

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS



**Toxicidad subaguda del extracto acuoso de hojas de chichipince *Hamelia patens*
Jacq (Rubiaceae) en ratones cepa NIH de laboratorio.**

POR:

DENIS ADONAY MORALES PEÑA.

SAN SALVADOR 19 DE NOVIEMBRE DE 2018

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**Toxicidad subaguda del extracto acuoso de hojas de chichipince *Hamelia patens*
Jacq (Rubiaceae) en ratones cepa NIH de laboratorio.**

POR:

DENIS ADONAY MORALES PEÑA.

**REQUISITO PARA OPTAR AL TITULO DE:
LICENCIADO EN MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA.**

SAN SALVADOR 19 DE NOVIEMBRE DE 2018.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR.

RECTOR:

LIC. M. SC. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO.

SECRETARIO GENERAL:

LIC. CRISTÓBAL HERNÁN RÍOS BENÍTEZ

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

DECANO:

ING. M. Sc. JUAN ROSA QUINTANILLA QUINTANILLA

SECRETARIO:

ING. M. Sc. LUIS FERNANDO CASTANEDA ROMERO.

JEFA DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINARIA:

MVZ. ROSY FRANCIS ALVARENGA ARTIGA.

DOCENTES DIRECTORES.

MVZ. RAMÓN OVIEDO ZELAYA.

LIC. MIGUEL ÁNGEL MORENO MENDOZA.

COORDINADORA GENERAL DE PROCESOS DE GRADUACION.

MVZ. MARÍA JOSE VARGAS ARTIGA

RESUMEN.

El estudio completo se realizó en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Utilizándose 45 ratones albinos suizos machos y hembras de la cepa NIH provenientes del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA), con peso entre 20-25g, mantenidos a una temperatura y humedad relativa controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y entre 50-60% respectivamente, con ciclo de luz - oscuridad de 12/12 horas. El extracto acuoso de hojas de *Hamelia patens Jacq* (chichipince) se preparó en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador y se evaluó mediante ensayos de toxicidad subaguda por 28 días por vía oral, utilizando dos dosis de T1: 100 y T2: 200 mg/kg de peso vivo para ambos sexos. Los métodos empleados fueron los descritos por la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD). Se evaluaron Parámetros Clínicos, Pesos corporales, Hematología, Química Sanguínea, Pesos y Tallas de órganos. Los resultados fueron analizados con el programa estadístico SPSS 21 mediante un análisis de T-student para muestras independientes. Los resultados son presentados con sus Medias (X), Aumentos porcentuales para pesos vivos (%), Desviación estándar (XS), Significancia Bilateral (P valor) cuando ($P < 0.05$). En cuanto a los parámetros clínicos, no se evidencio signos de toxicidad por la sustancia. Los pesos corporales mostraron tendencia al incremento en sus promedios semanales y la comparación entre aumentos porcentuales entre grupos tratamientos y su control presentaron diferencias estadísticas significativas para ambos sexos. En Hematología se observan promedios similares en todos los parámetros para ambos sexo, únicamente el parámetro de Plaquetas en grupos tratamientos de hembras presentaron diferencias estadísticas significativas. Para La Bioquímica sanguínea únicamente grupos de hembras presentan diferencias estadísticas significativas la comparación entre grupos tratamientos con su control, los parámetro de Bilirrubina total para T2, Nitrógeno ureico para T1 y Transaminasa glutámica oxalacetica para T2. Las muestras sanguíneas fueron analizadas en el Laboratorio clínico del Hospital Nacional Rosales de San Salvador. También se realizaron necropsias y estudio macroscópico de órganos. En grupos tratamientos de machos los pesos en órganos como Pulmones T2, Estomago T1, Intestino Delgado T2, y en hembras Hígado para T1 y T2 presentaron diferencias estadísticas significativas. Mientras que en talla de órganos en machos, Estomago T1, Intestino Grueso T1 y T2 y en hembras únicamente Riñón derecho T2, presentaron diferencias estadísticas significativas.

Palabras clave: *Hamelia patens Jacq*, extracto acuoso, chichipince, concentración

AGRADECIMIENTOS.

Agradecer principalmente a Dios Padre Todo Poderoso, por haberme concedido Vida y Salud para poder culminar con mis estudios y con mi trabajo de Investigación.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), por permitirme utilizar sus instalaciones para el desarrollo de la investigación. También al personal multiusos y del área de preparación de materiales de dicho centro por el apoyo que nos brindaron en todo momento.

Agradecer Al Dr. Oscar Luis Meléndez por asumir con mucho interés ser mi asesor (principal) y brindarme sus conocimientos y su experiencia, pero por motivos personales y de salud ya no pudo dar seguimiento a su cargo. Al Dr. Ramón Oviedo Zelaya por asumir el nuevo cargo como asesor interno y apoyarme en los que restó de la investigación. Al Licenciado Miguel Moreno por ser mi Asesor (externo) y brindarme su incondicional tiempo en cada temática de la investigación. Al Licenciado Noel Avalos por su tiempo, paciencia y sacrificio en apoyarme con su experiencia en el área de preparación y fijación de tejido en el Laboratorio de Patología (CENSALUD). Al Licenciado José Guillermo Mejía responsable del área del Laboratorio de Patología y Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) por su tiempo y apoyo brindado en la Investigación.

Al Dr. Marvin Núñez, Lic. Juan Pablo Sánchez y todo el personal profesional del Laboratorio de Preparación de Productos Naturales que labora en la Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador, por brindarme su apoyo en la preparación del extracto acuoso de *Hamelia patens Jacq* (chichipince).

Al Licencia Gonzalo Tolosa Juárez y a todo su personal que labora en el área de Laboratorio Clínico del Hospital Nacional Rosales por recibirme siempre cordialmente y brindarnos su apoyo en el procesamiento de las muestras sanguíneas.

A los compañeros estudiantes en aquel momento Rocío Guerra, Melany Murillo, Silvia Martínez, por brindarme su apoyo, tiempo y experiencia en Investigaciones similares. Agradecer a mis compañeros estudiantes de Facultad Marvin Wipfli, Eva Margarita Leiva, Fernando Landaverde, Damaris Montenegro, Edgardo Núñez, Juan Flores Molina, Lidia Sánchez, Jacky Serrano, Daniel Hernández Ardon y a todos aquellos que brindaron su apoyo en todo momento, se les agradece con mucho cariño y afecto.

DEDICATORIAS.

Dedicada a Dios Padre Celestial que siempre me brindó salud y vida para culminar con mi carrera Universitaria y a nuestra Madre Santísima la Virgen María por su amorosa intercesión.

A mi familia se la dedico con mucho amor y afecto especialmente a mi padre Julio Morales Salazar y madre Paz Peña de Morales que tuvieron que partir a la vida eterna y siempre los llevo grandemente en lo más profundo de mi corazón, siempre me brindaron todo su apoyo y mejores deseos para poder culminar con mi carrera Universitaria, A mis hermanos Julio Norberto Morales Peña, Fernando Alonso Morales Peña y Mónica Tatiana Morales Peña, por estar siempre pendientes en todo momento brindándome sus oraciones y buenos deseos, muchas gracias Familia. A mi madrina de Bautizo Magdalena González por incluirme siempre en sus oraciones y brindarme siempre sus buenos deseos.

