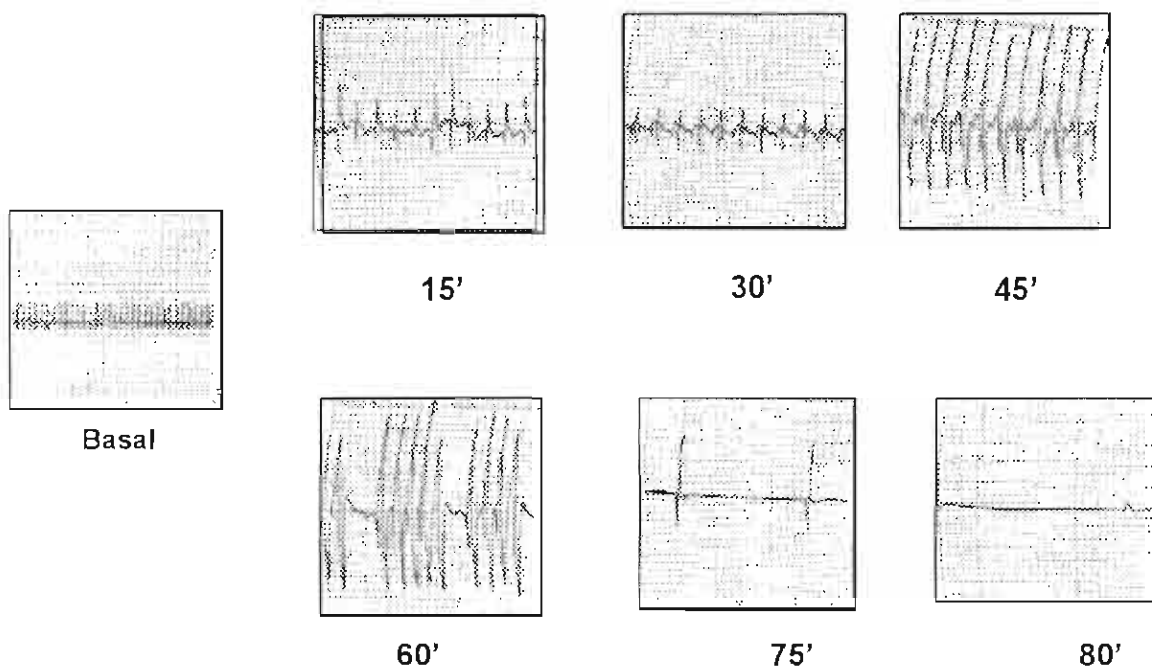


Fig. 8 Registro electrocardiográfico de la rata durante el periodo basal y a los 15, 30, 45, 60, 75 y 80 min, después de la administración de la semilla suspendida de *Thevetia peruviana* (500 mg/kg p.o.).

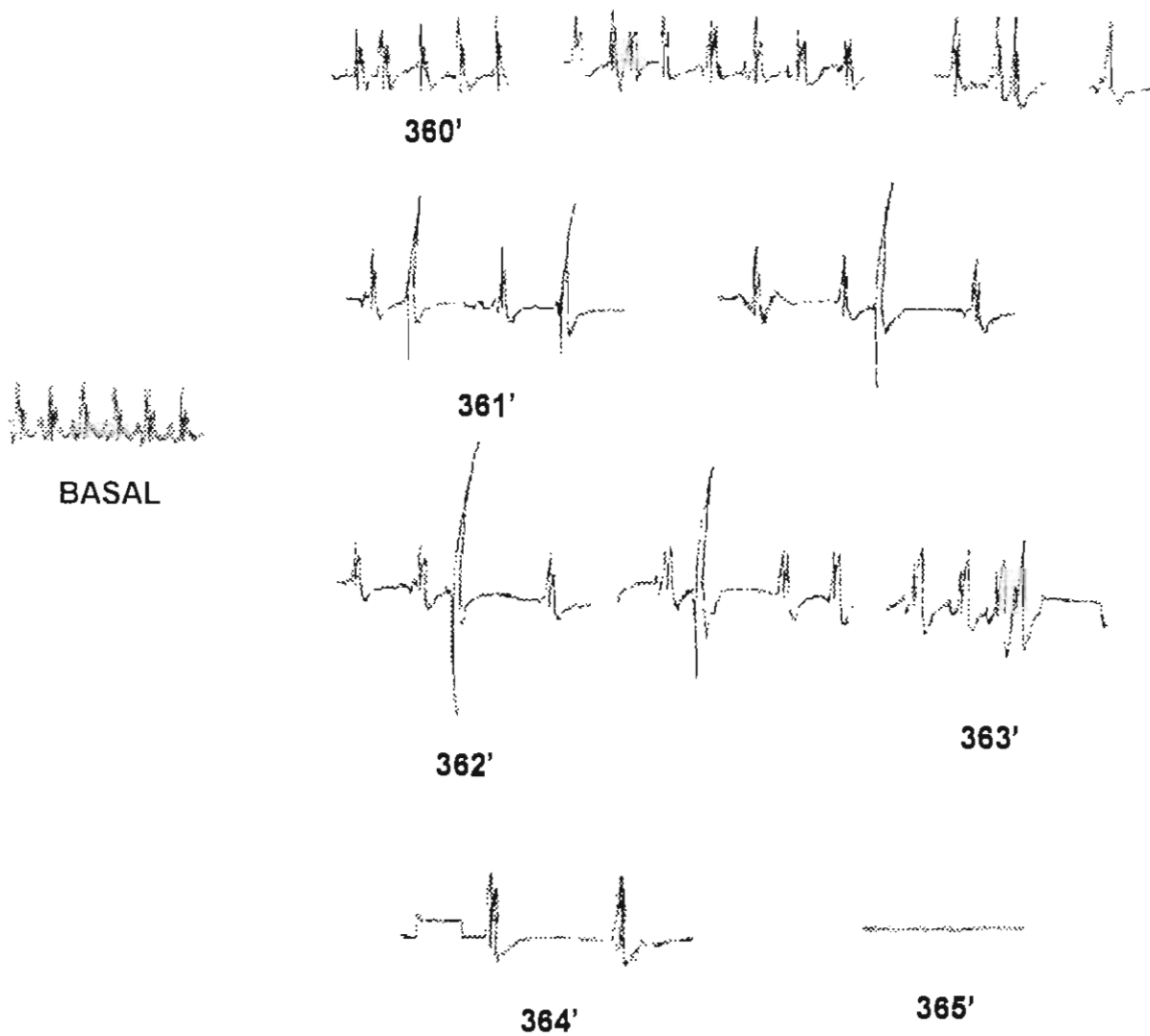


Fig. 9 Registro electrocardiográfico donde se observan las manifestaciones de toxicidad producida por el extracto seco metanólico (500 mg/kg p o). El cambio del ECG se presentó después de 360 min de la administración del extracto, el paro cardíaco se presentó a los 365 min de registro.

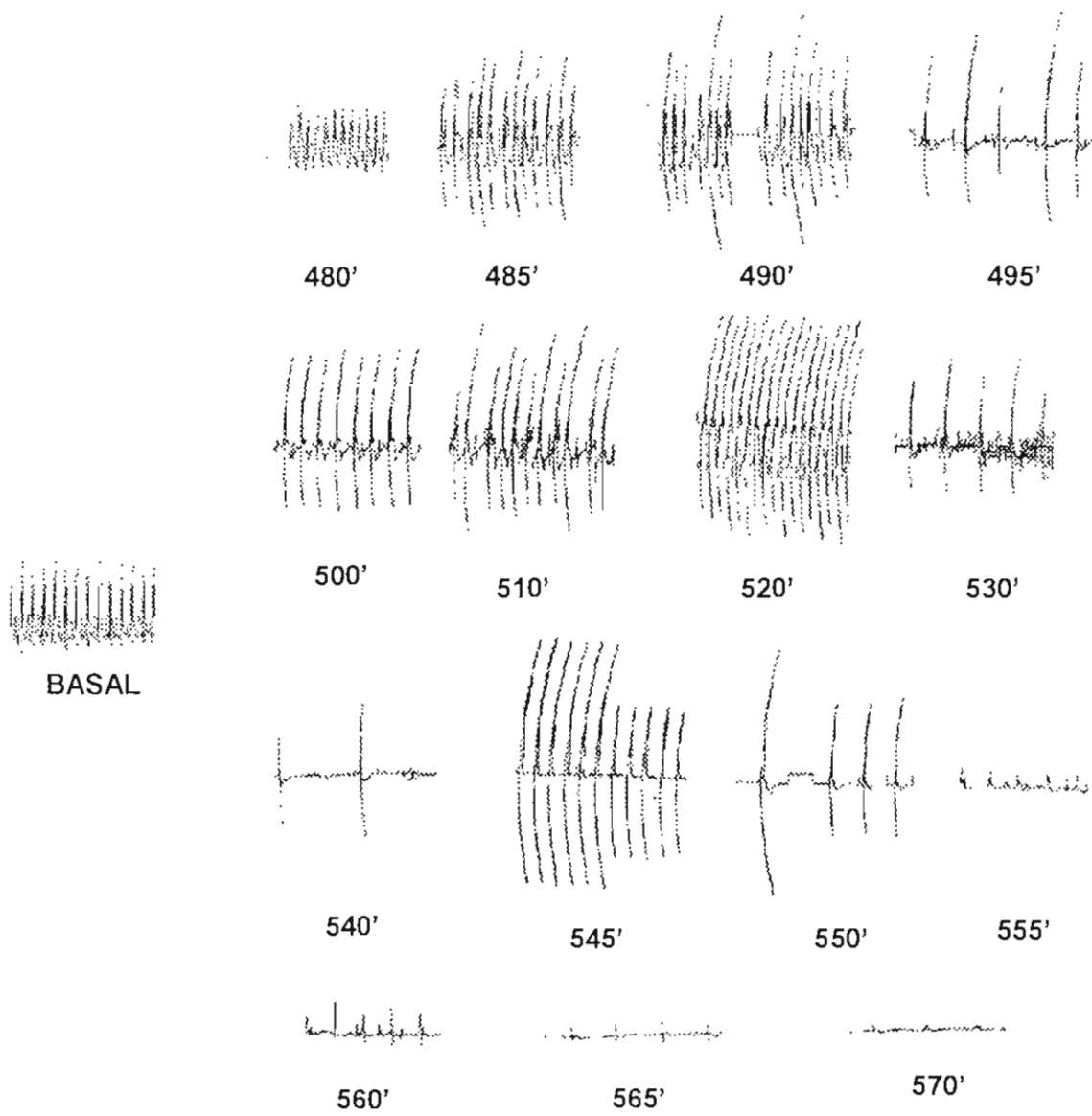


Fig. 10 Registro electrocardiográfico donde se observan las manifestaciones de toxicidad producida por el extracto seco metanólico de la semilla de *T. peruviana* (300 mg/kg p o). El cambio del ECG se presentó después de 480 min de la administración del extracto, hasta llevar al paro cardiaco aproximadamente a los 570 min.

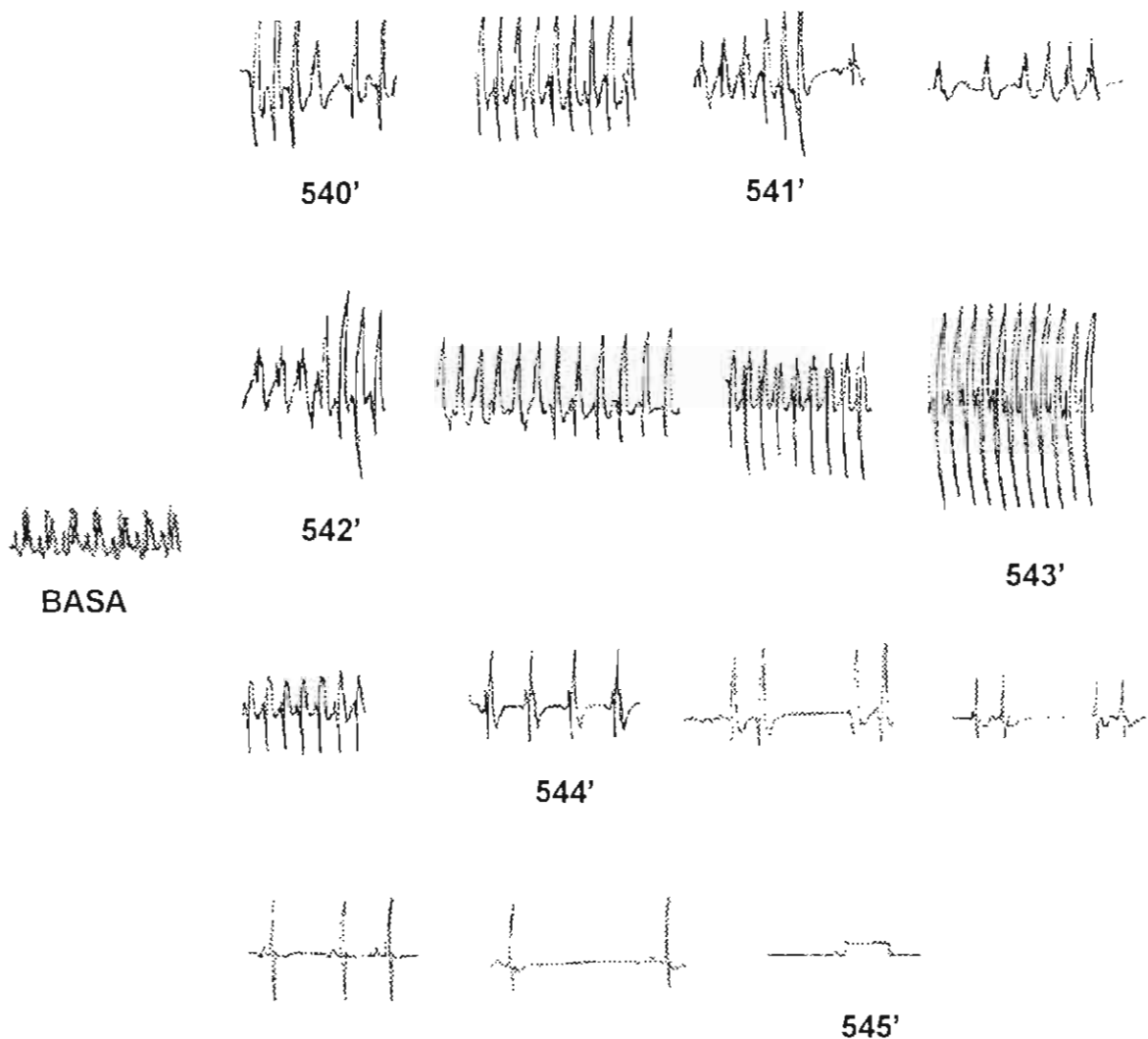


Fig. 11 Registro electrocardiográfico de la rata donde se observan las manifestaciones de toxicidad producida por el extracto seco acuoso (500 mg/kg p o). El cambio del ECG se presentó después de 540 min de la administración del extracto y el paro cardíaco se presentó después de los 545 min.

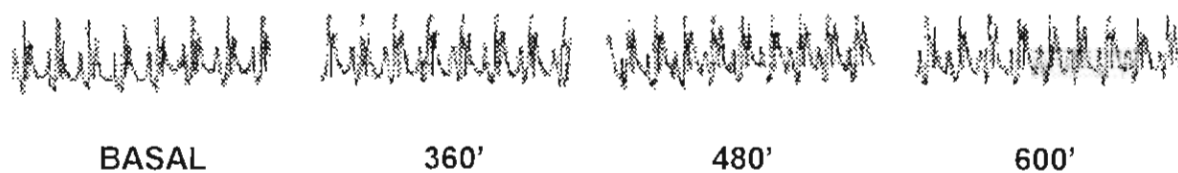


Fig. 12 Registro electrocardiográfico de la rata durante el periodo basal y a los 360, 480 y 600 min, después de la administración por p o del extracto seco obtenido de la semilla de *Thevetia peruviana* con acetato de etilo

C. ESTUDIOS *In vitro*

A. Efectos sobre el músculo uterino

Los extractos secos de acetato de etilo y acuoso sobre el músculo liso uterino producen un desplazamiento de la curva dosis respuesta (CDR) a la acetilcolina a la derecha (Fig. 13 y 14), lo cual se ve reflejado en una disminución de la contracción uterina, como se observa en el registro (Fig. 15 y 16). En el caso del extracto seco metanólico se observa un aumento en la contracción muscular en las primeras concentraciones y después se manifiesta un desplazamiento hacia la derecha de la CDR de la acetilcolina, esto lo podemos observar tanto en la CDR y el registro poligráfica (Fig. 17 y 18). Los resultados anteriores sugieren que en el extracto se encuentra compuestos que modifican la actividad espontánea uterina, lo que posiblemente explica uno de sus usos populares que se le da a la planta¹³

B. Efectos sobre músculo intestinal:

Los extractos secos metanólico y acuoso de la semilla de *T. peruviana* aumentar de manera significativa la contracción producida por la acetilcolina en el músculo liso intestinal, lo que se ve reflejado tanto en las CDR y en los trazos representativos (Fig. 19, 20 y 21, 22), esto podría explicar el efecto catártico o diarreico que se presentó en los estudios *in vivo* de toxicidad aguda. (Tabla VI)

En el caso del extracto seco obtenido con acetato de etilo, no se presentaron cambios significativos de la CDR a la acetilcolina en músculo liso intestinal (Fig. 23 y 24). Lo anterior se puede correlacionar con el efecto que se observó *in vivo*, en los animales tratados con el extracto agudamente ya que solo presentaron efectos diarreicos a dosis altas (2000-4000 mg/kg).