INDICE

1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION BIBLIOGRAFICA.....	3
2.1 <i>Hamelia patens Jacq</i> (Familia <i>Rubiaceae</i>).....	3
2.1.1 Generalidades de la familia <i>Rubiaceae</i>	3
2.1.2 Especie: <i>Hamelia patens Jacq</i>	3
2.1.3 Informacion taxonomica (Germplasm Resources Information Network, US. GRIN) 2007; NRCS (Natural Resources Conservation Service, USA). 2007.....	3
2.1.4 Nombres comunes de <i>Hamelia patens Jacq</i>	4
2.1.5 Descripción de la planta.....	4
2.1.6 Ecología y distribución de <i>Hamelia patens Jacq</i>	5
2.1.7 Composición Química de <i>Hamelia patens Jacq</i>	5
2.1.8 Compuestos de importancia farmacológicas en <i>Hamelia patens jacq</i>	6
2.1.9 Estudios relacionados con el uso de <i>H. patens Jacq</i>	6
2.1.10 Usos etnobotánicas de <i>Hamelia patens Jacq</i>	7
2.1.11 Usos etnoveterinarios de <i>Hamelia Patens Jacq</i>	8
2.2 Generalidades de toxicología.....	9
2.2.1 Definición de toxicología.....	9
2.2.2 Definición de Tóxico.....	10
2.2.3 Definición de Toxicodinámica y sus pasos.....	10
2.2.4 Toxicidad subaguda.....	12
2.2.5 Compuestos tóxicos presentes en <i>H. patens Jacq</i>	12
2.3 El animal de laboratorio.....	13
2.3.1 El ratón, su taxonomía.....	13
2.3.2 Su uso como animal de experimentación.....	13
2.3.3 Cepas de ratones utilizadas en laboratorios.....	14
2.3.4 Pruebas biológicas con ratones.....	14
2.3.5 Ética de la experimentación animal.....	15
2.3.6 Atención Medico Veterinaria.....	15
2.4 Pruebas sanguíneas con animales de experimentación.....	16
2.4.1 Generalidades de hematología clínica.....	16
2.4.2 Generalidades de la Bioquímica clínica.....	16

3. MATERIALES Y METODOS.....	18
3.1 Metodología.....	18
3.2 Metodología de Laboratorio.....	18
3.2.1 Actividades dentro del laboratorio de experimentación animal.....	18
3.2.2 Selección de animales experimentales (ratones NIH).....	18
3.2.3 Conformación de los tratamientos.....	19
3.2.4 Recolección de hojas de <i>Hamelia Patens Jacq.</i>.....	19
3.2.5 Obtención del extracto seco de hojas de <i>Hamelia patens Jacq.</i>.....	19
3.2.6 Preparación del extracto acuoso de hojas de <i>H. patens Jacq.</i>.....	20
3.3 Estudio de toxicidad subaguda por 28 días.....	20
3.3.1 Administración de sustancia de hojas de <i>H. patens Jacq.</i>.....	20
3.3.2 Observaciones clínicas.....	21
3.4 Toma de muestra sanguínea.....	21
3.4.1 Pruebas Hematológicas.....	22
3.4.2 Pruebas de Bioquímica Sanguínea.....	23
3.4.3 Necropsia y estudio macroscópico de órganos.....	23
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	24
4.1 Resultados estadísticos.....	24
4.1.1 Observaciones clínicas.....	24
4.1.2 Control de pesos semanales.....	24
4.1.3 Hematología.....	25
4.1.4 Bioquímica Sanguínea.....	27
4.1.5 Pesos de órganos.....	29
4.1.6 Talla de órganos.....	31
4.2 Discusión de resultados.....	33
5. CONCLUSIONES.....	37
6. RECOMENDACIONES.....	37
7. BIBLIOGRAFIAS.....	38
8. ANEXOS.....	46

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Planta de chichipince (<i>Hamelia patens</i> Jacq).	4
Figura 2. Mapa de distribución de chichipince.....	5
Figura 3. Ratones de Laboratorio cepa NIH.	14
Figura 4. Administración intragastricas de sustancia de <i>H. patens Jacq</i> en ratón.....	21
Figura 5. Toma de muestra sanguínea de la región retro orbital del plexo venoso.....	22
Figura 6. Muestras sanguineas para Hematología.	22
Figura 7. Muestras sanguineas para Quimica Sanguinea	23

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Usos etnobotánicas de chichipince.....	8
Cuadro 2. Usos de chichipince en animales.....	9
Cuadro 3. Pasos de la toxicodinamica en el organismo.	11
Cuadro 4. Etiquetado e identificación de los tubos para hematología y química sanguínea. .	22
Cuadro 5. Efecto del extracto acuoso de H. Patens jacq (chichipince) en los pesos promedio y aumento porcentual en ratones machos NIH en dos concentraciones de T1: 100 mg y T2: 250 mg.	24
Cuadro 6. Efecto del extracto acuoso de H. Patens jacq (chichipince) en los pesos promedio y aumento porcentual en ratones hembras NIH en dos concentraciones de T1: 100 mg y T2: 250 mg.	25
Cuadro 7. Efecto del extracto acuoso de H. Patens jacq en los parámetros hematológicos en ratones NIH en ambos sexo con dos concentraciones T1: 100 mg y 250 mg.	26
Cuadro 8. Efecto del extracto acuoso de H. Patens jacq en los parámetros de Bioquímica sanguínea en ratones NIH de ambos sexo con dos concentraciones T1: 100 mg y T2: 250 mg.	28
Cuadro 9. Efecto del extracto acuoso de H. Patens jacq en los pesos de órganos de ratones machos y hembras NIH.....	30
Cuadro 10. Efecto del extracto acuoso de H. patens jacq en las tallas de los órganos de ratones NIH.	32

ANEXOS

Cuadro A- 1. Hoja de registro de peso corporal semanal.....	48
Cuadro A- 2. Hoja de observaciones clínicas.....	49
Cuadro A- 3. Hoja de observaciones post mortem.	50
Cuadro A- 4. Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación.	51
Cuadro A- 5. Pesos promedios de grupos machos.	52
Cuadro A- 6. pesos promedios de los grupos hembras.....	53
Cuadro A- 7. promedios de Plaquetas en machos y hembras.....	53
Cuadro A- 8. Promedios de Bilirrubina total en machos y hembras.	54
Cuadro A- 9. Promedios de Nitrógeno ureico en machos y hembras.....	55
Cuadro A- 10. Promedios Transaminasa Glutámica Oxalacetica	55
Cuadro A- 11. promedios de peso de hígados en machos y hembras.....	56
Cuadro A- 12. promedio de pesos de pulmones en machos y hembras.....	56
Cuadro A- 13. Promedios de pesos de estómagos en machos y hembras.....	57
Cuadro A- 14. Promedios de pesos de intestinos delgados en machos y hembras.	57
Cuadro A- 15. Promedios de tallas de riñón derecho de machos y hembras.	58
Cuadro A- 16. promedios de tallas de estómagos de machos y hembras.....	58
Cuadro A- 17. promedios de tallas de intestinos gruesos de machos y hembras.....	59
Cuadro A- 18. Tabla de referencia de Hematología en ratón.	60
Cuadro A- 19. Tabla de referencia Bioquímica Sanguínea del ratón.....	61
Figura A- 1. Marcado con ácido pícrico.	46
Figura A- 2. Etiquetado y conformación de grupos.....	46
Figura A- 3. pesado de la harina de chichipince.	46
Figura A- 4. cocción a 340°C.....	46
Figura A- 5. Filtrado de sustancia	47
Figura A- 6. tubos llenos en Holder	47
Figura A- 7. programación de GENEVAC.	47
Figura A- 8. GENEVAC.....	47
Figura A- 9. Centrifugado.	47
Figura A- 10. Pipeteo de suero sanguíneo.	47
Figura A- 11. suero sanguíneo.....	47

Figura A- 12. Representación de los pesos promedios en grupos machos.	52
Figura A- 13. representacion de los pesos promedios en grupos hembras.	53
Figura A- 14. comparacion del parametro de plaquetas en machos y hembras.....	53
Figura A- 15. Comparación de la Bilirrubina total en machos y hembras.	54
Figura A- 16. Comparación de Nitrógeno ureico en machos y hembras.....	55
Figura A- 17. Comparación de TGO en machos y hembras.	55
Figura A- 18. Comparación los pesos de hígados en machos y hembras.....	56
Figura A- 19. Relación de pesos de pulmones en machos y hembras.	56
Figura A- 20. Relación de pesos de estómagos de machos y hembras.	57
Figura A- 21. Relaciones de pesos de intestino delgado en machos y hembras.	57
Figura A- 22. Relaciones de tallas de riñón derecho en machos y hembras.	58
Figura A- 23. Relaciones entre tallas de estómagos de machos y hembras.....	58
Figura A- 24. Relaciones de tallas de intestinos gruesos de machos y hembras.....	59

1. INTRODUCCION.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza las plantas como principal medicamento, por lo que dicho organismo ha insistido en que el uso de plantas medicinales puede ser de gran aplicación en la atención primaria de los sistemas de salud, pero sobre bases científicas que sustenten seguridad, efectividad y calidad requerida para administración en humanos y animales. Hoy en día es precisamente en los países como el nuestro que poseen en su gran mayoría una rica flora y una valiosa tradición popular en la utilización de plantas medicinales, donde la medicina tradicional sobrevive de una forma más auténtica y por lo tanto asociada al empirismo en la mayoría de los casos (Brundtland 2003)

Hamelia patens Jacq (chichipince) es una planta utilizada en la medicina tradicional Salvadoreña a la que se le asocian propiedades antimicrobianas, analgésicas, antidepresiva, inmunoestimulante, cicatrizante, antitumorales y antiinflamatorias y ha sido considerada entre las especies de mayor uso medicinal en El Salvador (Raintree Nutrition, 2004). Nos encontramos entonces, con el hecho que el chichipince (*H. patens jacq*), siendo una especie químicamente dotada de compuestos ampliamente reportados por su actividad biológica en el tratamiento de múltiples trastornos, pero también está dotada de compuestos de grupos químicos con actividad toxicológica (Núñez, 1982).

Las plantas medicinales al ser fuentes muy importantes de sustancias con actividades biológicas, deben ser investigadas para poder ser utilizadas con seguridad y racionalmente. La utilización de sus extractos, aceites esenciales, infusiones, compresas, etc., sirven para enfermedades comunes, y en la mayoría de veces son utilizadas por automedicación. La población las utiliza de forma indiscriminada basándose en la creencia de que las plantas carecen de efectos adversos y que no se necesita una dosificación exacta (Núñez, 1982)

Hamelia patens Jacq ha sido utilizada como fitoterapia en la mastitis clínica en vacas lecheras, en jabones, pomadas a base de esta planta en la cicatrización de heridas y té por la vía oral para otros propósitos (Núñez, 1982). Por lo tanto, el chichipince debe de ser sujeto de estudios, siguiendo normas de investigación científica para determinar su potencial toxico si estuviese presente por la vía oral donde la información acerca de ella es poca. De acuerdo a lo mencionado sobre el chichipince especie botánica reportada entre las más usadas como medicina natural en El Salvador, se realizó el ensayo de toxicidad subaguda por 28 días por vía oral en ratones de laboratorio cepa NIH machos y hembras, donde se

evaluaron exámenes clínicos a diario, pruebas de Hematología, Química sanguínea, necropsia y estudio de órganos macroscópicamente. Este tipo de estudio es de importancia para la Medicina Veterinaria ya que se usó un modelo animal de laboratorio para brindar bases científicas sobre esta planta que se sabe muy poco sobre su uso por vía oral en animales y así a futuro poderse utilizar como fitoterapia complementaria a tratamientos farmacológicos brindados por el Médico Veterinario. La realización e importancia en general de este ensayo de toxicidad subaguda fue conocer los posibles efectos tóxicos de *H. patens Jacq* que podrían haberse presentado por la administración de la vía oral.

Los resultados al final del ensayo de toxicidad subaguda en dos concentraciones de 100 y 250 mg/kg, no se observaron signos ni síntomas de toxicidad durante el tiempo de administración de la sustancia, tampoco el peso de los animales se vio afectado durante el ensayo. La presencia de diferencias estadísticas significativas en los parámetros de hematología y Química sanguínea no son indicadores de toxicidad por la sustancia, debido a la estrecha relación que guardan con los de sus grupos controles. En el estudio de órganos no se evidencio la presencia de lesiones macroscópicas, pero si diferencias estadísticas significativas en pesos y tallas de órganos lo cual deberá estar sujeto a estudio histopatológico a futuro. Tomando de base científica los hallazgos encontrados en este estudio con la sustancia.

2. REVISION BIBLIOGRAFICA.

2.1 *Hamelia patens* Jacq (Familia Rubiaceae)

2.1.1 Generalidades de la familia Rubiaceae.

La familia Rubiaceae es una de las familias más grandes, junto con las Poaceae, Orchidaceae y Asteraceae dentro de las angiospermas. Comprende aproximadamente 7000 especies distribuidas en 250 géneros (Steyermark 1974).

La familia Rubiaceae es una familia importante del Neotrópico con una amplia distribución, predominando en zonas tropicales húmedas y en regiones templadas. Es reconocida fácilmente por presentar casi siempre hojas opuestas, presencia de estípulas interpeciolares y flores con ovario ínfero (Maldonado, C. 2005.)

Casi todas las Rubiaceae son polinizadas por animales; además existe una amplia variedad de formas florales, tipos de frutos y mecanismos de dispersión de semillas. (Carretero, A. 2003)

2.1.2 Especie: *Hamelia patens* Jacq.

Hamelia patens Jacq pertenece al grupo de las especies medicinales, el cual presenta gran utilidad para el ser humano y animales. *H. patens* Jacq es muy conocida popularmente por sus diferentes capacidades curativas. Es utilizada para picaduras de insectos, desórdenes menstruales, afecciones en ovarios y, además, presenta propiedades probadas como analgésicas, antibacterianas, antifúngicas, antiinflamatorias, diuréticas, entre otras (Scofield, 1998)

2.1.3 Informacion taxonomica (Germplasm Resources Information Network, US. GRIN) 2007; NRCS (Natural Resources Conservation Service, USA). 2007.

Reino: Plantae.

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden: Rubiales

Familia: Rubiaceae

Género: *Hamelia* Jacq

Especie: *Hamelia patens* Jacq

2.1.4 Nombres comunes de *Hamelia patens* Jacq

Chichipin, cuetillo, ixcanán, sisipince, clavito, canuto. Chichipince, coralillo (El Salvador); coral (Honduras); canutillo (Oaxaca); vencenuco, leoncito (Colombia); Koray (Haití) (Howard, 1989).

2.1.5 Descripción de la planta.

Hamelia patens Jacq, conocida popularmente como “chichipince”, es un arbusto de mediana altura. Crece comúnmente de 1 a 3 m de altura, aunque se ha reportado alturas de hasta 7m (Howard, 1989). Crece como un árbol en la bajura tropical atlántica de Costa Rica y en El Salvador (Paciorek, *et al.*, 1995). *H. patens* Jacq tiene un sistema lateral de raíz con raíces finas abundantes. Las raíces son rojo-cafés. La corteza del tallo es gris y lisa y la corteza interior es verde claro (Little, *et al.* 1974).



Figura 1. Planta de chichipince (*Hamelia patens* Jacq).

La planta puede tener los tallos simples o compuestos. Las ramas son de anaranjadas a púrpura. Las hojas opuestas o agrupadas en grupos de tres o cuatro. Las hojas tienen pecíolos de 1.0 a 3.5 cm de largo que en su mayor parte son ovalado-elípticos y una punta muy aguda. El borde y especialmente la vena media es rojo o rosa. Las flores que son tubulares, miden de 12 a 22 mm de largo, con un color entre rojo y rosado. La fruta es una baya de esférica a elíptica de 7 a 10 mm de largo, girando rojo y entonces negro en la madurez. Las semillas son de anaranjadas a cafés de 0.6 a 0.9 mm de largo. Las raíces son rojo-cafés la corteza del tallo es gris y lisa y la corteza interior es verde claro (Liogier, 1990).

La planta florece durante todo el año. Es una planta polinizada por colibrí. Las flores son también frecuentadas por mariposas. Las frutas son comidas por pájaros que desechan las semillas (Cunningham, 1994).