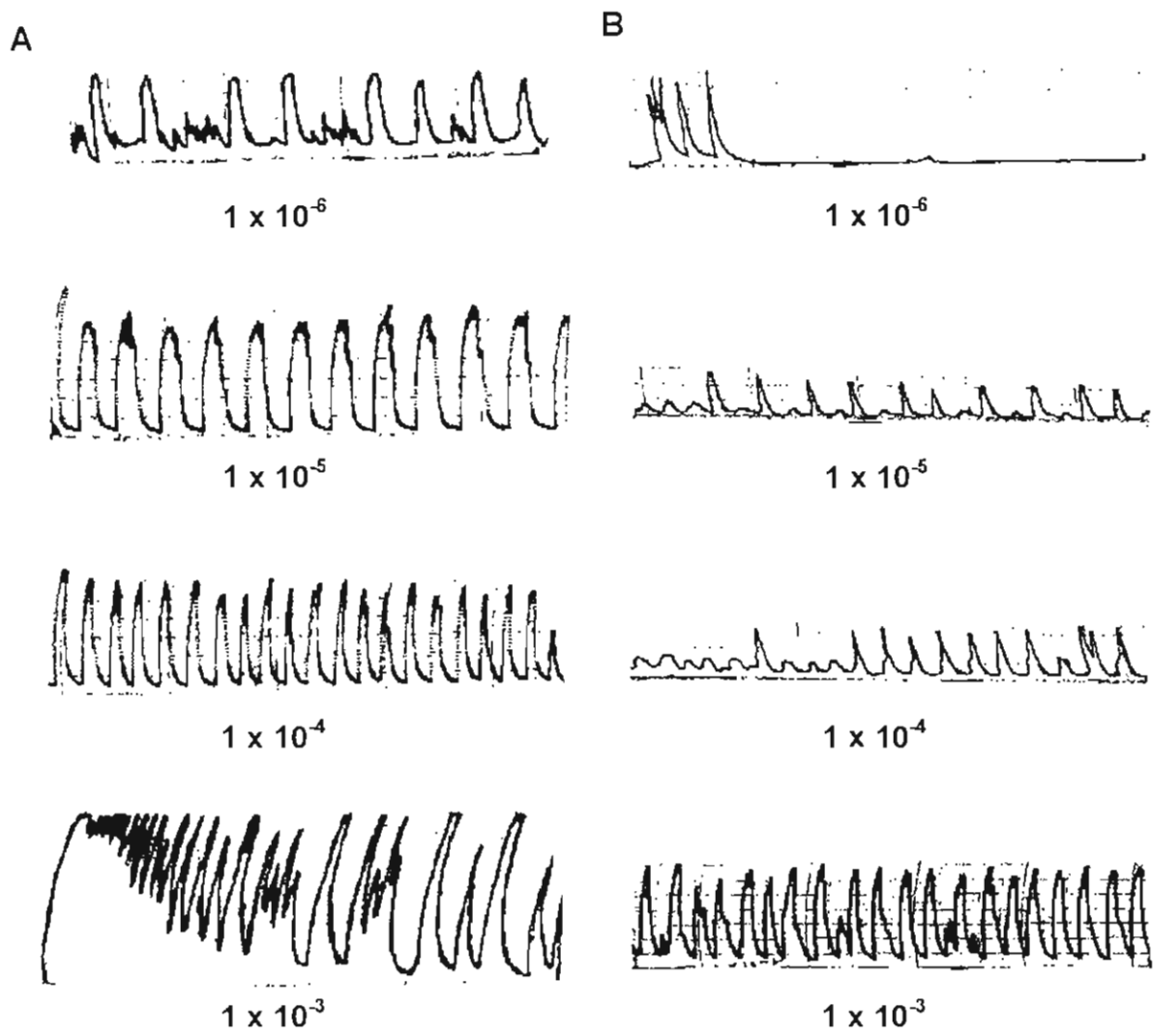


Fig 13. Registro poligráfica de los efectos producidos por el extracto seco de acetato de etilo (1000 $\mu\text{g/ml}$), sobre la contracción inducida por diferentes concentraciones de acetilcolina en músculo liso uterino. El panel A, acetilcolina sola; panel B, acetilcolina y el extracto.

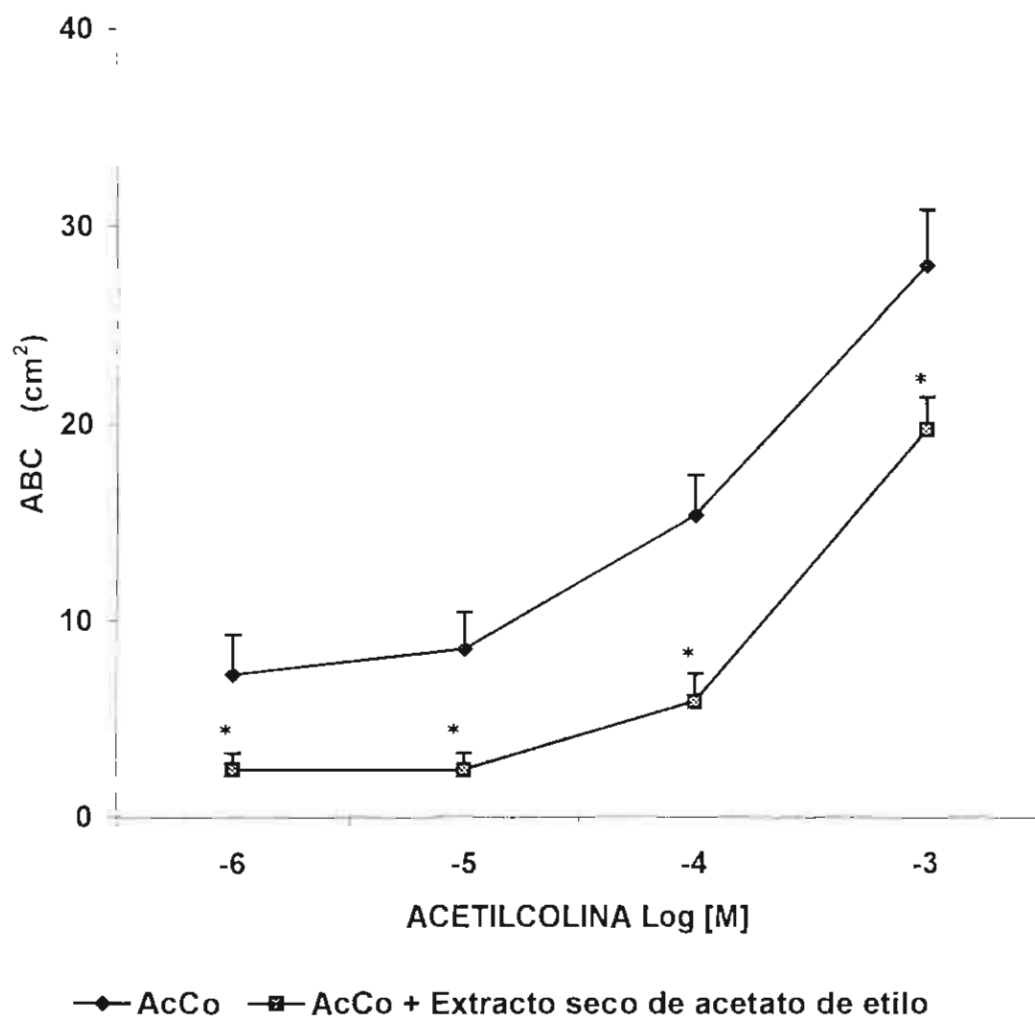


Fig. 14 Curva dosis respuesta (CDR) obtenida con el músculo liso intestinal aislado de rata y la administración de dosis crecientes de acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco de acetato de etilo (1000 $\mu\text{g/ml}$) obtenido de la semilla de *T. peruviana*. Los resultados se expresan como el promedio de la actividad uterina (área bajo la curva) \pm E.E. (n = 9) * $p < 0.05$.

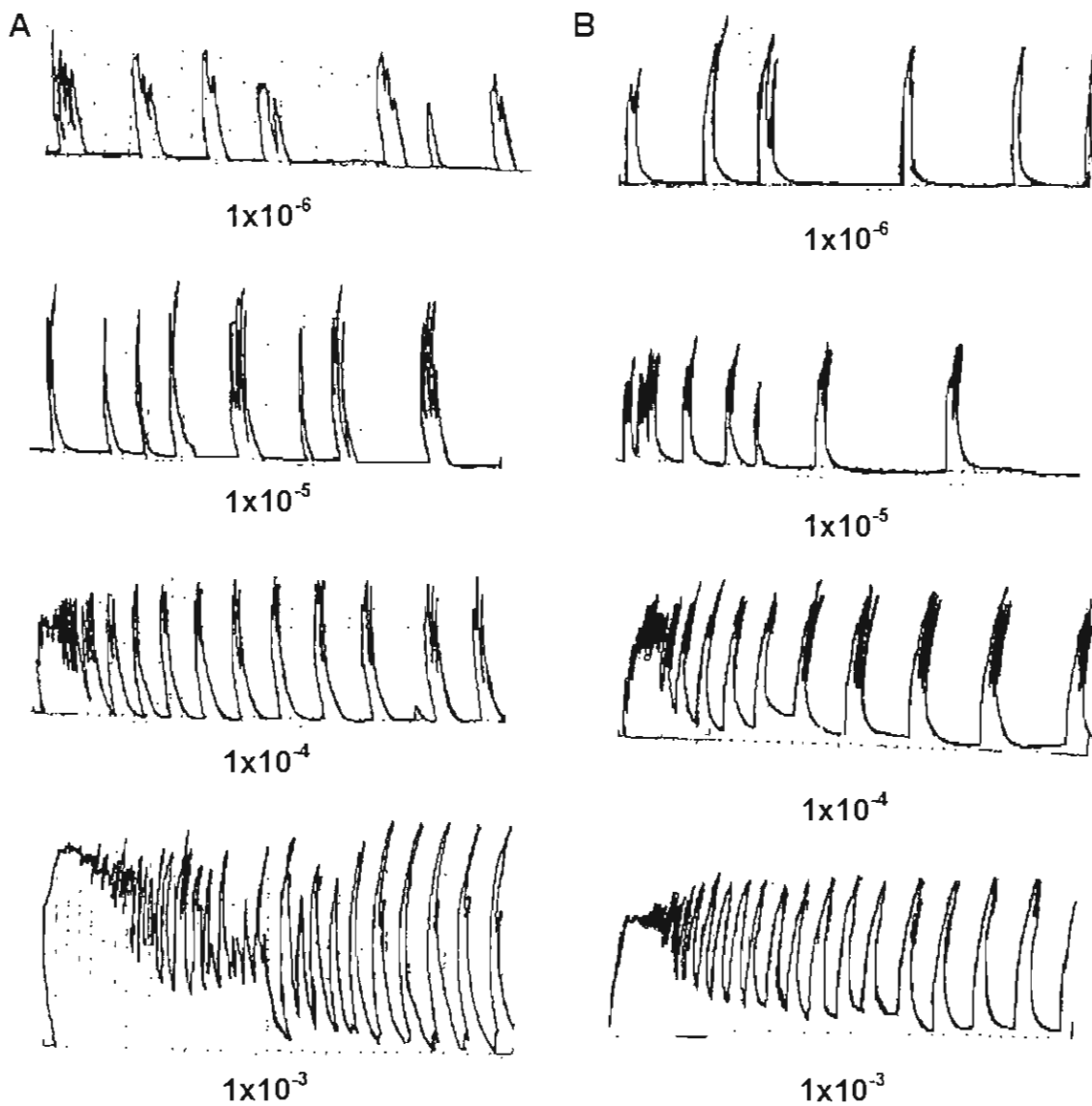


Fig 15. Representación poligráfica de los efectos producidos por el extracto seco acuoso (666.66 $\mu\text{g/ml}$), sobre la contracción inducida por diferentes concentraciones de acetilcolina en músculo liso uterino. El panel A, acetilcolina sola; panel B, acetilcolina y el extracto.

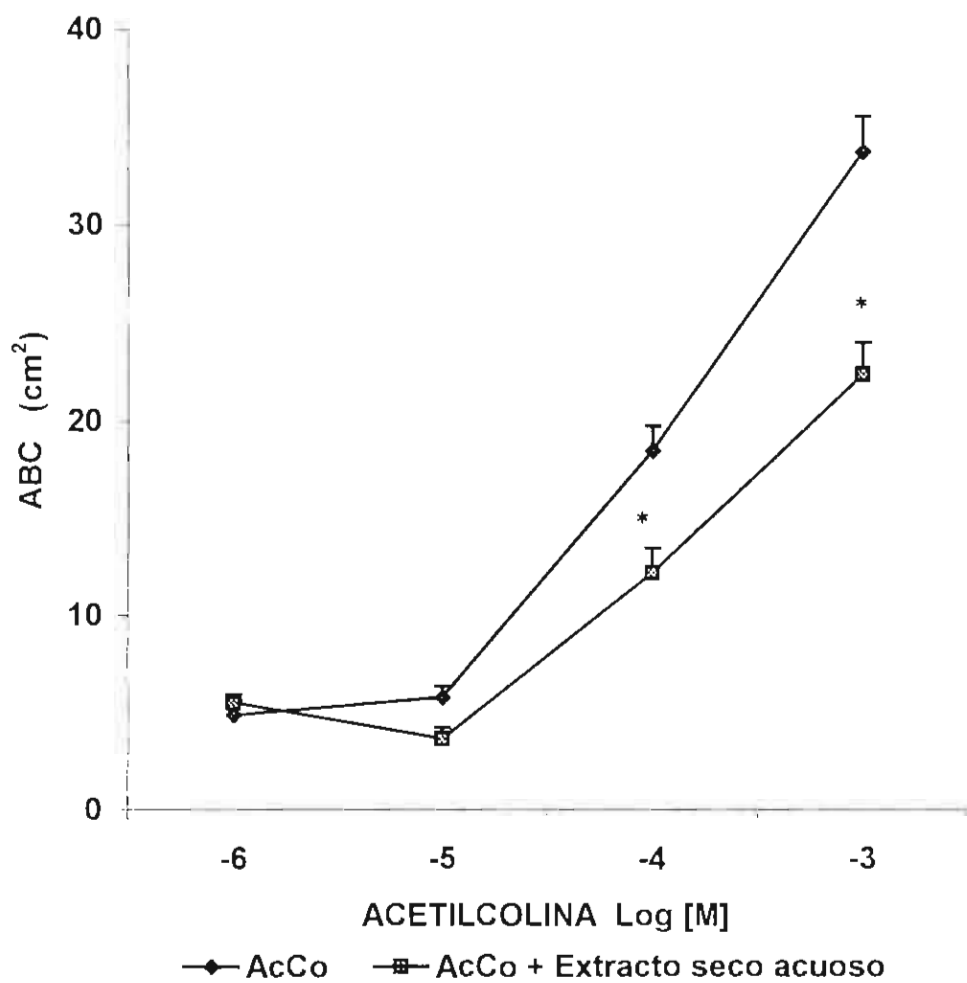


Fig. 16 Curva dosis respuesta (CDR) obtenida con el músculo liso intestinal aislado de rata y la administración de dosis crecientes de acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco acuoso (666.66 $\mu\text{g/ml}$) obtenido de la semilla de *T. peruviana*. Los resultados se expresan como el promedio de la actividad uterina (área bajo la curva) \pm E.E. (n = 9) * $p < 0.05$.