2.1.6 Ecología y distribución de *Hamelia patens* Jacq

El rango de distribución geográfico de *H. patens* Jacq se extiende del sur de Florida y Bermuda, pasando por Bahamas, las Antillas, Trinidad y Tobago y México, a través de Centro América y Sudamérica hasta Paraguay y Argentina. La especie es también cultivada a través de los trópicos y el subtrópico húmedos aunque no ha sido informada como naturalizada fuera de su rango de distribución (figura 2). Esta especie crece en áreas deforestadas, en matorrales con otras especies, en claros de bosque. La especie es encontrada en áreas húmedas y lluviosas que reciben entre 1600 y cerca de 3000 mm de precipitación. *H. patens* Jacq prefiere suelos arcillosos. Crece en suelos derivados de materias volcánicas y sedimentarias y es más común en áreas de roca caliza (Little, *et al.* 1974).



Figura 2. Mapa de distribución de chichipince.

2.1.7 Composición Química de *Hamelia patens* Jacq

Las hojas: contienen alcaloides oxindólicos (maruquina, isomaruquina, palmirina, pteropodina, isopteropodina, rumberina, especiofilina, seneciofilina)

Saponósidos, esteroides (stigmas-4eno-6,6-diona),

Taninos y triterpeno, flavonoides (apigenina, rutina), β -sitosterol y ácido ursólico.

La corteza: contiene taninos (15%).

La raíz: contiene alcaloides, flavonoides y antocianinas (malvidina, petunidina). (Cáceres, 1996; López Luengo, 2001)

2.1.8 Compuestos de importancia farmacológicas en *Hamelia patens Jacq.*

Entre los compuestos de importancia farmacológica presentes en *H. patens Jacq.*, se encuentra el estigmasterol, un fitoesterol cuya actividad antiinflamatoria está bien documentada (Akihisa & Yasukagua. 2001). Conclusiones de otros estudios, justifican las investigaciones adicionales en el uso de fitoesteroles para prevenir el inmunosupresión asociado con el agotamiento físico excesivo (Bouic, *et al.* 1999).

Una investigación de fitoquímicos encontró que los tejidos de *H. patens Jacq.* son ricos en alcaloides y flavonoides (Raintree Nutrition, 2001), así como terpenos y esteroides (Ríos & Aguilar-Guadarrama, 2006).

Así mismo, el β -sitosterol ha sido asociado al restablecimiento de parámetros inmunes que puede ser de ayuda en numerosos procesos de enfermedades relacionadas a anomalías del sistema inmune, inclusive infecciones víricas crónicas, la tuberculosis, el reuma articular, alergias y el cáncer (Bouic & Lamprecht. 1999). En otros estudio se ha demostrado que los alcaloides indólicos de *H. patens jacq* muestran efectos relajantes (Reyes-Chilpa, *et al.* 2004).

Estudios previos revelan una actividad anti-tumoral significativa del ácido ursólico (Hsu_ *et al.*, 1997. Li *et al.*, 2002. Tokuda *et al.*, 1986); un triterpeno presente en este vegetal, así como diferentes actividades biológicas sobre líneas celulares de leucemia (Ovesná *et al.* 2006). Como puede verse, *H. patens Jacq.*, debe sus propiedades medicinales a algunos grupos de sustancias de diversa composición química entre los que se encuentran alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides (Ríos & Aguilar-Guadarrama, 2006), cuya acción farmacológica sobre el organismo humano y animal le confieren su valor medicinal; sin embargo, estas sustancias pueden tener también efectos tóxicos, como ya se ha demostrado en otras plantas de composición química similar.

2.1.9 Estudios relacionados con el uso de *H. patens Jacq.*

Estudios antimicrobianos demuestran que los extractos acuoso y etanólico de hojas de *Hamelia patens Jacq* (chichipince) son activos contra *Staphylococcus aureus* y que el extracto acuoso de la corteza es activo contra *Escherichia coli* (Cáceres, 1996, PLANTER, 1989). Estudios clínicos realizados en humanos con enfermedades de la piel demuestran que un jabón a base del extracto de la planta produce mejoría que se manifiesta en el tiempo

de cicatrización de heridas infestadas, en casos rebeldes se usó en forma de pomada o aceite con resultados similares (Cáceres, 1996).

Un estudio comprobó la eficiencia de una pomada a base de chichipince en la cicatrización de heridas por segunda intención en caninos, donde el chichipince produjo una mayor neovascularización de las heridas y una diferencia significativa en la reducción del diámetro de la herida. (García Escobar, 2009).

El extracto acuoso de las hojas de *Hamelia patens Jacq* ha tenido efecto antimicrobiano contra patógenos presentes en la leche de vacas con mastitis clínica tales como: *B. subtilis*, *E. coli*, *St. Albus y aureus*, *Gaffkia tetragena*, *Strep. Beta hemolítico excluido el grupo A* y *Strep. Viridans*, *Strep. Agalacti*, *K. pneumoniae* y *aerobacter*, *Pseudomona aureginosa*. (Paredes Celarié, sf).

2.1.10 Usos etnobotánicas de *Hamelia patens Jacq*.

Hamelia patens Jacq (chichipince) es una planta utilizada en la medicina tradicional Salvadoreña a la que se le asocian propiedades antimicrobianas, analgésicas, antidepresiva, inmunoestimulante, cicatrizante, antitumorales y antiinflamatorias y ha sido considerada entre las especies de mayor uso medicinal en El Salvador (Raintree Nutrition, 2004). (Cuadro 1).

Cuadro 1. Usos etnobotánicas de chichipince.

Dolencia	Órgano vegetal	Procedimiento	Aplicación	Posología
Aborto	Hojas frescas	bastante cocimiento, espeso	oral	Agua de tiempo
Amigdalitis	Cobollos frescos	cocimiento de 5 cobollos	Gárgaras y beber	3 tazas al día
Inapetencia	Cobollos frescos	cocimiento de 2 cobollos partidos	oral en frío	agua de tiempo 1-3 días
Chiras	Cobollos frescos	véase cicatrización	XXX	XXX
Cólicos	Cobollos frescos	horchata, 3 cobollos lavados	oral	media taza
Diabetes	Hojas frescas	cocimiento, 10 hojas para una botella de agua	oral	3-4 tazas diarias
Dolor de rabadilla	Raíz fresca	Cocimiento de una cascara machacada	oral	1 taza
Garganta (afecciones)	Cobollos frescos	cocimiento de 3 cobollos partidos	oral (gárgaras)	Varias veces al día
Golpes	Cobollos frescos y hojas frescas	cocimiento de 3 cobollos partidos	Baños locales y lienzos calientes	3 veces al día
Inflamaciones	Cobollos frescos y hojas frescas	Macerar 3 cobollos o cocimiento de hojas	Cataplasmas	varias veces al día.
Heridas	Cobollos frescos y hojas frescas	Cocimiento de hojas, 3 Cobollos o cocimiento de hojas	Baños locales y lienzos calientes	Varias veces al día
quemaduras	Cobollos frescos y hojas frescas	Macerar 3 cobollos o cocimiento de hojas	Cataplasmas	Varias veces al día
Afecciones a los riñones	Raíz fresca	-----		-----
Sarna	Hojas frescas	Maceradas	Baños locales.	Varias veces al día
Tumores uterinos	Cobollos frescos y hojas frescas	Cocimiento para una botella	Oral, tibio o frío, Duchas vaginales con irrigador	3 tazas al día, cada 3 días
Mal de orín	Hojas	Cocimiento de 10 hojas, junto a un pedazo de raíz	Oral, tibio.	3-4 tazas o vasos al día
Cicatrización	Cobollos frescos	Cocimiento, varios cobollos Sanos secados al sol y molidos	Baños locales, tibios tópico, Aplicar después del baño.	Varios.

González, Julio César. 1992.

2.1.11 Usos etnoveterinarios de *Hamelia patens Jacq*

En El Salvador las hojas de *H. patens Jacq* (chichipince) han sido muy utilizadas en forma de infusión como tratamientos etnoveterinarios por los campesinos para tratar muchos padecimientos en sus animales. (Erazo, *et al.*, 2001). (Cuadro 2).

Cuadro 2. Usos de chichipince en animales.

Padecimiento	Que se usa	Preparación y Tratamiento	Observaciones.
Mastitis	5 a 10 hojas de chichipince; 1 taza de agua	Se cuece las hojas; Antes de aplicarlo ordeñar a la vaca; se aplica unas 3 jeringas (solo los tubos) de la decocción en las tetas; se deja el tubo para que la decocción pueda bajar de vuelta; después se deja ordeñar por unas 4 horas.	
Neumonías	hojas de chichipince	Dar tomado como decocción.	
Retención de placenta	chichipince	Se hace una infusión de las hojas machacadas de chichipince. Se lava "el útero" con un tubo después que salga la placenta para prevenir infección. Chichipince.	
Diarrea en terneros	chichipince	Dar tomado como decocción.	

(Erazo, *et al.*, 2001).

2.2 Generalidades de toxicología.

2.2.1 Definición de toxicología.

La toxicología, es la ciencia que estudia los venenos o agentes tóxicos, incluyendo sus propiedades químicas, identificación, efectos biológicos y los posibles tratamientos de los efectos que provocan. La farmacología y la toxicología comparten muchos intereses, incluyendo mecanismo de absorción y eliminación, mecanismos de acción, principios de tratamientos y relaciones dosis-respuestas. Algunos medicamentos pueden actuar como venenos en ciertas condiciones, por lo tanto el farmacólogo como el toxicólogo comparten un interés por las reacciones adversas de los fármacos. La toxicología se divide en dos aspectos: toxicología general y toxicología específica. (Vivas Garay, JA. 2008)

- **Toxicología General.**

Relación de la toxicología con otras ciencias como: farmacología, medicina forense, bioquímica, química analítica, salud pública, inocuidad de alimentos, zoo higiene.

- **Toxicología Especifica (envenenamiento por plantas)**

Es la planta que posee ciertas sustancias que por sus propiedades naturales o físico química e incompatibilidad vital, altera el conjunto de funciones de los órganos, conduciendo al organismo a diversas reacciones biológicas, o a algún trastorno fisiológico. (Vivas Garay, JA. 2008)

Muchas de las especies vegetales utilizadas tradicionalmente como terapia, pueden poseer cantidades de compuestos tóxicos presentes en las diferentes estructuras de la planta que en algún momento pudieran generar daño al organismo si no se tiene conocimientos acerca

de ellas. El grado de toxicidad de los vegetales depende de diversos factores inherentes tanto a ellos, como al medio ambiente en que se desarrollan. Entre estos factores corresponde señalar: el estado y la fase de crecimiento de las plantas, la composición y el grado de humedad del suelo, los abonos aplicados, las condiciones climáticas, la altitud y la influencia de los herbicidas hormonales (Bruning, 1974)

2.2.2 Definición de Tóxico.

Es definido como toda sustancia química que, incorporada al organismo vivo a determinada concentración, produce en virtud de su estructura química a través de mecanismos fisicoquímicos y bioquímicos, alteraciones de la fisicoquímica celular, transitorias o permanentes, siempre incompatibles con la salud y en algunos casos con la vida. A la vez se clasifican así: Sustancias exógenas al organismo: xenobióticos y sustancias producidas por seres vivos: TOXINAS (Peña. 2001).

2.2.3 Definición de Toxicodinámica y sus pasos.

El proceso de transporte y transformación que experimenta el toxico desde la superficie epitelial de contacto hasta llegar a los órganos en los que se almacenan y en los que causan lesiones es muy complejo. Por conveniencia para facilitar su estudio se considera que consta de cuatro pasos: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción. El proceso se conoce por sus siglas ADME a la vez los define de la siguiente manera. (Peña. 2001). (Cuadro 3)

Cuadro 3. Pasos de la toxicodinámica en el organismo.

Pasos de la toxicodinámica	Descripción
Paso 1. Absorción	Estudia el paso de los tóxicos a través de las membranas biológicas hasta llegar a la circulación general para su distribución. Las superficies del organismo están cubiertas por células epiteliales y éstas por membranas formadas por una doble capa de fosfolípidos y proteínas que les confieren sus propiedades químicas. Dentro los factores que influyen en la absorción tenemos: Vía de administración, alimentos o fluidos, formulación de la dosificación, superficie de absorción, irrigación, acidez del estómago, motilidad gastrointestinal.
Paso 2. Distribución	Una vez que una sustancia es absorbida dentro del torrente sanguíneo, puede alcanzar virtualmente cualquier parte del cuerpo como órganos o tejidos en donde van a almacenarse transitoriamente o permanentemente (órganos "blanco") o en aquéllos donde van ejercer sus efectos adversos (órganos "críticos"). Unas cuantas lo hacen por simple disolución en el componente acuoso de la sangre, pero la mayoría se une en forma reversible a las proteínas plasmáticas en particular la albúmina, ya que ésta posee un número considerable de sitios de unión y una gran cantidad de sustancias pueden fijarse a ella.
Paso 3. Metabolismo	El tercer proceso de la secuencia ADME, el metabolismo, también es conocido como <i>biotransformación</i> : comprende la suma de los procesos por los cuales un organismo vivo somete a una sustancia extraña a un cambio químico. La biotransformación de sustancias tóxicas en el cuerpo busca que las sustancias lipofílicas sean más hidrofílicas o solubles en agua. Los seres humanos cuentan con un arsenal variado de procesos enzimáticos que promueven esta conversión beneficiosa, que ayuda a la excreción de las sustancias nocivas. Los órganos encargados de metabolizar son fundamentalmente el hígado (laboratorio del cuerpo por excelencia), riñón, pulmones, plasma e intestino. Estos procesos metabólicos se realizan mediante reacciones químicas: oxido-reducción e hidrólisis.
Paso 4. Excreción	La fase final del proceso toxicológico es la excreción de los compuestos originales y los metabolitos productos de la biotransformación. Los fenómenos generales del paso a través de las membranas se aplican igualmente para la eliminación, únicamente que estos intercambios se realizan en sentido contrario: de los tejidos a la sangre y de ésta al exterior. La ruta más importante de excreción es el riñón. Otras vías como la bilis, pulmones, saliva, sudor y leche son importantes sólo en casos especiales. Los riñones son los órganos diseñados precisamente para la excreción. A través de ellos se eliminan la mayoría de los subproductos del metabolismo normal y la mayoría de los xenobióticos, El riñón elimina fundamentalmente de dos formas: Filtración: por canales acuosos de glomérulos hasta orina. Secreción tubular: por transporte activo forzado, se produce cuando tiene carga eléctrica.

(Peña. 2001).

2.2.4 Toxicidad subaguda.

También llamada a veces subcrónica, suele ser debida a exposiciones frecuentes o repetidas en un periodo de varios días o semanas antes que aparezcan los síntomas. El tiempo máximo considerado para este tipo de toxicidad es de 90 días (Peña. 2001)

2.2.5 Compuestos tóxicos presentes en *H. patens Jacq.*

El chichipince ha sido muy utilizado tradicionalmente con fines medicinales, pero en ella se encuentran compuestos tóxicos que se han reportado en otras especies vegetales estudiadas.

En *H. patens Jacq* (chichipince) están presentes los terpenos, en especial los monoterpenos, que son compuestos volátiles comunes en muchas plantas y en general dan el aroma característico que poseen. Algunos de estos compuestos han sido descritos por su capacidad toxica principalmente a nivel hepático y pulmonar (Romero, *et al.* 2001-2002; Zeinsteger, *et al.*, 2003). También se ha demostrado su capacidad toxica sobre el aparato digestivo (Zeinsteger, *et al.* 2001). Por otra parte los terpenos tienen la capacidad de alterar la permeabilidad de la membrana celular, en especial sobre mecanismos de transporte iónico (Abramov, *et al.* 2001).

Otro compuesto presente en *H. patens Jacq* es el ácido ursólico por su parte, ha demostrado efectos citotóxicos significativos en estudios in vitro (Lin *et al.* 1990), así como efectos sobre el ciclo espermatogenico en ratas (Akbarsha & Murugaiyan, 2000).