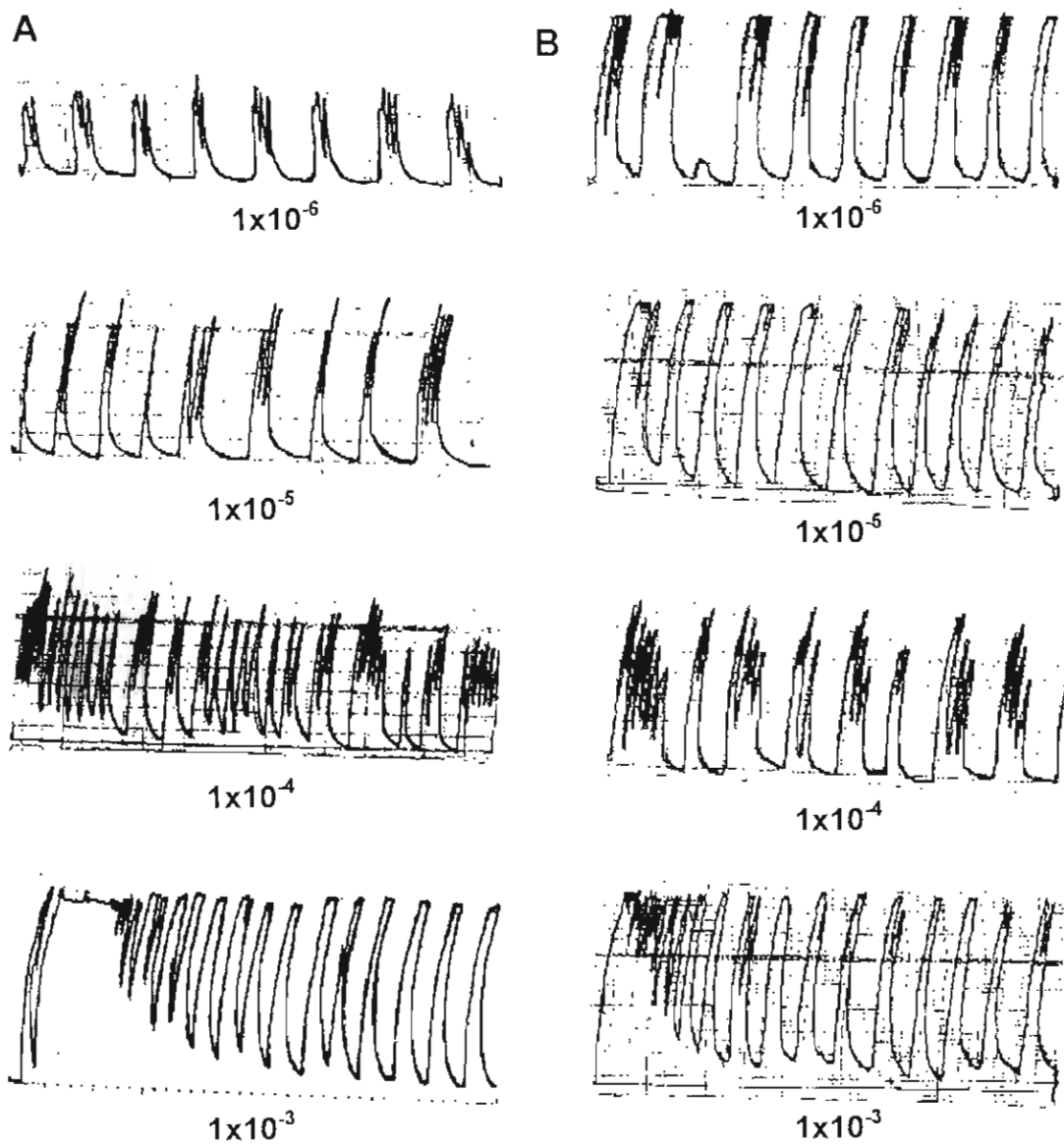


Fig 17. Representación poligráfica de los efectos producidos por el extracto seco metanólico (666.66 $\mu\text{g/ml}$) sobre la contracción inducida por diferentes concentraciones de acetilcolina en músculo liso uterino. El panel A, acetilcolina sola; panel B, acetilcolina y el extracto.

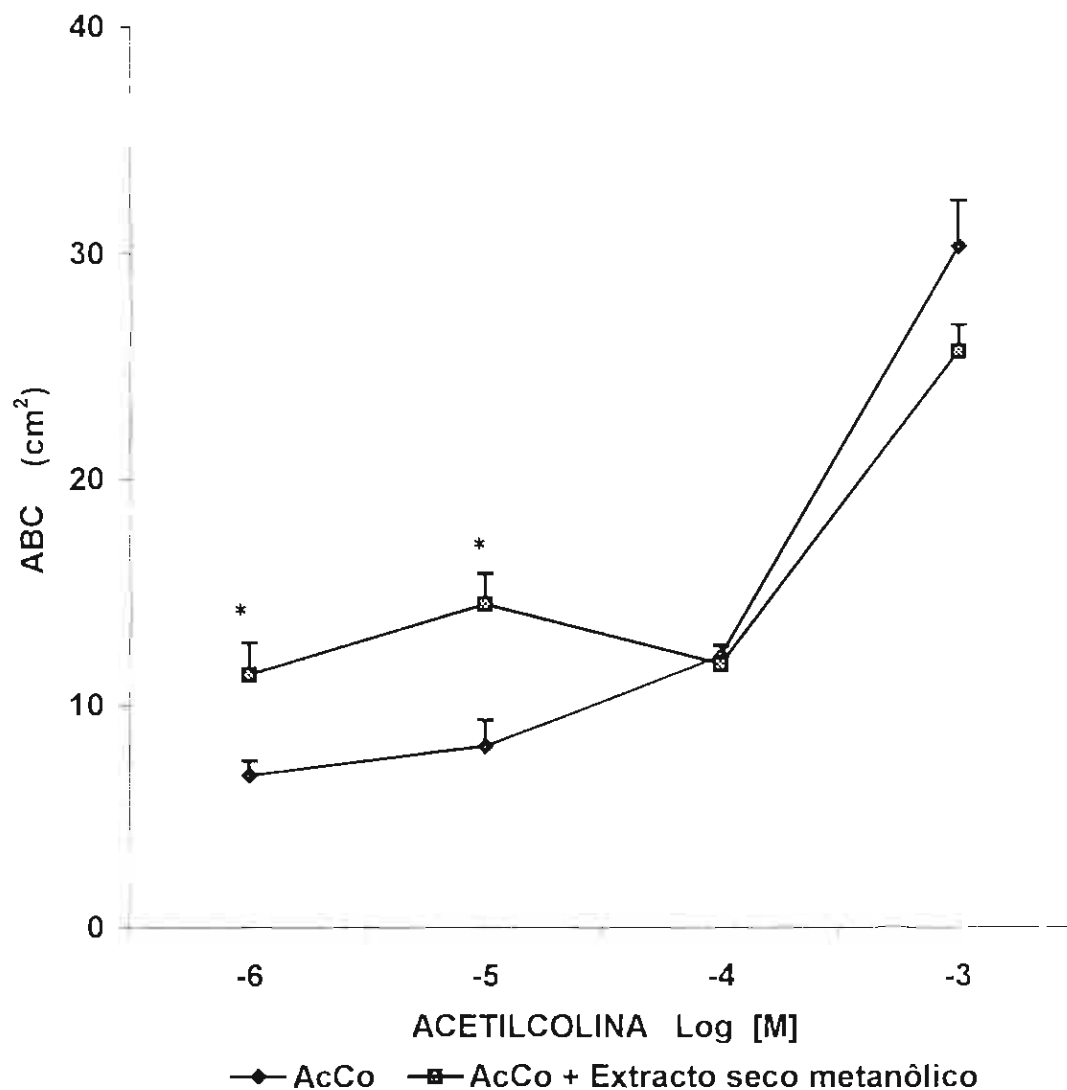


Fig. 18 Curva dosis respuesta (CDR) obtenida con el músculo liso intestinal aislado de rata y la administración de dosis crecientes de acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco metanólico (666.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$) obtenido de la semilla de *T. peruviana*,. Los resultados se expresan como el promedio de la actividad uterina (área bajo la curva) \pm E.E. (n = 9) * $p < 0.05$.

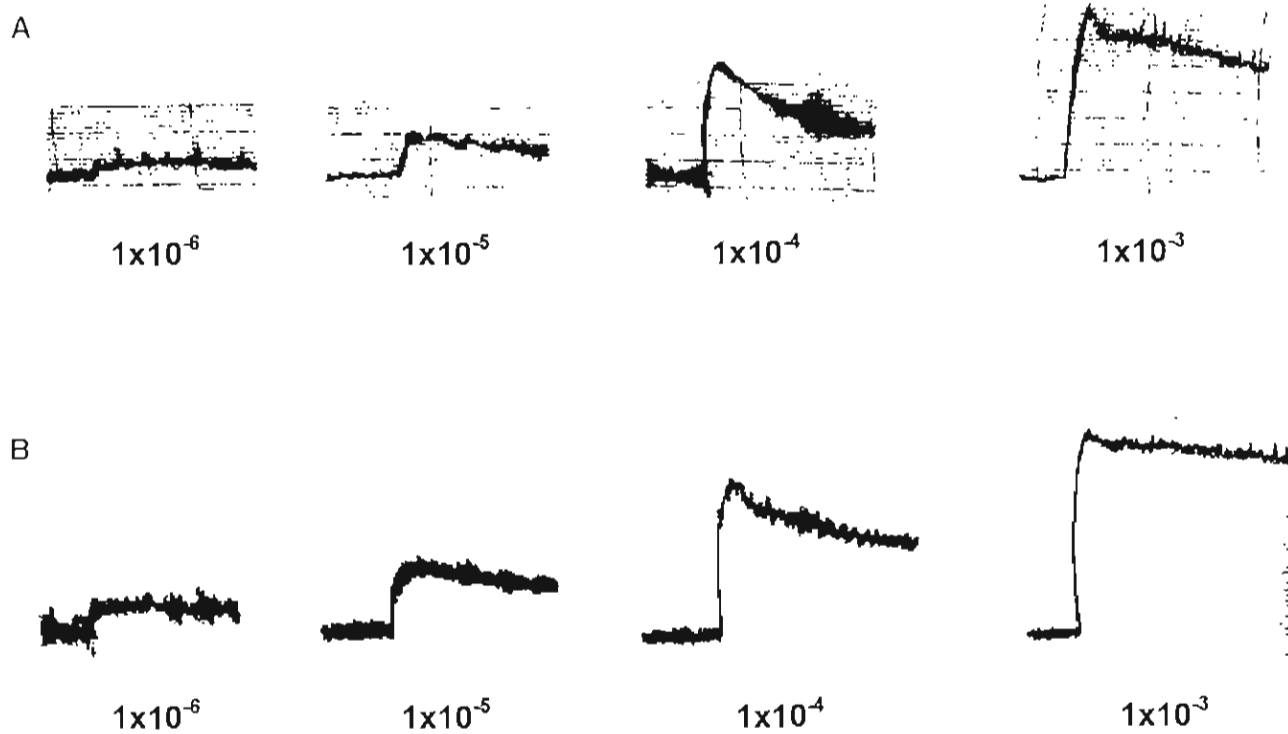


Fig 19. Registro poligráfico del efecto de diferentes concentraciones ($1 \times 10^{-6} - 1 \times 10^{-3}$ M) de la acetilcolina sola (A) y en presencia del extracto seco metanólico (666.66 $\mu\text{g/ml}$) de la semilla de *T. peruviana* (B), en íleon aislado de rata.

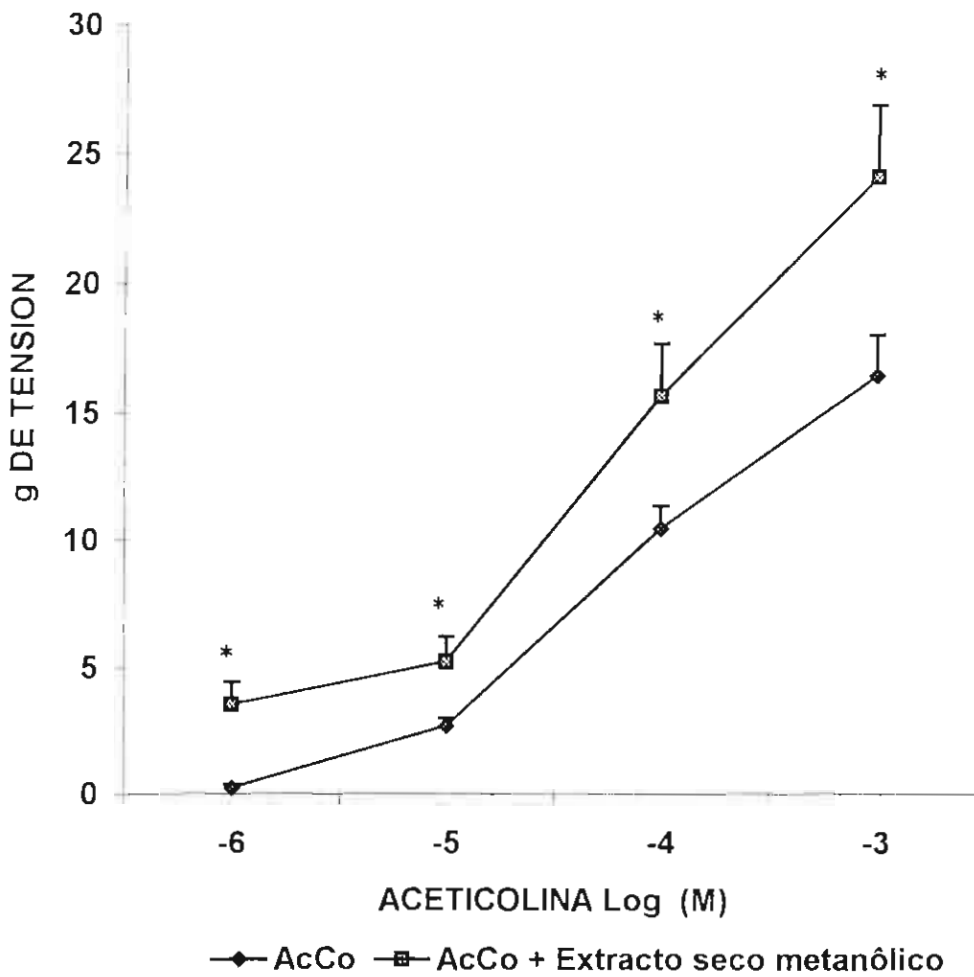


Fig.20 Curva dosis respuesta (CDR) obtenida con el músculo liso intestinal aislado de rata y la administración de dosis crecientes de acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco metanólico (666.66 $\mu\text{g}/\text{ml}$); obtenido de la semilla de *T. peruviana*;. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm E.E. (n =8) *p<0.05.