Los alcaloides indólicos, son otro grupo de compuestos presente en *H. patens Jacq* que a pesar de no haber sido sujetos de estudios toxicológicos en esta especie vegetal, si se les ha reportado como responsables de daños a nivel de DNA, disminución de la actividad locomotriz, perdida de reflejos y coma reversible, así como su acumulación en el cerebro (Melo, *et al.* 1986; Naithani, *et al.* 2001).

Así mismo, los alcaloides indólicos son reportados como toxinas de plantas que han sido catalogadas como de toxicidad severa. Como puede verse, los datos de que se disponen sobre alcaloides y terpenos muestran su amplia capacidad toxica en sistemas biológicos y su presencia en *H. patens Jacq* sugiere el potencial toxico de esta especie vegetal (Naithani, *et al.* 2001).

2.3 El animal de laboratorio.

El animal de laboratorio tiene que ser respetado como ser vivo, entender que padece necesidades y sufre dolor, por ley es obligación del personal que lo cuida, mantiene y utiliza (investigador), asegurar su bienestar y confort mientras viva. También es definido como cualquier especie animal que, mantenido bajo determinadas condiciones controladas es utilizado como instrumento de medida en experimentación científica, desarrollo tecnológico e innovación, pruebas de laboratorio y docencia, para la generación de datos, los cuales son utilizados como información. Ejemplo de estas especies son: el ratón, la rata, el hámster, el conejo, el perro, el mono etc. (Fuentes Paredes, et al., 2008).

2.3.1 El ratón, su taxonomía.

Comúnmente es llamado ratón (casero/domestico), *Mus musculus* pertenece al orden Rodentia, familia Muridae. Los individuos adultos usualmente pesan entre 25 y 40 gramos, se conocen variedad de colores, incluyendo albinos, negros, cafés y grises. (Fuentes Paredes, et al., 2008)

Clase: Mammalia

Familia: Muridae

Género: *Mus*

Especie: *musculus*.

2.3.2 Su uso como animal de experimentación.

Se ocupan más ratones que cualquier otro mamífero en investigación. Estos tienen atributos que los hacen muy valiosos para investigación, desde un periodo de vida corto, corto tiempo de gestación, camadas abundantes, gran variedad genética. Cada una de estas características permite adaptar al ratón a campos de investigación muy específicos. Sus aplicaciones más comunes en biomédica incluyen: enfermedades infecciosas, oncología, condiciones autoinmunes, inmunología, descubrimiento de nuevas drogas, seguridad de productos. Finalmente comparadas a otras especies su bajo costo y fácil mantenimiento los hace ideales para estudios de toxicidad y carcinogenicidad de varios compuestos donde se necesita gran número de animales para proveer datos estadísticos válidos. (Fuentes Paredes, et al., 2008)

Ventajas:

De fácil cuidado y mantenimiento por su pequeño tamaño. Bajos costo de manutención. Cepa definida. Diversidad de características específicas que sirven como modelo. Eficiencia reproductiva. Por su vida relativamente corta es excelente para su uso en ensayos crónicos de toxicología, microbiología, virología, farmacología, etc. Corto tiempo de generación.

Desventajas:

Dificultad en la recolección de material biológico dificultad en la administración de drogas, dificultad en las técnicas quirúrgicas (Fuentes Paredes, *et al.*, 2008).

2.3.3 Cepas de ratones utilizadas en laboratorios.

Población de una misma especie, descendiente de un mismo origen; conservada por medio de una serie de pasos o cultivos.

Ejemplos:

Ratón BALB/c (*Mus musculus*)

Ratón AKR (*Mus musculus*)

Ratón ICR (*Mus musculus*)

Ratón NIH (*Mus musculus*)

Todas estas cepas se usan ampliamente en estudios de toxicología, farmacología y en pruebas de seguridad. (Fuentes Paredes, *et al.*, 2008)



Figura 3. Ratones de Laboratorio cepa NIH.

2.3.4 Pruebas biológicas con ratones.

Cada día, alrededor de 25 millones de ratones ayudan a los investigadores de todo el mundo a diseñar tratamientos para diferentes enfermedades humanas, incluyendo el cáncer, las cardiopatías, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la malaria, etc. El anuncio de que se acaba de secuenciar más del 95% del genoma de *Mus musculus* adquiere una

trascendencia especial, dadas las similitudes que existen entre el genoma de estos roedores y el humano (Bar, 2004).

2.3.5 Ética de la experimentación animal.

El tema ético compete a todos los individuos pero, con mayor razón, a los involucrados en la investigación biológica, desde el auxiliar a cargo de los animales hasta el directivo de la institución productora o usuaria. La primera condición del científico que trabaja con animales de laboratorio es el respeto por la vida, el dolor o el sufrimiento a que éstos pueden ser sometidos en los trabajos de experimentación bajo su responsabilidad. Siempre que se usen animales en investigación, se debe considerar que un objetivo tan importante como el de obtener resultados experimentales, será el de minimizar cualquier dolor o angustia que dichos animales puedan sufrir. El refinamiento de los procedimientos para conseguir que estos no causen sufrimiento debe ser parte integrante de toda investigación científica. Esto es importante tanto desde el punto de vista de la preocupación humanitaria como para cumplir con los requisitos de la legislación sobre animales de investigación. Los investigadores que trabajen y experimenten con animales están moralmente obligados a manifestarles tres tipos de actitudes: respeto, afecto y gratitud.

Respeto: por tratarse de seres vivos y sensibles, que están experimentando sufrimiento y podrían terminar perdiendo la vida, tratárseles con todas las consideraciones que el caso merece.

Afecto: considerándolos partícipes con nosotros, del misterio de la vida.

Gratitud: reconocimiento por la importante ayuda al constituirse nuestros más íntimos colaboradores. (Fuentes Paredes, *et al.*, 2008).

2.3.6 Atención Médico Veterinaria.

La atención médico-veterinaria es un aspecto de gran importancia dentro del programa de cuidado y uso de los animales. Una adecuada atención médico-veterinaria debe contener programas eficaces de:

- › Medicina preventiva.
- › Vigilancia, diagnóstico, tratamiento y control de enfermedades.
- › Manejo de enfermedades.
- › Evaluación de salud y bienestar animal.
- › Método de eutanasia.

El programa de atención veterinaria es responsabilidad del médico veterinario encargado, con experiencia en ciencia y medicina de los animales de laboratorio. Es su función el

asesorar a investigadores y personal involucrado en el cuidado y uso de animales para asegurar una apropiada manipulación e inmovilización, sedación, anestesia, analgesia y eutanasia. Por tanto, todo sistema de control, de vigilancia y de regulaciones que se establezca para la prevención de infecciones y para el control y mantenimiento del nivel higiénico-sanitario de los animales, es un aspecto fundamental y debe ser llevado a cabo con gran rigor técnico y de manera documentada. (Fuentes Paredes, *et al.*, 2008).

2.4 Pruebas sanguíneas con animales de experimentación.

Durante la experimentación animal resulta imprescindible contar con rangos normales de referencia de los parámetros fisiológicos de los animales, porque permiten evaluar el estado higiénico sanitario y fisiológico de los animales en una etapa determinada del experimento, a la vez que ayudan a conocer la incidencia o alteraciones sobre el organismo animal que producen las sustancias de ensayo (Balkaya *et al.*, 2001; Marshall *et al.*, 2010). (Cuadro A-17; cuadro A-18)

2.4.1 Generalidades de hematología clínica.

La biometría hemática o hemograma es uno de los procedimientos de rutina a nivel de laboratorio con requerimientos mínimos de equipo y de mayor importancia, ya que la información obtenida proporciona una idea muy confiable del estado general de la salud del paciente. (Coles, E. 1989; Doxey, DL. 1987).

La hematología comprende el estudio del paquete celular, el perfil o el estado sanguíneo. Específicamente, los estudios de cambios hematológicos hacen parte de una primera aproximación para la caracterización de un biomodelo, determinando características morfológicas y químicas, permitiendo así establecer valores alrededor de las condiciones y el manejo de los animales de experimentación, teniendo en cuenta:

- Recuento de eritrocitos (y valor hematocrito)
- Recuento de leucocitos
- Determinación de hemoglobina
- Fórmula leucocitaria (recuento diferencial de leucocitos)
- Determinación de las plaquetas
- Índices eritrocíticos de Wintrobe (VCM, HCM, CHCM) (Arcila, VH. 2005; Benjamín, M.

1991)

2.4.2 Generalidades de la Bioquímica clínica.

La bioquímica clínica es la rama del laboratorio en la que se usan métodos químicos y bioquímicos para el estudio de las enfermedades. En la práctica, está usualmente dedicada, aunque no exclusivamente, a los estudios de la sangre, orina y otros fluidos biológicos

debido a la relativa facilidad de obtención de este tipo de muestras. Las investigaciones bioquímicas están involucradas, en grados variables, en todas las áreas de la medicina clínica. (Sánchez Visconti, G. 2009)

Las alteraciones bioquímicas del organismo son resultado de la exposición a un compuesto químico que también modifica la composición celular sanguínea (Mancebo *et al* 2002).

De las pruebas analíticas que se realizan en los laboratorios, sin duda el grupo que determina el funcionalismo hepático es de los más solicitados. El hígado, cuya función es múltiple, es un órgano vital encargado de eliminar, metabolizar, almacenar y vehicular diversas sustancias y fármacos. (Sánchez Visconti, G. 2009)

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 Metodología.

El estudio se llevó a cabo en la Universidad de El Salvador, ubicada en 13°43'6" N 89°12'11" O. Ciudad Universitaria, Final de Av. Mártires y Héroes del 30 julio, San Salvador, El Salvador, América Central. Específicamente en las instalaciones del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD), en el Laboratorio de Patología y Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) se contó también con el apoyo de la Facultad de Química y Farmacia en el Laboratorio de Investigación de Productos Botánicos para la preparación del extracto acuoso de *H. patens Jacq* en las dos concentraciones estudiadas.

La investigación se realizó en los meses de mayo 2015 hasta noviembre 2016. Se utilizaron ratones machos y hembras de la cepa NIH disponibles en el Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) del Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD). Este estudio tuvo una fase de campo (manejo de bioterio) y una de laboratorio, las cuales son complementarias para el análisis de resultados.

3.2 Metodología de Laboratorio.

3.2.1 Actividades dentro del laboratorio de experimentación animal.

Dentro del laboratorio de experimentación animal (LEA) se realizaron actividades a diario desde el inicio del estudio, ya que se utilizaron animales vivos destinados para investigaciones a los cuales se les brindó las mejores condiciones de manejo. Se les proporcionó una alimentación con concentrado de buena calidad para roedores con nivel de proteína de 22%, el agua de consumo potabilizada y filtrada, limpieza de las jaulas de alojamiento de los animales en estudio, se verificó diariamente el buen funcionamiento del equipo de ventilación y extractor de aire, sistema de iluminación, estado de los aparatos medidores de la temperatura y limpieza del bioterio diariamente en las zonas de trabajo.

3.2.2 Selección de animales experimentales (ratones NIH)

Se utilizaron 45 ratones (20 machos y 25 hembras) de la cepa NIH, con un peso corporal entre 20 a 25 gramos, con 5 semanas de vida aproximadamente. Todos procedentes del Laboratorio de Experimentación Animal (LEA) de CENSALUD, donde se mantuvieron a una temperatura controlada de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y entre 50-60% de humedad relativa, con un ciclo de luz-oscuridad 12/12 horas. Permaneciendo 4 animales por jaula en los grupos de machos y 5 animales por jaula para el grupo de hembras, marcados con ácido pícrico (figura A-1) en diferentes partes del cuerpo para su identificación individual de la siguiente manera:

Animal 1: Sin identificación

Animal 2: Marca en la cabeza

Animal 3: Marca en espalda o lomo

Animal 4: Marca en la base de la cola

Animal 5: Marca en pata delantera derecha

3.2.3 Conformación de los tratamientos.

Se evaluaron dos concentraciones de 100 y 250 mg/kg de peso vivo del extracto acuoso de hojas de *Hamelia patens Jacq* (chichipince), en ratones de laboratorio cepa NIH machos y hembras. Los tratamientos quedaron agrupados y etiquetados (figura A-2) de la siguiente manera: T0 (control): agua destilada, T1: 100 mg/kg de peso vivo de extracto acuoso de hojas de *H. patens Jacq*, T2: 250 mg/kg de peso vivo de extracto acuoso de hojas de *H. patens Jacq*. Cada animal recibió un volumen máximo de 0.2 ml del extracto según el orden establecido.

3.2.4 Recolección de hojas de *Hamelia Patens Jacq*.

Las hojas de *H. patens Jacq* (chichipince) se recolectaron dentro de las instalaciones de la Universidad de El Salvador, seleccionando aquellos árboles en buenas condiciones sin evidencias de plagas en las hojas de la parte media del arbusto las más frescas y desarrollada. Las hojas fueron puestas a secado a la claridad por una semana y luego en estufa para su secado completo en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia y posteriormente se molieron para hacer un pulverizado el cual se conservó en bolsas plásticas etiquetadas con el nombre científico y común de la planta y la fecha de elaboración.

3.2.5 Obtención del extracto seco de hojas de *Hamelia patens Jacq*.

El pulverizado obtenido de las hojas de *H. patens jacq* se procesó con la ayuda de equipo de alta tecnología en el Laboratorio de Investigación de Productos Naturales de la Facultad de Química y Farmacia. El método consistió en pesar 57 gramos del pulverizado de hojas de chichipince (figura A-3), se calentó 1000 ml de agua destilada en un hotplate y se cocinó a 100°C (figura A-4) agitándola constantemente por un tiempo de 20 minutos, luego la decocción se coló con una manta de algodón nueva para separar los sedimentos, colocándose en un beaker de 1000 ml. El agua obtenida de la decocción fue filtrada con papel filtro para eliminar restos de sedimento obteniéndose un extracto fluido (figura A- 5). El extracto fluido se colocó en tubos de vidrio especiales para altas revoluciones montados en un holders (figura A-6) Donde se obtuvo el extracto seco con la ayuda del GENEVAC (figura

A-7) aparato que centrifuga a altas revoluciones y a temperaturas variadas rango aproximado de 40°C (figura A-8). Los tubos se centrifugaron a una velocidad de 8000 rpm con temperatura de 40°C por un tiempo de 9 a 10 horas aproximadamente, en el fondo del tubo quedo solamente el extracto seco colocándose en un desecador de silica para eliminar humedad y evitar contaminación del extracto.

3.2.6 Preparación del extracto acuoso de hojas de *H. patens Jacq.*

Las sustancias en ambas concentraciones fueron preparadas dos veces por semana, partiendo del peso promedio en gramos semanal de los grupos de animales en estudio. A partir de los promedios se calculó la cantidad a pesar del extracto seco usando una balanza semianalitica digital, se colocó el extracto seco en un Beaker de 100 ml al cual se le añadió 5 ml de agua destilada caliente colocándose en un aparato sonificador por 20 minutos el cual ayudó a disolver con mayor rapidez el extracto seco, posterior a esto se transfirió a un balón de vidrio graduado con capacidad de 10 ml y se aforó (línea de 10 ml en balón) con agua destilada hasta dicha marca, el extracto acuoso se refrigeró entre 2 a 7°C para evitar contaminación.

3.3 Estudio de toxicidad subaguda por 28 días.

3.3.1 Administración de sustancia de hojas de *H. patens Jacq.*

El estudio de toxicidad se realizó según lo establecido en las guías para el cuidado y uso de los animales de experimentación del Consejo Canadiense de Protección de los Animales (CCAC 1998) y lo establecido en las guías 408 y 420 de la Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD 1998, 2001).