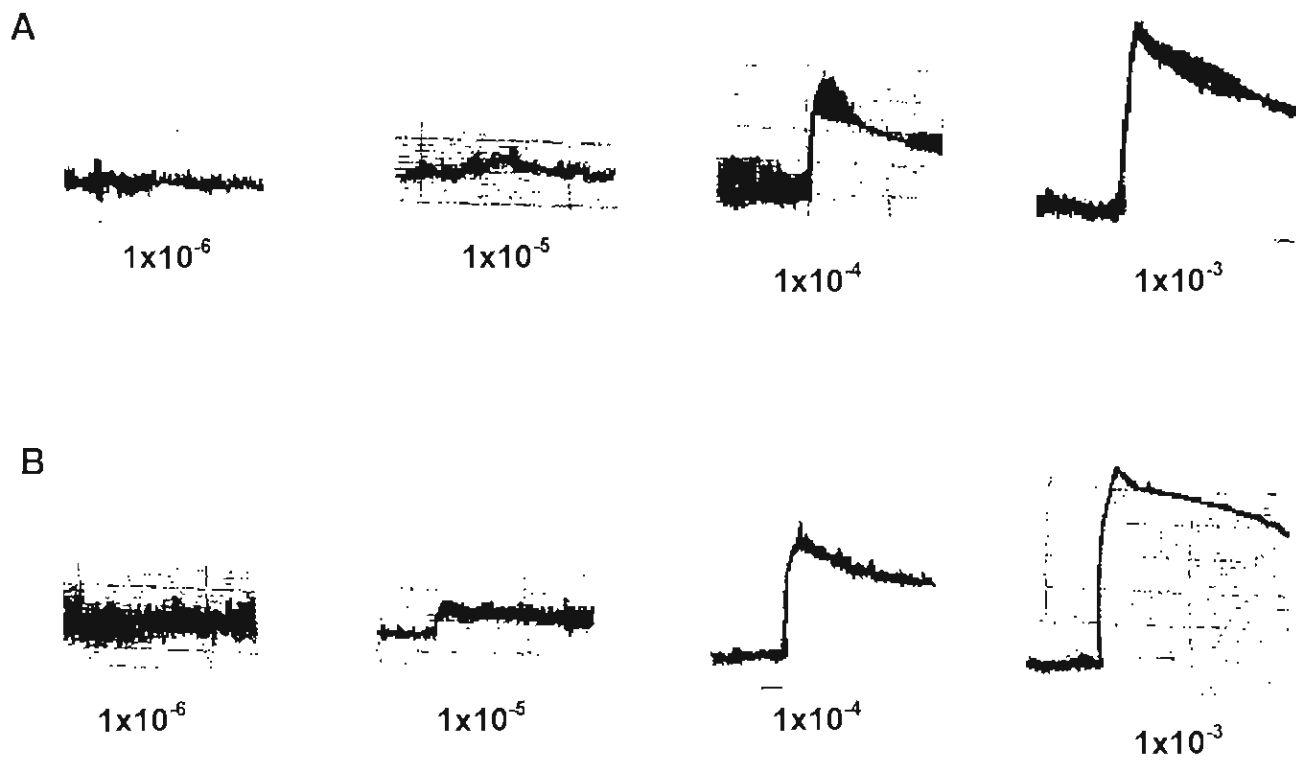


Fig 21. Trazo poligráfico del efecto de diferentes concentraciones (1×10^{-6} – 1×10^{-3} M) de la acetilcolina sola (A) y en presencia del extracto seco acuoso (666.66 $\mu\text{g/ml}$) de la semilla de *T. peruviana* (B), en íleon aislado de rata

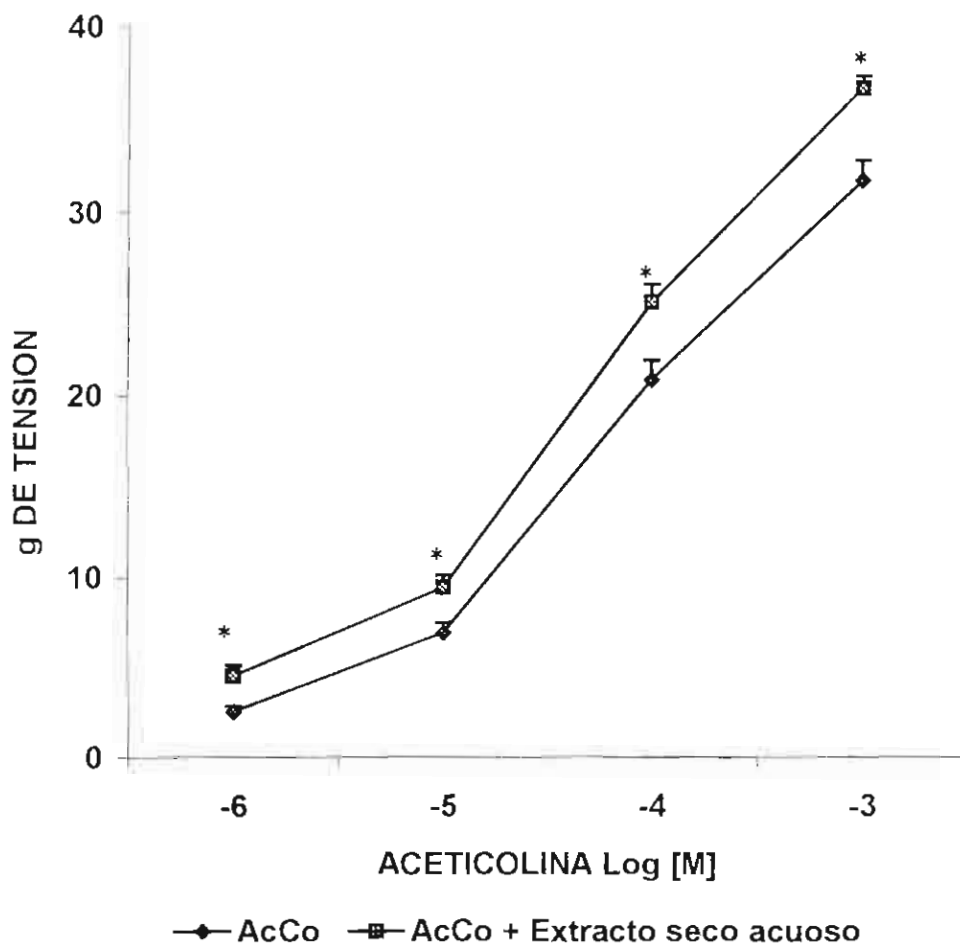


Fig 22. Curva dosis respuesta (CDR) obtenida con el músculo liso intestinal aislado de rata y la administración de dosis crecientes de acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco acuoso (666.66 µg/ml); obtenido de la semilla de *T. peruviana*. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión ± E.E. (n =8) *p<0.05.

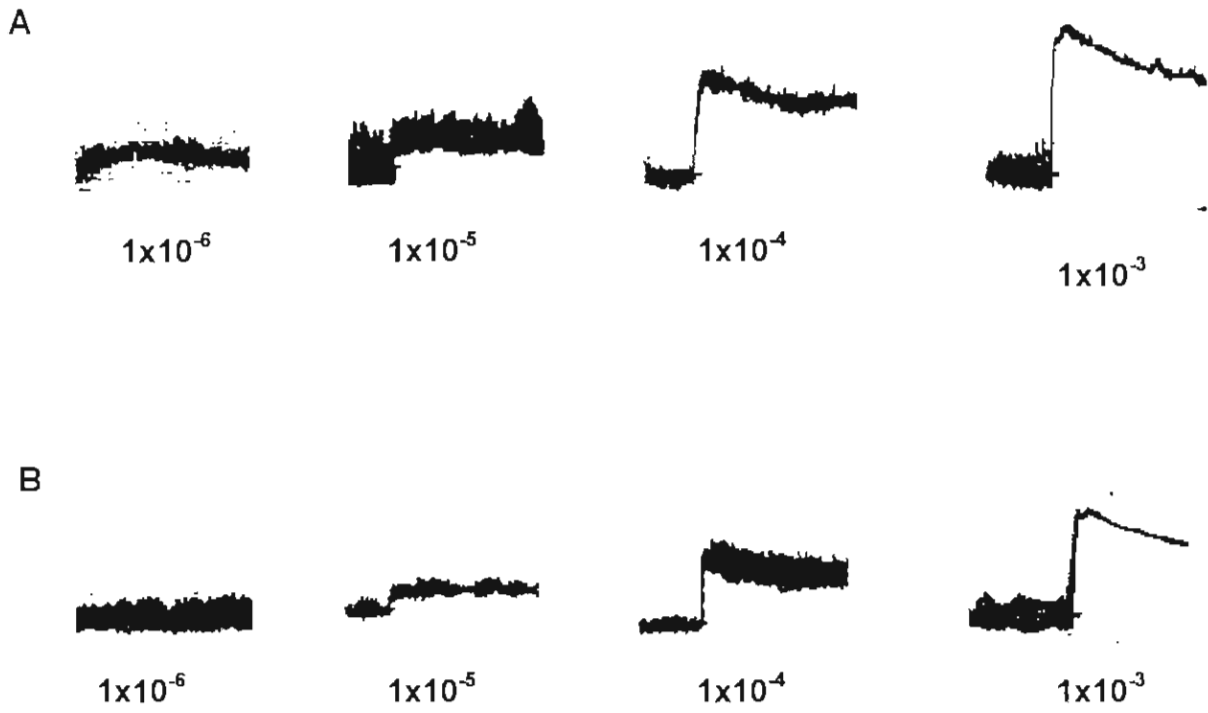


Fig 23. Trazo poligráfico del efecto de diferentes concentraciones (1×10^{-6} – 1×10^{-3} M) de la acetilcolina sola (A) y en presencia del extracto seco de acetato de etilo (1000 $\mu\text{g/ml}$) de la semilla de *T. peruviana* (B) en íleon aislado de rata.

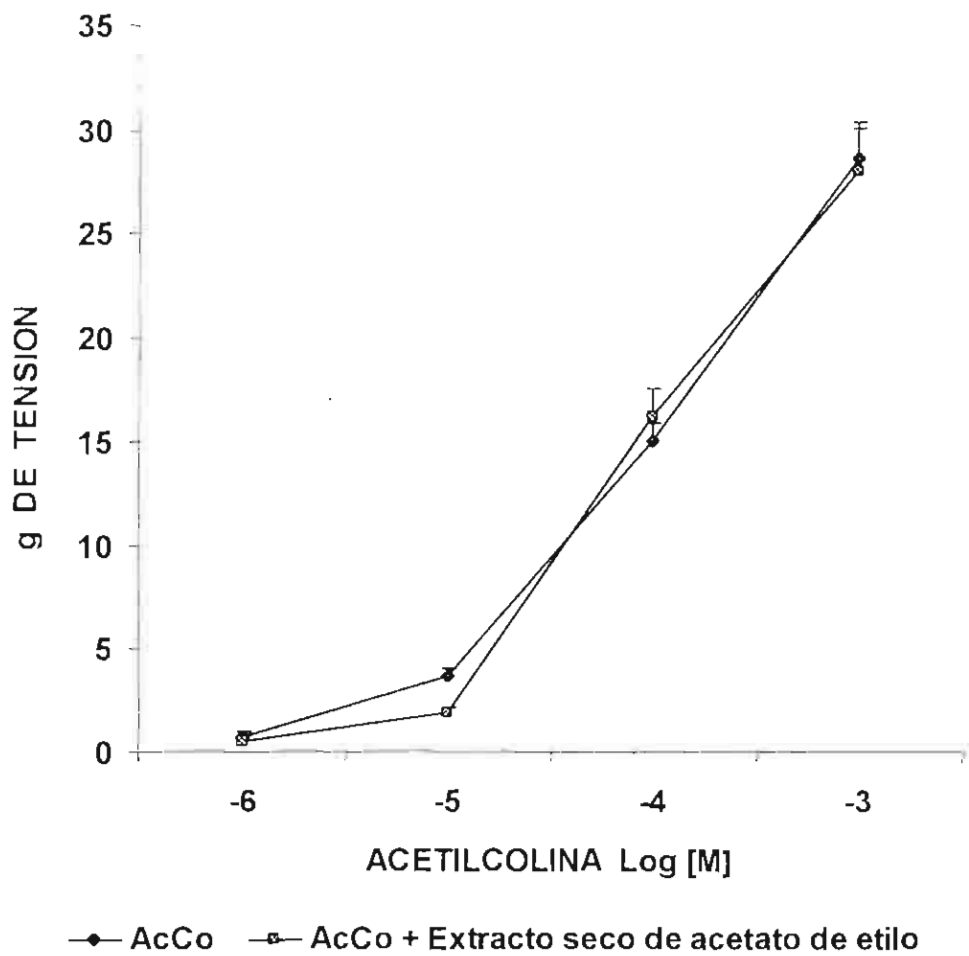


Fig. 24 Curva dosis respuesta (CDR) obtenida con el músculo liso intestinal aislado de rata y la administración de dosis crecientes de acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco de acetato de etilo (1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$), obtenido de la semilla de *T. peruviana*. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm .E. (n =8) *p<0.05.

Se ha reportado que los glucósidos cardiacos afectan todos los tejidos excitables incluyendo el músculo liso y el SNC. El mecanismo de estos es probable que implique la inhibición de la Na⁺/K⁺ ATPasa, esto ocasiona que aumente de manera espontánea la actividad del músculo liso. Además se incrementa el calcio intracelular esto podría ocasionar un aumento en el tono del músculo liso.¹⁹ El aumento de la contracción del músculo liso intestinal provocada por los extractos secos metanólico y acuoso estarían justificados con lo anteriormente descrito. Sin embargo para el caso del músculo liso uterino solo a menores concentraciones del extracto metanólico se obtuvo una respuesta contráctil y no así con el extracto acuoso, esto posiblemente se deba a la concentración de glucósidos y a la presencia de diferentes compuesto presentes en los extractos.

C. Efectos sobre músculo de vejiga

La micción es un proceso por el que la vejiga vacía su contenido después de haberse llenado. La vejiga se llena progresivamente hasta que la tensión que dilata sus paredes sube por encima del umbral y, en ese momento se desencadena un reflejo nervioso. Este reflejo de micción da origen a un deseo de orinar. La vejiga es una cámara de músculo liso que se compone de dos partes el músculo detrusor y el trígono que esta colocado en sentido oblicuo.⁵³

La respuesta contráctil de la vejiga se determinó a utilizado tres diferentes regiones transversales: el detrusor superior, el inferior y el trígono.⁵³ El extracto seco metanólico y el acuoso, modifican la respuesta contráctil producida por la acetilcolina, por una parte se observa una relajación de la parte superior e inferior del músculo detrusor, (Fig. 25 y 27) y por otra, no modifica la contracción del trígono (Fig. 26 y 28). Sin embargo con el extracto seco acuoso se observa una ligera tendencia a disminuir la contracción muscular del trígono (Fig. 28). Por otro lado el extracto seco de acetato de etilo modifica la respuesta contráctil de acetilcolina produciendo una relajación del detrusor superior e inferior (Fig. 29 y 30) y una disminución significativa de la contracción del trígono sobre todo en las

últimas concentraciones de acetilcolina (Fig. 30). En la figura 31 se muestran la representación poligráfica de la parte detrusora de la vejiga aislada, para los extractos secos obtenidos de la semilla de *T. peruviana* con acetato de etilo, metanol y agua, en el cual se puede observar una disminución de la parte detrusora para los tres extractos. Para la parte del trígono de la vejiga, podemos observar que para el extracto acuoso y metanólico no presentan cambios significativos con respecto al trazo de acetilcolina sola y en cambio para el extracto seco de acetato de etilo se observa una disminución de la contracción (Fig. 32). Por lo que, los resultados anteriores explican los efectos producidos por los extractos secos de la semilla de *T. peruviana* sobre la vejiga en los estudios experimentales de la toxicidad aguda, los cuales reflejan una distensión de la vejiga prominente a la autopsia de los animales, en la mayoría de los casos, principalmente en los que recibieron los extractos secos metanólico y acuoso, lo que no es observado en los que recibieron el extracto seco de acetato de etilo. Los posibles mecanismos por los cuales, están actuando los extractos secos metanólico, acuoso no se pueden definir con los resultados anteriores pero nos podría sugerir algunos mecanismos, por un lado que este actuando como una sustancia antagónica a nivel del parasimpático, esto ocasionaría la relajación del detrusor y contracción del trígono impidiendo así la liberación de la orina (micción), y por el otro, que este actuando a nivel del simpático generando la liberación de noradrenalina ocasionando relajación del detrusor y contracción del trígono. Para confirmar lo anterior es necesario realizar estudios adicionales con agonistas y antagonistas de los receptores que actúan a nivel autonómico.

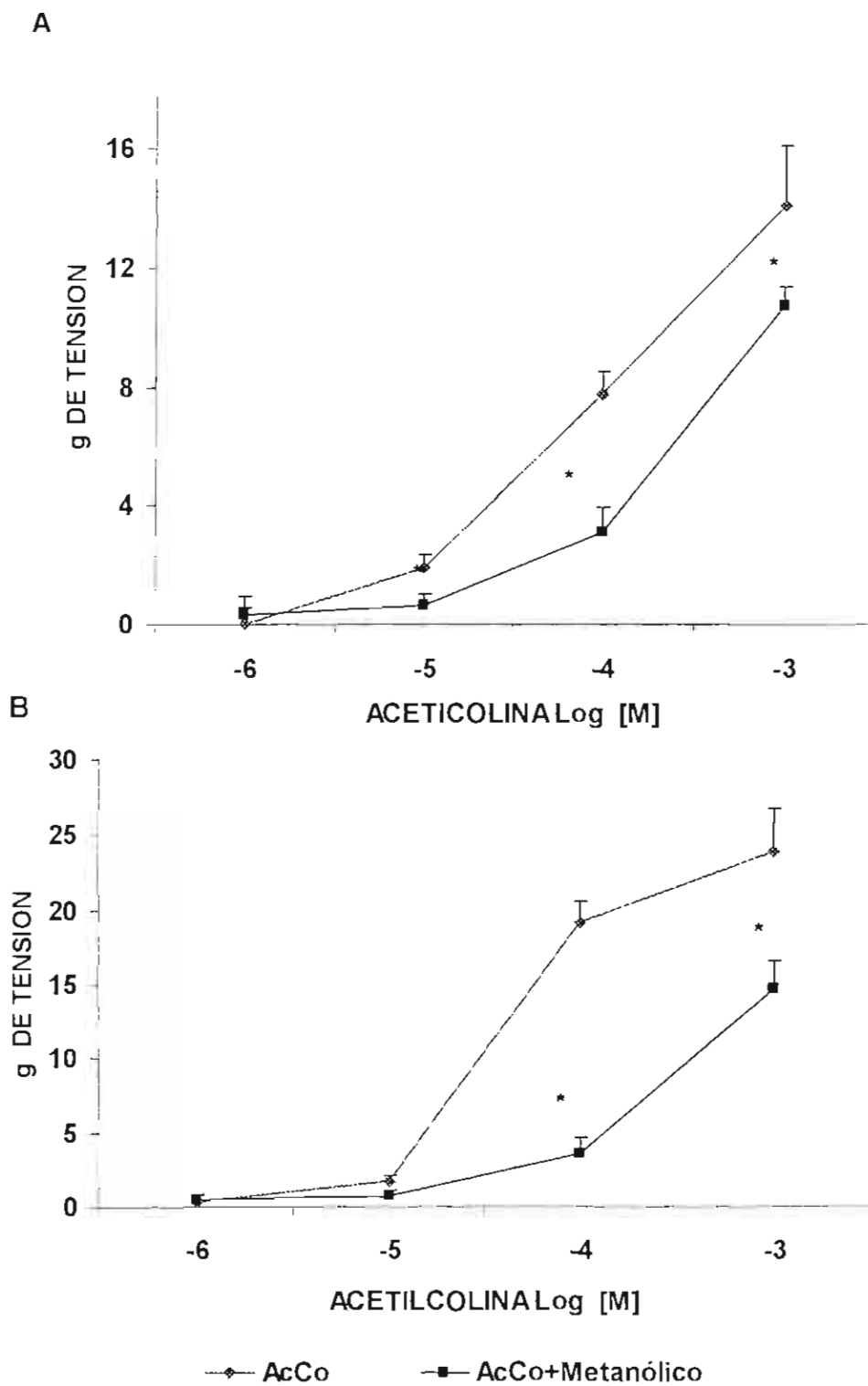


Fig.25 Curva dosis respuesta (CDR) a la acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco metanólico (666.66 $\mu\text{g/ml}$); obtenido de la semilla de *T. peruviana*, sobre vejiga aislada de rata: A) detrusor superior; B) detrusor inferior. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm E.E. (n = 8) * $p < 0.05$.

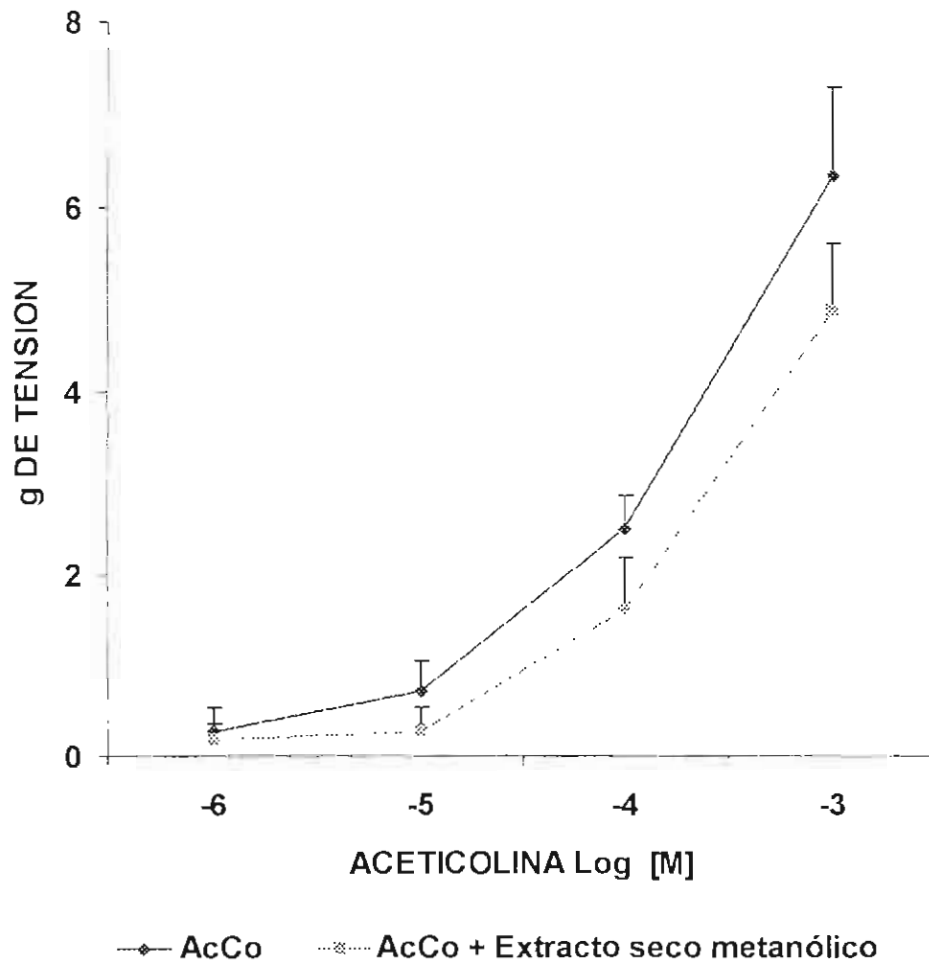
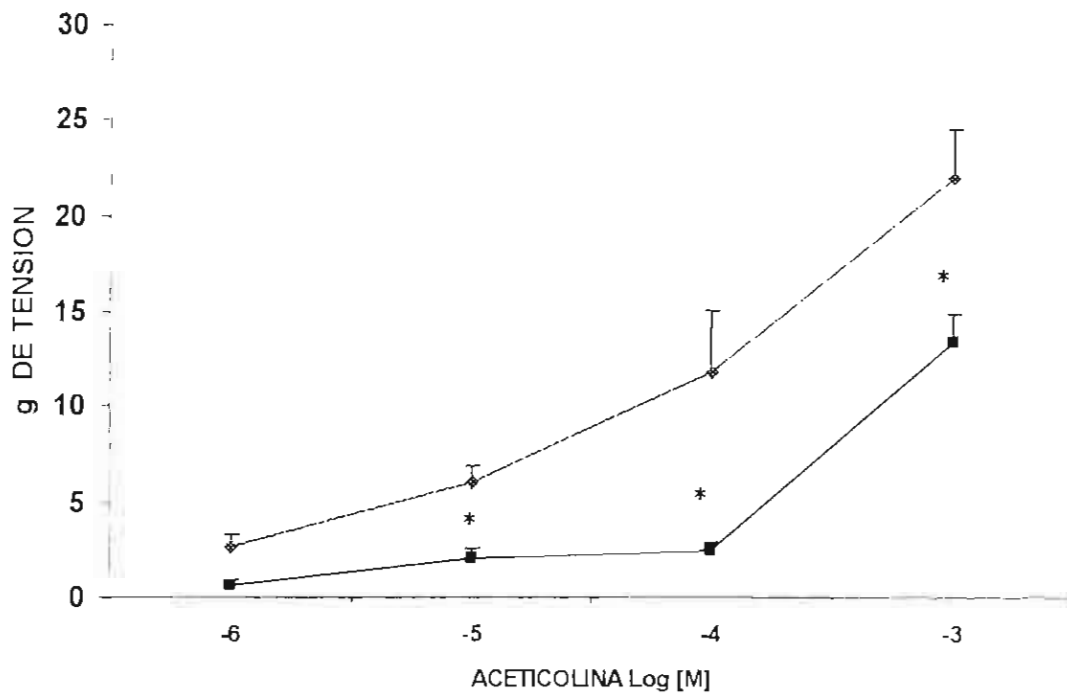


Fig.26 Curva dosis respuesta (CDR) a la acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto seco metanólico (666.66 $\mu\text{g/ml}$): obtenido de la semilla de *T. peruviana*, sobre el trígono de vejiga aislada de rata. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm E.E. (n = 8) *p<0.05.

A



B

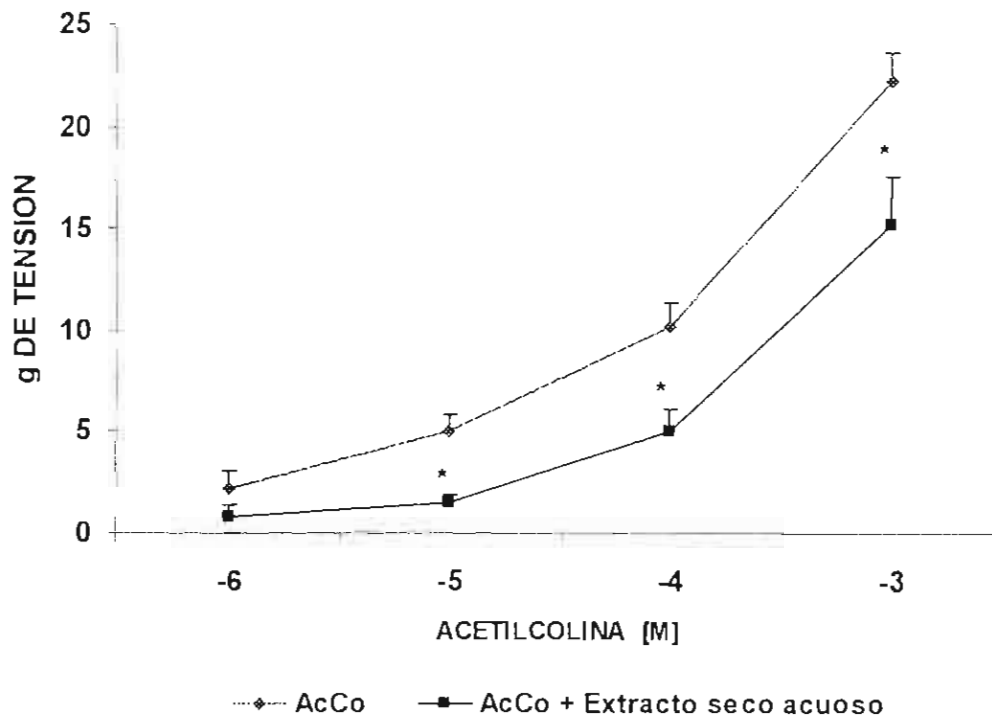


Fig.27 Curva dosis respuesta (CDR) a la acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto acuoso (666.66 $\mu\text{g/ml}$); obtenido de la semilla de *T. peruviana* sobre vejiga aislada de rata: A) detrusor superior; B) detrusor inferior. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm E.E. (n = 8) *p<0.05.

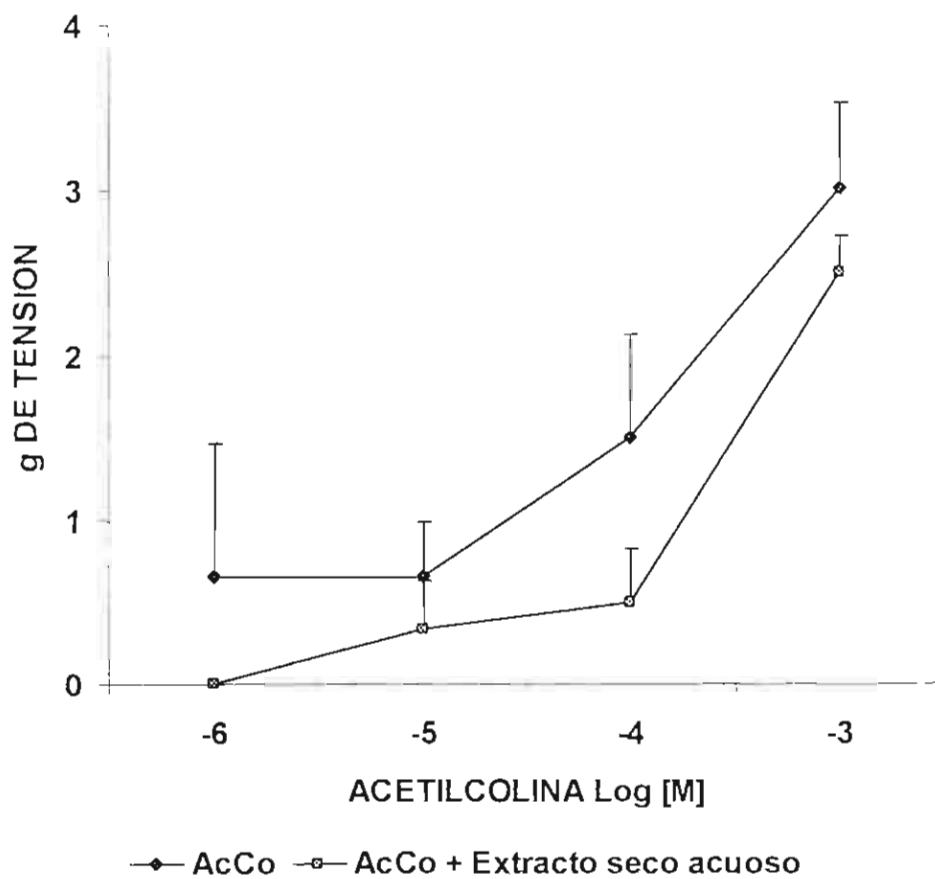


Fig.28 Curva dosis respuesta (CDR) a la acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto acuoso (666.66 $\mu\text{g/ml}$); obtenidos de la semilla de *T. peruviana* sobre el trigono de vejiga aislada de rata. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm E.E. (n = 8) * $p < 0.05$.

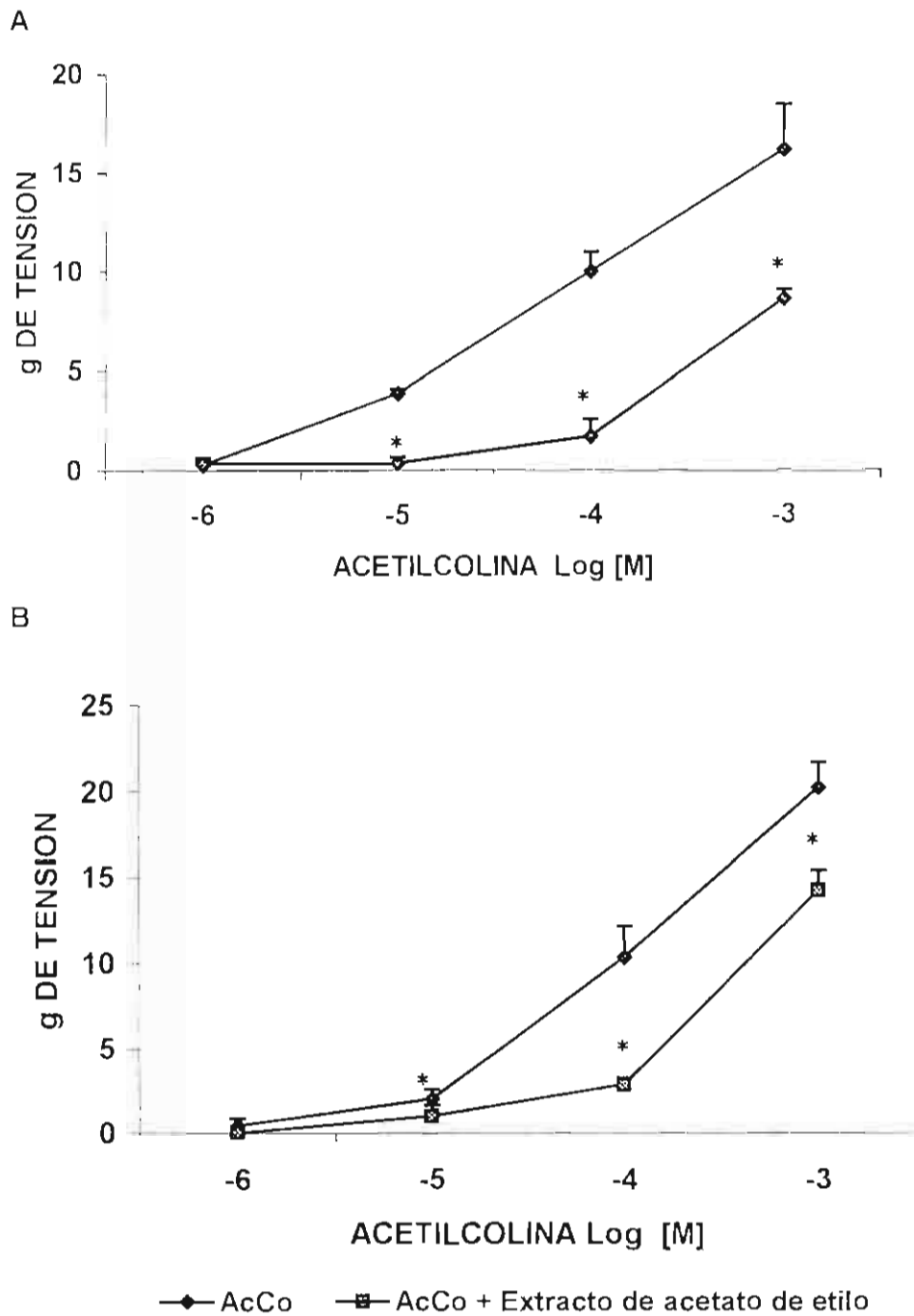


Fig.29 Curva dosis respuesta (CDR) a la acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto de acetato de etilo (1000 $\mu\text{g/ml}$); obtenidos de la semilla de *T. peruviana* A) detrusor superior; B) detrusor inferior de vejiga aislada de rata. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm E.E. (n = 8-9) * $p < 0.05$.

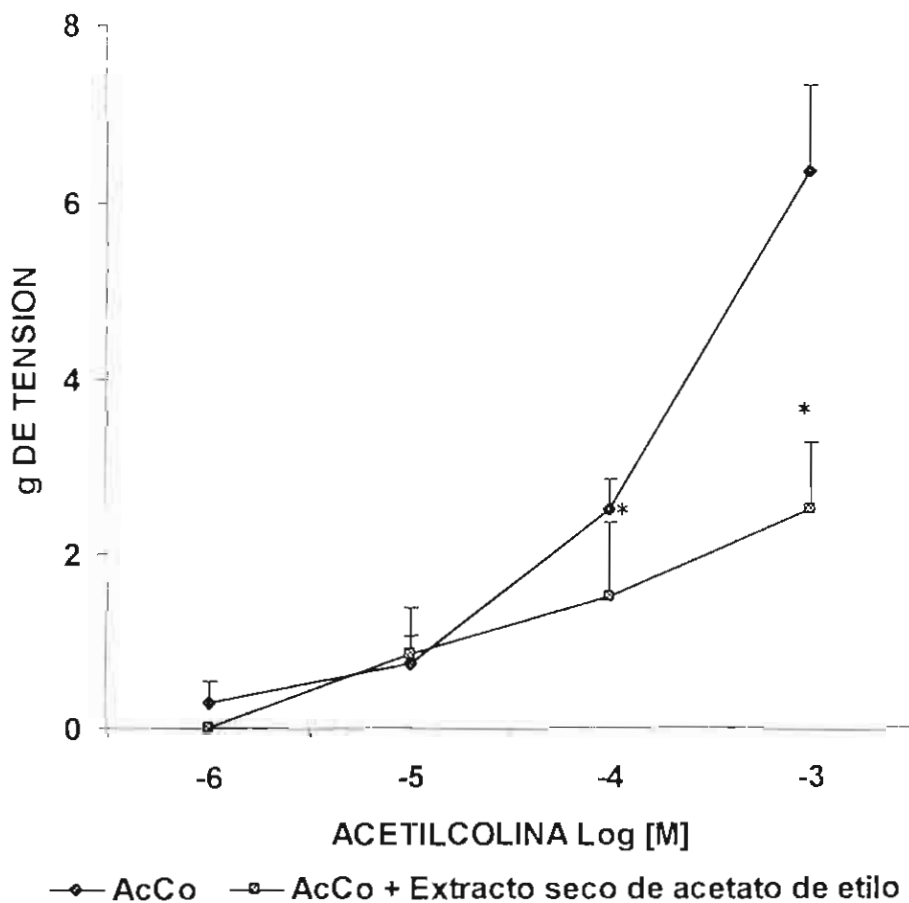


Fig.30 Curva dosis respuesta (CDR) a la acetilcolina sola (AcCo) y en presencia del extracto de acetato de etilo (1000 $\mu\text{g/ml}$) obtenido de la semilla de *T. peruviana* sobre el trígono de vejiga aislada de rata. Los resultados se expresan como el promedio en g de tensión \pm E.E. (n = 8) *p<0.05.

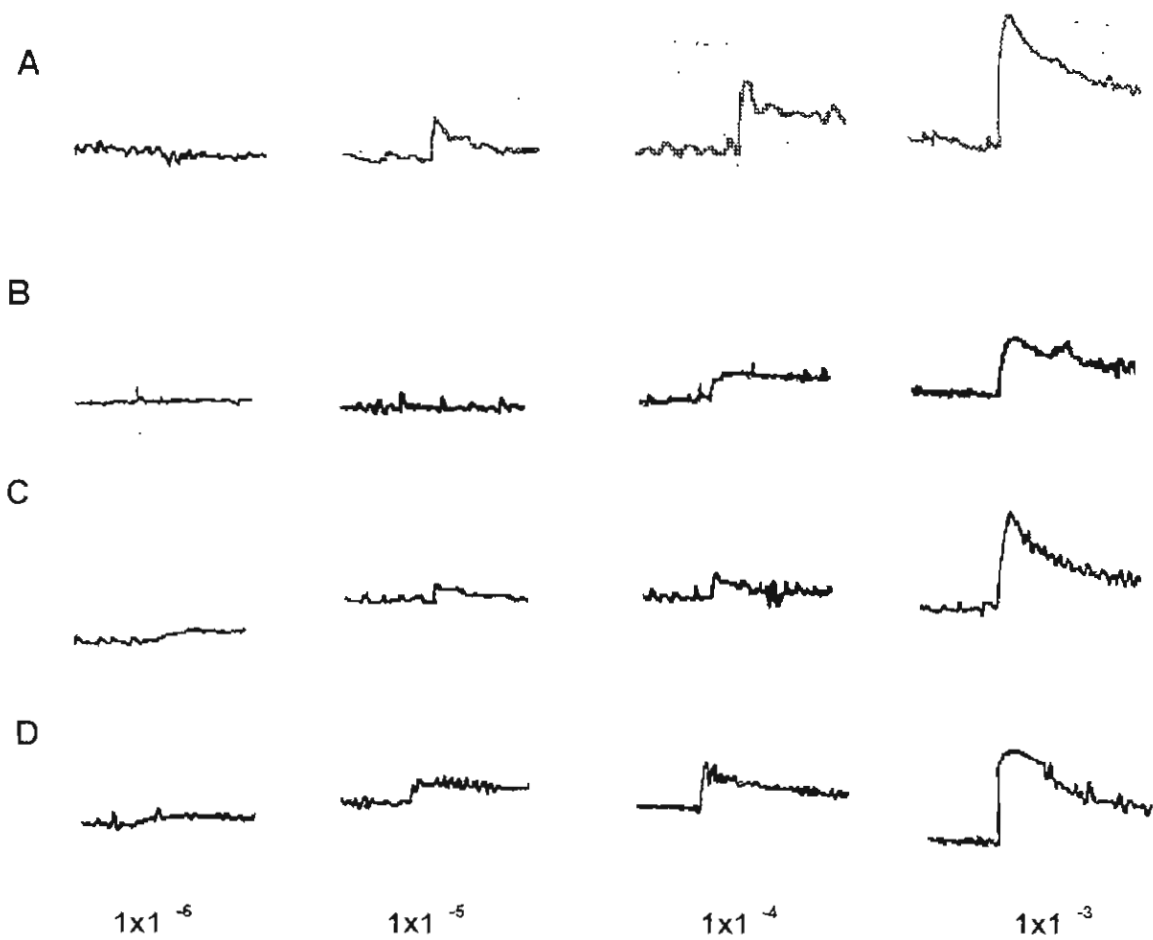


Fig 31. Representación poligráfica, efecto de los extractos secos de la semilla de *T. peruviana* en presencia de diferentes concentraciones de acetilcolina (1×10^{-6} – 1×10^{-3} M), sobre la actividad de la parte detrusora de la vejiga aislada de rata. A. acetilcolina sola; B) acetilcolina y el extracto seco de acetato de etilo; C. metanólico y D. acuoso.

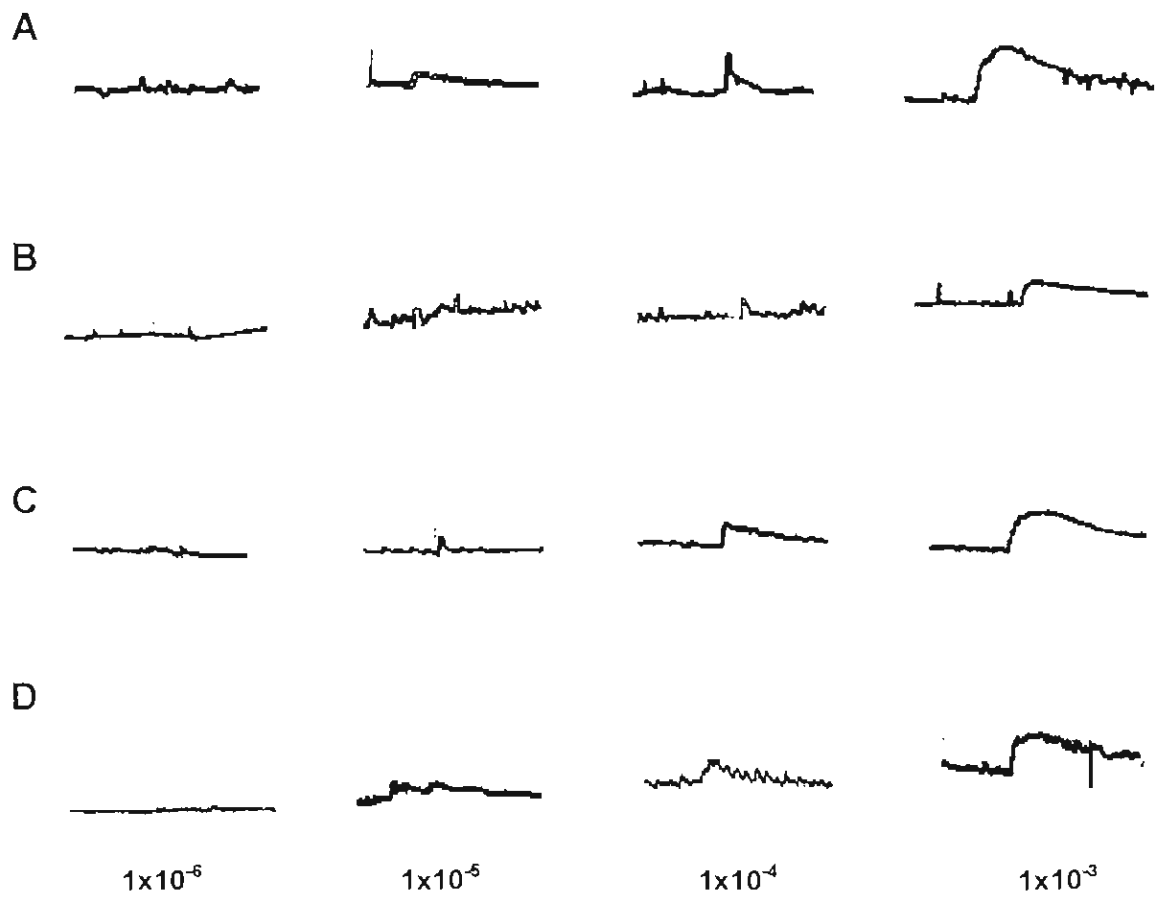


Fig 32. Representación poligráfica, efecto de los extractos secos de la semilla de *T. peruviana* en presencia de diferentes concentraciones de acetilcolina (1×10^{-6} – 1×10^{-3} M), sobre la actividad mecánica de la parte del trígono de la vejiga aislada de rata. A. acetilcolina sola y los extracto seco de B) acetilcolina (AcCo) + acetato de etilo; C) AcCo + metanólico; D).AcCo + acuoso.

VII. CONCLUSIONES

- Con base en la DL_{50} , inferimos que primariamente el extracto seco metanólico y secundariamente el acuoso contienen productos muy tóxicos.
- Las manifestaciones de toxicidad fueron claramente dependiente de la dosis y con: aumento de la base de sustentación, disminución de la fuerza muscular, distensión de la vejiga, mioclonias, muerte, así como un efecto hipotérmico fueron observadas con el extracto seco metanólico y acuoso.
- Los registros ECG obtenido de ratas que recibieron la semilla completa suspendida y los extractos metanólico y acuoso, mostraron alteraciones similares a los causados por la intoxicación digitálica como: bloqueo, extrasístoles, desnivel del segmento ST, cambio de voltaje, arritmias, fibrilación y paro cardiaco. El extracto seco de acetato de etilo no produjo cambios en el ECG.
- Los extractos secos acuoso y de acetato de etilo de la semilla de *T. peruviana* disminuyen la contracción producida por la acetilcolina en el músculo liso uterino. Sin embargo, en las primeras concentraciones el extracto metanólico aumenta la contracción producida por la acetilcolina sobre dicho músculo.
- Los extracto metanólico y acuoso generan un aumento contráctil del músculo liso intestinal mientras que el extracto obtenido con acetato de etilo no modifica la respuesta contráctil de la acetilcolina.
- El extracto seco acuoso relaja las porciones superior e inferior del músculo detrusor pero no modifica el trígono de vejiga de la misma manera el extracto seco obtenido con acetato de etilo relaja el detrusor y disminuye la contracción del trígono.

- Es necesario realizar el diseño de estudios adicionales para establecer el o los posibles mecanismos de acción que dan lugar a los efectos observados en los modelos *in vivo* e *in vitro*.

VIII. CONSIDERACIONES

Los resultados de la presente investigación muestran que diferentes extractos obtenidos de la semilla de *T. Peruviana*, producen diferentes acciones farmacotológicas en roedores. Este hecho indica la presencia de más de una sustancia activa y por lo tanto la necesidad de realizar fraccionamientos biodirigidos para encontrarlas y caracterizarlas farmacológicamente. Aun más, solo la investigación farmacotológica preclínica de las sustancias citadas hasta hoy en la semilla, permitiría establecer las dosis terapéuticas en padecimientos como la insuficiencia cardíaca y en el probable tratamiento de la obesidad. Meta que no esta lejos de alcanzarse si recordamos el caso precisamente de los digitálicos, que a pesar de su toxicidad continúan vigentes.

Por otra parte, vale la pena mencionar que nuestro estudio, corrobora la alta toxicidad de la semilla, motivo por el cual consideramos de suma importancia, la implementación de campañas de información que alerten a la población del alto riesgo de toxicidad que se adquiere al consumir la planta.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Farnsworth NR. Ethnopharmacology and future drug development: the North American experience. *J Ethnopharmacol* 1993; 38:145-52.
2. Fabricant DS, Farnsworth NR. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* 2001, 109 Sup 1: 69-75.
3. Lozoya X. Plantas, medicina y poder. Breve historia de la herbolaria mexicana, Ed. Pax, México 1994:5-25
4. Instituto Nacional Indigenista. Introducción. En: Argueta A. Cano LM, Rodarte ME. (Eds.). Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. México, 1994:15-34.
5. Roberts SB. Energy expenditure and the development of early obesity. *Ann New York Acad Sci* 1993; 699: 18-25.
6. Defunciones generales según causa de muerte 1991-1995, INEGI, México.
7. *Thevetia peruviana* (Pers) K. Schum. SEMARNAP. México.
http://www.semarnat.gob.mx/pfnm2/fichas/thevetia_peruviana.htm
8. Aguilar A. y Zolla C. Plantas tóxicas de México. Ed. Subdirección General Médica, IMSS México 1982: 196-98.
9. Rzedowski, J. and Calderón G. 1998. Apocynaceae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes. Fasc. 70. Instituto de Ecología, Pátzcuaro, Mich. 1998: 64-71
10. Martínez M. Las plantas Medicinales de México. Ed Botas. México, 1969: 73-76.
11. Martínez M. Catalogo de nombres vulgares y científicos de las plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México, 1979:196-98.
12. Langford SD and Boor PJ. Oleander toxicity: an examination of the human and animal toxic exposures. *Toxicology* 1996; 109:1-13.
13. Parikh CK. Parikh textbook of medical jurisprudence and toxicology, 4th ed. Bombay, medical Publication, 1989:912-14.

14. Schvartsman S. Plantas venenosas e animais peconhentos, 2nd ed. Sao Paulo, Savier, 1992:58-63.
15. Monroy C y Castillo P. Plantas medicinales empleadas en el estado de Morelos. CIB-UAEM. México, 2000: 45-46.
16. Oji O and Okafor QE. Toxicological studies on stem bark, leaf and seed kernel of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). Phytother Res, 2000; 1:135-5.
17. Saravanapavananthan N and Ganeshamoorthy J. Yellow oleander poisoning: a study of 170 cases. Forensic Sci Int 1988; 26:247-50.
18. Hug MM. Fitoterapia, México D.F. Ed. por Tlahui, México 1999; 7:5-9
19. Smith TW, Antman EM and Friedman PL. Digitalis glycosides: Mechanisms and manifestations of toxicity (parts I-III). Prog Cardiovasc Dis 1984; 26:413-58;495-540:27:21-56.
20. Middleton WS and Chen KK. Clinical results from oral administration of Thevetina cardiac glycoside. Am Heart J, 1936; 11:75-88.
21. Pearn J. Oleander poisoning. In: Toxic plants and animals Covacevich J. Davie P and Pearn J (Eds). A guide for Australia, 2nd ed. QLD Museum, Brisbane, 1987: 37-50.
22. Watt MW and Breyer-Brandwijk MG. The medicinal and poisonous plants of southern and eastern Africa. Edinburgh, E and S Livingstone, 1962:107-9.
23. Brester D. Herbal poisoning: a case report of a fatal yellow oleander poisoning from the Solomon islands. Ann Trop Pediatr 1986; 6:289-91.
24. Haynes BE, Bessen HA, Wightman WD. Oleander tea: herbal draught of death. Ann Emerg Med 1985; 14:350-53.
25. Morton J. Plants poisonous to people in Florida and other warm areas. Hurricane House, Miami, FL, 1971:12-25.
26. Pearn J. Oleander poisoning. In: Covacevich J. Davie P and Pearn J. Toxic Plants and animals. A guide for Australia 2nd ed. Brisbane: William Brooks 1989:37-50.
27. Saraswat DK, Garg PK, Saraswat M. Rare poisoning with *Cerebra thevetia* (yellow oleander): review of 13 cases of suicide attempt. J Assoc Physicians India 1992; 40:628-29.
28. Eddleston M, Ariarathnarn CA, Meyer WP, Perera G, Kularatne AM, Attapattu S, Sheriff MH and Warrell DA. Epidemic of self-poisoning with seeds of the yellow

oleander tree (*Thevetia peruviana*) in northern Sri Lanka. Trop Med Int Health 1999; 4:266-73.

29. Sreeharan N. Yellow oleander poisoning-clinical manifestations and prognostic criterio. Jaffna Med J 1985; 20:100-101.

30. Eddleston M, Ariarathnarn CA, Sjöström L, Jayalath S, Rajakanthan K, Rajapakse S, Colbert D, Meyer WP, Perera G, Attapattu S, Kularatne SAM, Sheriff MR and Warrell DA. Acute yellow oleander (*Thevetia peruviana*) poisoning: cardiac arrhythmias, electrolyte disturbances, and serum cardiac glycoside concentrations on presentations to hospital. Heart 2000; 83:301-6.

31. Arnold H L, Middleton WS, Chen KK. The action of thevetin a cardiac glycoside and its clinical application. Am J Med Sci, 1935; 189:193-206.

32. Kelly RA, Smith TW. Recognition and management of digitalis toxicity. Am J Cardiol 1992; 69:108-19.

33. Boletín oficial de la Nación. Disposición n° 1788/2000. Drogas que deben excluirse como constituyentes de Medicamentos Fitoterápicos. 1637/2001.

34. Norma Oficial Mexicana NOM-009-RECNAT-1996, Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 16 de enero de 1995.

35 Norma Oficial Mexicana NOM-005-RECNAT-1997, Sistema General de Unidades de Medida, publicada en el Diario Oficial de la Federación el 12 de enero de 1995.

36. Domínguez X. Métodos de investigación fotoquímica. 3a ed., Limusa, México, 1985; pp 195-209.

37. Schmidt RF. Nutrición. En Fisiología humana, HV Ulmer, McGraw Hill-Interamericana, 1993:744-48.

38. Zbinden G and Flury-Roversi M. Significance of the LD₅₀-test for the toxicological evaluation of chemical substances. Arch Toxicol. 1981; 47:77-99.

39. U. S. Food and Drug Administration Center for Food Safety and Applied Nutrition. In : Toxicological principles for the safety assessment. Washington, DC. 1993.

40. Miller L.C. and Tainter M.L. Estimation of ED₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph papers. Proc Soc Biol Med 1944, 57:261-65.

41. Litchfield JT and Wilcoxon A.A. Simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther* 1949; 96:99-113.
42. Wartak J. Interpretación del electrocardiograma. 2a ed. Interamericana, S. A. de C. V. 1985:1-12
43. Staff of the Department of Pharmacology, University of Edinburgh and McLeod LJ. Pharmacological experiments on intact preparations. E & S. Livingstone, Edinburgh and London, 1970: 72-75.
44. Vidrio H, Magos GA and Lorenzana JM. Electrocardiographic effects of toluene in the anaesthetized rat. *Arch Int Pharmacodyn* 1986; 279:121-29.
45. Wang H, Eriksson H, Sahlin L. Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the oestrous cycle. *Biol Reprod* 2000, 63(5):1331-
46. Perry WLM. Pharmacological experiments on isolated preparations. E & S Livingstone, Edinburgh and London 1970:1-95.
47. Kenakin TP. The classification of drug receptors in isolated tissues. *Pharmacol Rev* 1984; 36:162-222.
48. Favaeus M, Fujiwara M, Hogestatt ED, Persson K and Adersson KE. A non-nitroergic smooth muscle relaxant factor released from rat urinary bladder by muscarinic receptor stimulation. *Revista J Urol* 1999; 161:649-53.
49. Tallarida RJ and Jacob LS. The dose-response relation in pharmacology. Springer-Verlag, New York, 1979.
50. Irwin S. Considerations for the preclinical evaluation of new psychiatric drugs: a case study with phenothiazine-like tranquilizers. *Psychopharmacology* 1966; 9:259-87.
51. Martínez ME, Moreno LA, Luna M, Magos GA, Aguilar A and Campos AE. Acute toxicity of *Thevetia peruviana* in rodents. *Proc West Pharmacol Soc* 2002; 45:131-33.
52. Gosselin RE, Hodge HC, Smith RP, Gleason MN. *Clinical Toxicology of Commercial Products*. 4a. ed. Williams and Wilkins, 1981:1-4
53. Guyton AC. *Fisiología y fisiopatología*. 5a ed, Interamericana McGraw-Hill 1994: 31-118

A N E X O S

PUBLICACIÓN INTERNACIONAL

Acute Toxicity of *Thevetia peruviana* in Rodents

MARÍA ELENA MARTINEZ ENRIQUEZ*, LUIS ANTONIO MORENO RUIZ, MANUEL LUNA ROSAS,
GIL ALFONSO MAGOS GUERRERO, ABIGAIL AGUILAR CONTRERAS¹
& ALFONSO EFRAÍN CAMPOS SEPULVEDA

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, C.P. 04510 Mexico, D.F.

¹Herbario IMSSM, Avenida Cuauhtémoc 330, C.P. 06725 Mexico, D.F.

*e-mail: elenam@servidor.unam.mx

Thevetia peruviana (Apocynaceae), native to tropical America, is a small tree or bush that grows 5 to 9 feet high. The dotted leaves have a dark green surface. The yellow or orange flowers measure 7.5 cm length. The tender fruit has a yellow or red coloration which when mature changes to black (Fig 1). Each fruit contains 2 seeds. Removing a seed's skin reveals the kernel [1,2]. The tree is distributed throughout Mexico, in tropical and subtropical regions of Baja California, Campeche, Chiapas, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacan, Nayarit, New Leon, Oaxaca, Puebla, San Luis Potosi, Tabasco, Veracruz and Yucatan. *T. peruviana* receives different common names in different areas [1,3].

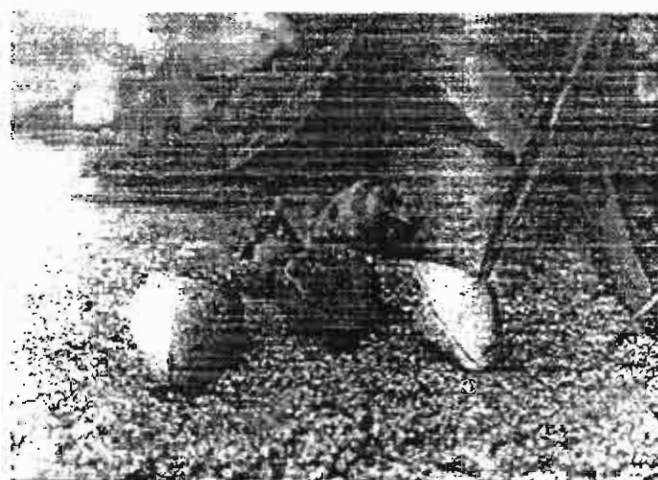


Figure 1. Fruit of *Thevetia peruviana*. *T. peruviana* grows widely in regions of the tropics and subtropics. Each fruit contains 2 seeds.

Chemical and pharmacological studies demonstrate that the whole plant, particularly the seeds, contains potentially harmful cardiac glycosides (thetevins A and B, thevetoxin, nerifolin, perevoside and ruvoside) [3]. Ingestion of the seeds produces a clinical picture very similar to that of digoxin poisoning: vomiting, dizziness changes EKG, bradycardia, and AV block. Less common signs and symptoms include diarrhoea, abdominal pain, ectopic beats and palpitations [4,5].

Fatal poisonings with *T. peruviana* have been reported in diverse parts of the world [7-11]. The first cases happened in Jaffna in Sri Lanka between 1981 and 1983. Accidental poisoning occurs in Australia during 1972-78 and Texas during 1994. However the seeds of *Thevetia peruviana* are widely used to reduce body weight in Mexico. It has been suspected that empirical use is related to numerous intoxications with fatal consequences [12]. However, scientific evidence is lacking that indicate this correlation. On the other hand, systematized toxicological studies in animals do not exist. In the present study, we identify the toxic effects of acute administration of *T. peruviana* seed in rodents.

METHODS: Male adult Taconic mice obtained from farms with body weights of 25 to 30 g were used in this study. The animals were maintained in the same environmental conditions of temperature controlled room ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), and illumination (12x12 h light - darkness cycle) and maintained with free access to water and food.

The LD₅₀ determination. Fifty mice were randomly divided into five groups (10 in each group). The experimental groups received the seed milled in saline solution through a gastric tube, at several dose levels (78.13, 156.25, 312.5, 468.75, 625 and 937.5 mg/kg). The control group received only the vehicle (saline physiological solution), at a volume of 0.1 ml/10 g of body weight. The rectal temperature (YSI tele-thermometer) was measured before, and at 30, 60 and 120 min after the seed administration. The animals were placed in individual cages and were observed continuously during the first 4 h [13,14,16]. The analysis of the LD₅₀ was evaluated using the graphic method of Tainter and Miller [15].

Cardiac toxicity studies. Electrocardiographic profile (ECG) was carried out in Male rats of the Wistar strain, weighing from 250 to 300 g, and maintained in experimental conditions similar to those mentioned previously. Milled seed suspended in saline solution was administered po and 15 min later the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (40 mg/kg; ip). The rat was held in dorsal decubitus and se electrodes were placed in the anterior and posterior limbs. The electrocardiographic activity was registered through a FT03 transducer connected to a Grass 79D polygraph at a paper speed of 25 to 50 mm/s [16]. Cardiac rate and the arrhythmias were quantified as all or nothing responses [17]. This study was carried out with permission of the Local Animal Care Committee under the provisions of the Declaration of Helsinki.

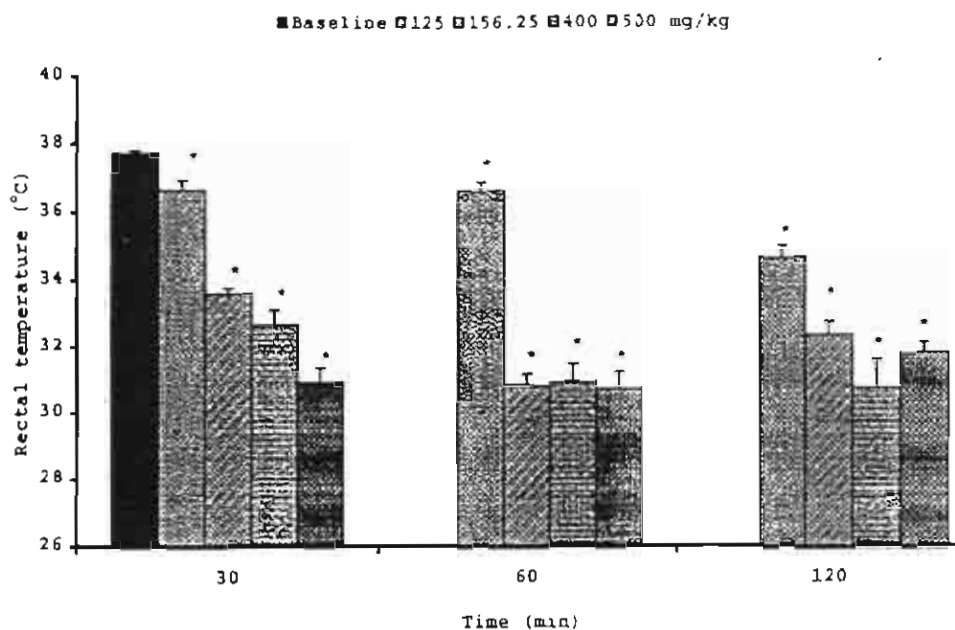


Figure 2. Temporal course of rectal temperature after the administration of *Thevetia peruviana*. Each point represents the mean \pm SEM (n= 8-10 animals per group). *p < 0.05

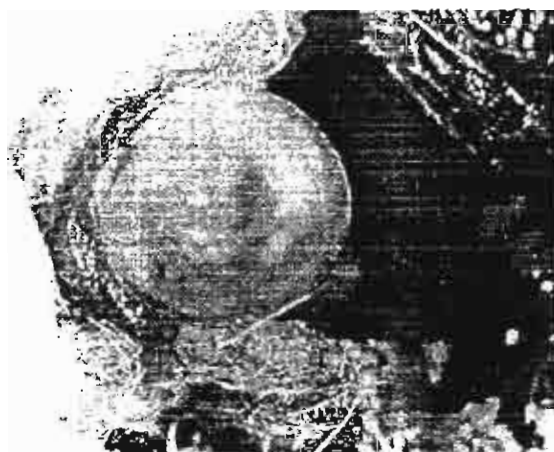


Figure 3. Autopsy of rat treated with *Thevetia* seed show a marked bladder distention in relation to the control group

RESULTS AND DISCUSSION: The clinic manifestations of toxicity that mice display after oral administration of the seeds are tremor, restlessness, muscular relaxation, dyspnea, tachypnea, severe hypothermia, urinary retention, generalized seizures and death. The latency period for toxic manifestations to occur is 7-10 min and the lethality appears within the first 24 h. The medium lethal dose obtained from the graphical method of Tainer and Miller [15] is 447 mg/kg, placing it at a toxic index of 4. A significant hypothermic effect was observed ($p < 0.05$) which was dose-dependent and with a tendency to recovery after 120 min (Fig. 2). The autopsy consistently revealed a marked bladder distention that possibly explains

the micturition reflex decrease, with acute urinary retention, prior to death (Fig. 3). The electrocardiographic registry of the rats showed alterations that are related to signs of digitalis poisonings, such as blocking, extrasystoles, ST segment down-sloping, voltage shift, arrhythmias, fibrillation and cardiac arrest (Fig. 4). We conclude that *T. peruviana* is highly toxic. It induces a series of behavioral, autonomic and metabolic alterations that can be lethal. Further studies are needed in order to characterize these effects as well as to isolate from the plant the components that are responsible for the toxic activity.

ACKNOWLEDGEMENTS: We thank Mr Antonio Vidal Caracheo for her excellent technical assistance

REFERENCES

1. Peam J: Oleander poisoning. Brisbane: William Brooks 37 (1989)
2. Tampion J: Dangerous Plants. Universe Books, New York, New York (1977).
3. Aguilar A & Zolla C: Editada por la subdirección General Medica 196 (1982)
4. Sreeharan N, Putharasingam S, Ramadaiyalai K, Satkuranathan K & Ganeshamoorthy J: Jafna Med J 20: 100 (1985).
5. Saravanaprasanthan N & Ganeshamoorthy J: Forensic Sci Int 26: 247 (1988).
6. Watt MW & Breyer-Brandwijk MG: Edinburgh, E & S Livingstone 107 (1962)
7. Brester D: Ann Trop Paediatr 6: 289 (1986)
8. Haynes BL, Bessen HA, Wightman WD: Ann Emerg Med 14: 350 (1985).
9. Osterloh J: J Anal Toxicol 12: 53 (1988)
10. Ansford AJ & Morris H: Med J Aust 1: 360 (1981)
11. Saraswat DK, Garg PK & Saraswat M: J Assoc Physicians India 40: 628 (1992).

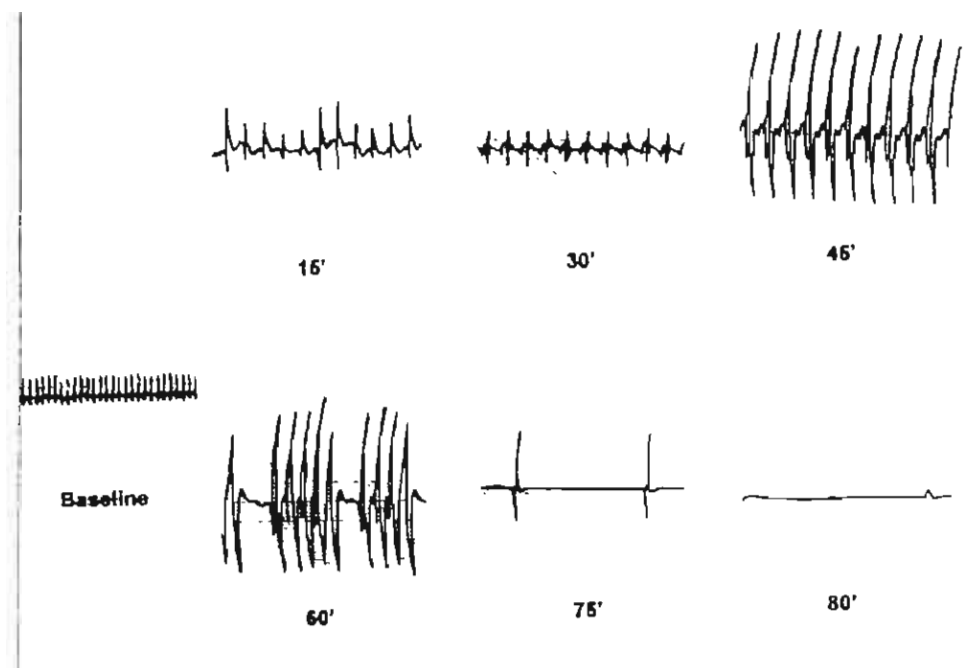


Figure 4. Electrocardiographic recording of rat during baseline period and 15, 30, 45, 60, 75 and 80 min (500 mg/kg; po) after *Thevetia peruviana* administration.

12. Boletín de la Dirección de Regulación y Fomento Sanitario emitido por los Servicios de Salud de Veracruz (1999).
 13. Litchfield JT & Wilcoxon F: *J Pharmacol Exp Ther* 96: 99 (1949)
 14. Zbinden G & Flury-Roversi M: *Arch Toxicol* 47: 77 (1981).

15. Miller LC & Tainter ML. *Proc Soc Exp Biol Med* 57: 261 (1944)
 16. Vidrio H, Magos GA & Lorenzana JM: *Arch Int Pharmacodyn* 279: 121 (1986)

CONGRESOS

WESTERN PHARMACOLOGY SOCIETY

**ASOCIACIÓN MEXICANA DE
FARMACOLOGÍA A.C.**

CERTIFY THAT THE STUDY ENTITLED:

ACUTE TOXICITY OF *Thevetia peruviana* IN RODENT

By M.E. Martínez, L.A. Moreno, M. Luna, G.A. Magos, A. Aguilar and

WAS PRESENTED AT THE JOINT MEETING
45th Annual Meeting of the Western Pharmacology Society
XXV Congreso Nacional de Farmacología

In Memoriam
Dr. Thomas F. Burks

Mazatlán, Sinaloa, México, January 27th to February 1st, 2002.



DR. FRANCISCO J. FLORES MURRIETA

PRESIDENT OF THE WPS

DR. FRANCISCO J.

PRESIDENTE D

El Departamento de Ciencias de la Salud
otorga la presente

CONSTANCIA A

Martínez-Enríquez María Elena, Moreno-Ruiz Luis Antonio, Luna Rosas Manuel, Magos
Guemero Gil Alfonso, Aguilar-Contreras Abigail, Victoria Jayme Ascencio y Campos
Sepúlveda Alfonso Efraín.

Por su participación en el

VII Simposio del Departamento de **CIENCIAS DE LA SALUD**

Que se llevó a cabo del 7 al 9 de octubre en la Sala Cuicacalli de esta Unidad,
con el trabajo titulado

TOXICIDAD AGUDA DE THEVETIA PERUVIANA EN ROEDORES.

Mexico D. F. octubre del 2002

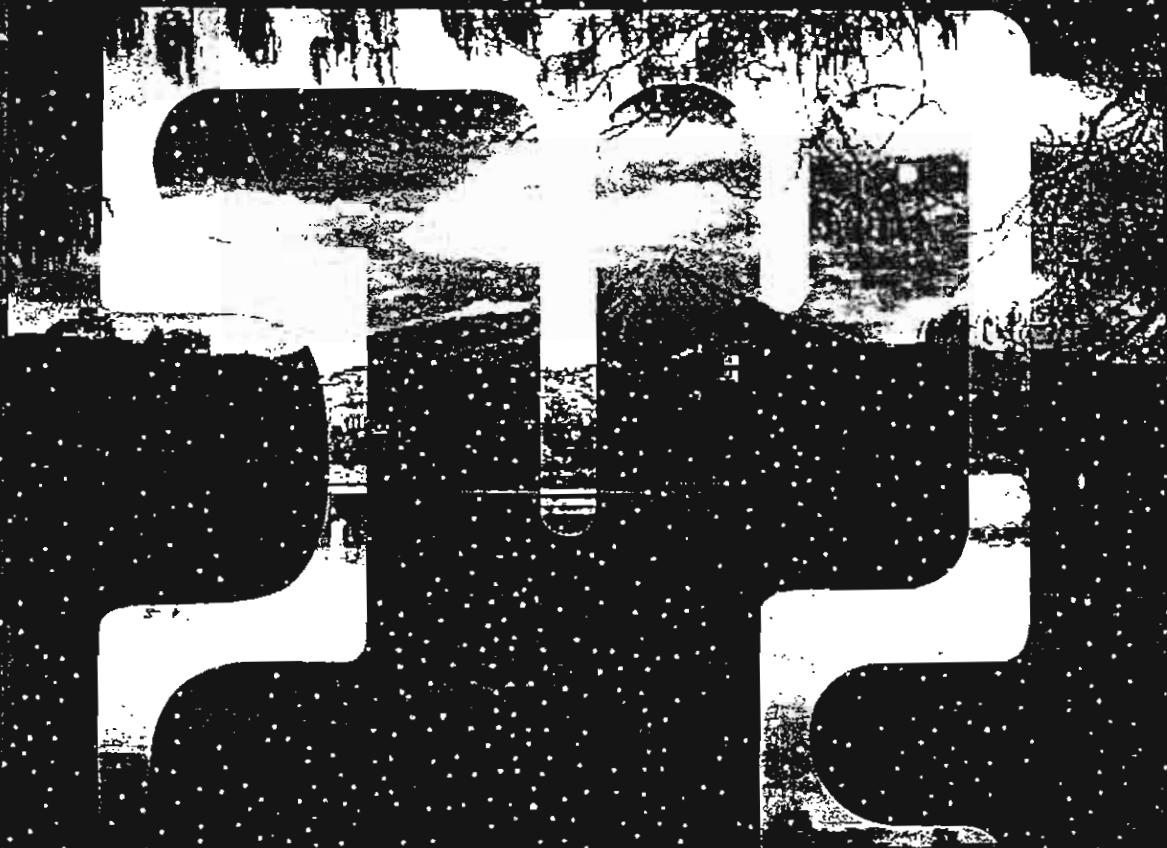
Dra. A. Rocío Ortiz Muñiz
Jefa del Depto. De Ciencias de la Salud

Biól. Alma Gpe. Arellano Meneses
Coordinadora

**SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

XLV

**CONGRESO NACIONAL
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

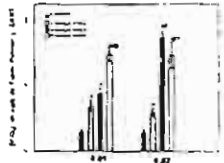


**Universidad de Colima
8-12 de septiembre de 2002**

VARIACION EN LA CONCENTRACION DE VANADIO EN PULMON. RELACION CON DOSIS Y TIEMPO DE EXPOSICION. Sánchez-Cervantes I* (Avalado por Selva Rivas Arancibia), Espejel Maya G*, Saldivar Osano L*, Lopez Martinez I*, Colin-Barenque L*, Acevedo Nava S*, Delgado V*, Avila-Casado MC, Gonzalez V.A., Avila-Costa MR*, Fortoul T.I*., Fac. Medicina, Fac. Química, F.E.S. Iztautla, UNAM

El vanadio (V) se ha incrementado en la atmósfera de la Cd. de México y es de importancia estudiar como se modifica la concentración del metal en el pulmón, que es su sitio de ingreso, en diferentes tiempos de inhalación. Se utilizó un modelo en ratón % CD-1 que inhaló durante 4 semanas una hora diaria con 2 diferentes concentraciones (0.01M y 0.02M). El V se determinó por Espectrofotometría de Absorción Atómica con horno de grafito. Las concentraciones de V aumentaron a mayor número de inhalaciones (ver grafica). Nuestros resultados muestran que con mayor tiempo de exposición las concentraciones de V aumentan, lo que implicaría que, de mantenerse las tendencias actuales de contaminantes en el ambiente, el V será un problema de salud en el futuro, por sus efectos tanto pulmonares, como probablemente en otros órganos
DGAPA 210301 y P.O.S. Institute

DETERMINACION DE VANADIO EN PULMON



EFFECTO DE LA INGESTA PRE- Y POSTNATAL DE ETANOL SOBRE EL NUMERO DE NEURONAS DEL CIRCUITO TRISINAPTICO DEL HIPOCAMPO DE LA PROGENIE DE RATAS. González-Burgos, I y Velázquez-Becerra, C.* Laboratorio de Psicobiología, Centro de Investigación Biomédica de Mérida, IMSS, / Div. de Est. de Posgrado, Fac. de Med., UMSNH Mérida, Méx.

La exposición prenatal a etanol produce alteraciones neuropsicológicas diversas. Se han descrito efectos sobre estirpes neuronales hipocámpicas específicas en etapas circunscritas del desarrollo cerebral. En el presente estudio se cuantificó la proporción de células del circuito trisináptico del hipocampo de la progenie de ratas sometidas a ingesta pre- y postnatal de etanol. Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley adultas, a las que se les proporcionó a) etanol al 20% (v/v) en el agua de beber (grupo E), b) sacarosa al 15% (p/v) en el agua de beber (grupo C), o c) agua y alimento a libre acceso (grupo T). El líquido y el alimento proporcionados al grupo C lo fueron en forma pareada respecto al grupo E. Los tratamientos abarcaron desde 20 días antes de la gestación hasta el destete de las crías. Se cuantificó el número de neuronas granulares del giro dentado y de los campos CA3 y CA1 del hipocampo, a los 21, 40 y 90 días de edad postnatal, en seis ratas macho por edad por grupo. Hubo menos neuronas granulares en el giro dentado a los 21 y 40 días, en tanto que en el campo CA3 ocurrió lo mismo a los 90 días. Por su parte, en el campo CA1 se observaron menos neuronas en todas las edades estudiadas. Dado el flujo unidireccional de información a través del circuito trisináptico, la diferente proporción de muerte neuronal observada podría estar relacionada con la desorganización y el deterioro de los procesos neuropsicológicos asociados a la actividad hipocámpica.

TOXICIDAD AGUDA DE *Thevetia peruviana* EN ROEDORES Martínez-Enríquez, M.E*, Moreno, L.A*, Luna, M*, Magos, G.A*, Aguilar, A* y Campos-Sepúlveda, A.E. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, *Hertano IMSSM.

La semilla de *Thevetia peruviana* (Apocynaceae), conocida como codo de fraile, se ha utilizado para reducir el peso corporal, el uso empírico e indiscriminado ha sido causa de numerosas intoxicaciones con consecuencias fatales, por lo que, el objetivo del presente estudio es identificar los efectos tóxicos de la administración aguda de la semilla de *Thevetia* en roedores. Se utilizaron ratones macho de 25 a 30 g de peso corporal, a los cuales, se les administró la semilla a varios niveles de dosis (156.25, 312.5, 625 y 935 mg/kg.) por el grupo control únicamente recibió el vehículo (solución salina). Se midió la temperatura rectal, antes y a los 30, 60 y 120 min. después de la administración de la semilla. Los animales se observaron continuamente durante las primeras cuatro horas y se registró las manifestaciones de toxicidad. Se realizó un electrocardiograma (ECG) en un macho de 250 a 300 g de peso corporal. Los roedores mostraron temblor, aumento de la base de sustentación, relajación muscular, taquipnea, hipotermia marcada, retención urinaria, disnea, convulsiones generalizadas y muerte. El ECG que se practicó a las ratas mostró severas alteraciones con las características de la intoxicación digitalica. La necropsia realizada mostró acentuada dilatación de la vejiga. Los hallazgos del estudio señalan que el hueso de fraile es un producto muy tóxico (categoría toxicológica 4).

CUANTIFICACIÓN DE LOS CAMBIOS DEL POTENCIAL EN MEMBRANAS DE *Manduca sexta* INDUCIDOS POR LA TOXINA BACTERIANA CryIAb MEDIANTE ENSAYOS DE FLUORESCENCIA. Muñoz-Garay, C* (avalado por Félix Ricardo) Gómez, I* Sánchez, J.* Darszon, A* y Bravo A*. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Cuernavaca, Morelos México

Las toxinas (Txs) Cry de *Bacillus thuringiensis* son proteínas que se almacenan como cristales en la bacteria en su fase de espora. Las Txs Cry tienen como blanco diferentes especies de insectos principalmente, muchos de los cuales son plaga en cultivos o vectores de organismos que afectan la salud pública. Estas Txs son potenciales bioinsecticidas. El blanco molecular de las Cry es una clase de amino peptidasa y una proteína tipo cadena presentes en la microvellosidad apical (MV) de las células epiteliales del intestino de las larvas, estos receptores ayudan en la formación de poros en la membrana que permiten el flujo de iones y un desbalance osmótico que provoca lisis celular y muerte del individuo. La complicada morfología de las células ha impedido al momento realizar registros electrofisiológicos directamente en la célula blanco, sin embargo, vesículas de este epitelio, han ayudado a realizar ciertas interpretaciones de la selectividad iónica de la Tx.

En el presente trabajo se estudiaron los cambios del potencial de membrana (E_m) inducidos por las Txs Cry en vesículas de membranas del epitelio de intestino medio de *M. sexta* (Plaga de la planta del tabaco) mediante un colorante positivo fluorescente sensible al E_m , la cianina diS-C3(5). Dado que el E_m está determinado por la distribución de los iones y que la Tx altera tal distribución, este sistema resulta una buena herramienta para valorar la eficiencia de formación de poro de las Cry y también una forma de valorar las permeabilidades intrínsecas a K^+ de estas células. Considerando que el receptor es el "ancla" de la Tx y éste se encuentra en la MV apical del intestino, en el presente trabajo se desarrolló un nuevo protocolo de purificación de membranas que permite el enriquecimiento de la MV y la eliminación de los canales de las membranas basolaterales, lo cual incrementa la eficiencia formadora de poro de la Tx y disminuye la permeabilidad endógena a K^+ , sensible a Ba^{2+} y TEA⁺.