La vía de administración del extracto acuoso de hojas de *Hamelia patens Jacq* fue por canulación intragástricas, en la cual la anestesia no es necesaria, con el ratón correctamente inmovilizado de manera que la cabeza quede alineada con el cuerpo evitando cualquier movimiento durante el procedimiento en especial movimientos de cabeza (Figura 4). Para esto se utilizó una jeringa de tuberculina de 1 cc y una cánula o aguja metálica calibre 19 modificada para no causar daño al introducirla, la cánula fue insertada empujando la cabeza hacia atrás hasta lograr alinear la boca y el esófago, para luego permitir que esta baje por gravedad (sin empujar) hasta alcanzar una profundidad aproximada de 2cm, inmediatamente se vació el contenido de la jeringa que es de 0.2 ml de agua destilada o de la sustancia de *H. patens Jacq.*



Figura 4. Administración intragástrica de sustancia de *H. patens Jacq* en ratón.

3.3.2 Observaciones clínicas.

Se observaron los animales después de la canulación de la sustancia durante las primeras 4 horas, con mayor énfasis los primeros 30 minutos. Se registraron los pesos corporales de cada animal una vez por semana con balanza analítica digital con capacidad para 5 kg los cuales se anotaron en una tabla de apuntes (**cuadro A- 1**) y se evaluaron diferentes parámetros físicos – clínicos a diario en busca de signos de intoxicación los cuales fueron registrados en fichas para cada grupo y cada individuo. (**Cuadro A-2**)

3.4 Toma de muestra sanguínea.

Finalizado el estudio de toxicidad subaguda por 28 días, se tomaron muestras de sangre para exámenes hematológicos y bioquímica clínica para cada animal, para determinar presencia de alteraciones fisiológicas o de toxicidad por la administración de la sustancia. La sangre se obtuvo de la zona retro orbital del plexo venoso con un micro capilar para realizar la punción, sujetando al animal del pliegue cutáneo de la zona cervical o cuello. (Figura 5) Las muestras sanguíneas fueron procesadas en el Laboratorio Clínico del Hospital Rosales de San Salvador, ya que existe un convenio entre el Centro de Investigación y Desarrollo en Salud (CENSALUD) y dicho centro Hospitalario. NOTA: Un ratón adulto su volumen sanguíneo total ronda entre los 78-80 ml/kg de peso vivo. Aproximadamente un total de 2 a 2.5 ml (Timm, 1989).



Figura 5. Toma de muestra sanguínea de la región retro orbital del plexo venoso

3.4.1 Pruebas Hematológicas.

Para el estudio hematológico se obtuvo una cantidad de sangre de 0.25 a 0.30 ml, y se colectó en un tubo pequeño con anticoagulante (EDTA) (figura 6), con capacidad para 0.5 ml de sangre, se identificó según el número de registro de cada animal y grupo de tratamiento al cual pertenece tanto para machos y hembras (cuadro 2). Se determinó la línea roja, plaquetas y línea blanca en busca de alguna alteración en el paquete celular, inmediatamente se trasladaron para su análisis.

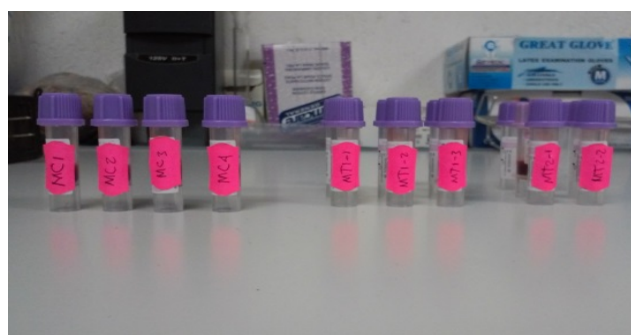


Figura 6. Muestras sanguíneas para Hematología.

Cuadro 4. Etiquetado e identificación de los tubos para hematología y química sanguínea.

Mc 1	Mc 2	Mc 3	Mc 4
MT 1.1	MT 1.2	MT 1.3	MT 1.4
MCE 1.1	MCE 1.2	MCE 1.3	MCE 1.4
MT 2.1	MT 2.2	MT 2.3	MT 2.4
MCE 2.1	MCE 2.2	MCE 2.3	MCE2.4

MC1: macho control más el número del animal correspondiente.

MT 1-1: macho tratamiento uno, más número del animal.

MCE1-1: macho centinela tratamiento uno, más número del animal.

3.4.2 Pruebas de Bioquímica Sanguínea.

Para la Bioquímica sanguínea se realizó de igual manera como la de Hematología. La cantidad de sangre extraída fue de 0.50 ml, se colocó en un tubo colector (eppendorf) sin anticoagulante (figura 7) con capacidad máxima de 1 cc, rotulado de igual manera que los de hematología. Se colocaron en una microcentrifuga (figura A-9) por dos minutos a 4500 rpm para separar el suero del paquete sanguíneo, el suero se recolectó con micropipeta graduada (figura A-10) y colocado en otro tubo eppendorf para su posterior congelamiento a -20 °C (figura A-11) se determinaron los valores de (glucosa, nitrógeno ureico, creatinina, relación nitrógeno ureico/creatinina, colesterol total, triglicéridos, transaminasa glutámica pirúvica (TGP), transaminasa glutámica oxalacética (TGO), bilirrubina total). De igual manera las muestras se enviaron al laboratorio (Hospital Rosales).



Figura 7. Muestras sanguíneas para Química Sanguínea.

3.4.3 Necropsia y estudio macroscópico de órganos.

Concluida la etapa de muestreo sanguíneo los animales fueron sacrificados por dislocación cervical evitando estrés y sufrimiento al animal. Posterior a esto a cada uno se le realizó observaciones post mortem donde se evaluaron diferentes parámetros macroscópicos a los órganos de interés tales como: superficie del órgano (lisa, áspera, granular, arrugada), consistencia (firme, quebradizo, esponjoso), color (homogéneo, manchado), tamaño (mm) y su respectivo peso con balanza digital (g) (**cuadro A-3**) Los órganos evaluados fueron: corazón, pulmón, hígado, bazo, estómago, riñones, intestino delgado e intestino grueso los cuales se fijaron en solución de formol al 10%.

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 Resultados estadísticos.

4.1.1 Observaciones clínicas.

Este estudio de toxicidad subaguda del extracto acuoso de hojas de *H. patens Jacq* (chichipince) en ratones cepa NIH en ambos sexos, no se observaron alteraciones relacionadas al estado clínico. Los animales siempre presentaron una conducta normal, reflejos posturales normales, hábitos de aseo y respuesta habitual a estímulos nociceptivos, consumo de alimento, ingesta de agua y ningún signo ni síntoma que nos indique la presencia de toxicidad. (Cuadro A-4)

4.1.2 Control de pesos semanales.

En los animales machos se observa una tendencia al aumento de peso en los promedios semanales para los grupos tratamientos T1 y T2 en relación al de su grupo control, donde se ve el comportamiento del peso durante el tiempo del estudio. (Cuadro A-5) (Grafico A- 1). Teniéndose al final un valor del aumento porcentual para el grupo control de 9.11%, para el grupo tratamiento T1: 11.73%, y para el grupo tratamiento T2: 12.67%. En la comparación de medias entre el grupo control y los grupos tratamientos se observan diferencias estadísticas significativas, donde se obtiene una Significancia Bilateral (*P valor*) producto de esta comparación, para T1 un *P valor* de 0.00* y T2 un *P valor* de 0.00* (cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto del extracto acuoso de *H. patens Jacq* (chichipince) en los pesos promedio y aumento porcentual en ratones machos NIH en dos concentraciones de T1: 100 mg y T2: 250 mg.

Sexo	MACHOS						
Grupo	Inicio	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4	Aumento (%)	Sig. bilateral (<i>P valor</i>)
Control	25.87 ± 0.89	27.37 ± 0.56	27.92 ± 0.41	29.25 ± 0.84	27.90 ± 1.15	9.11	
T1	26.16 ± 1.18	27.37 ± 1.36	28.62 ± 1.70	29.16 ± 1.98	29.23 ± 1.70	11.73	0.00*
T2	25.07 ± 0.68	26.38 ± 0.83	27.57 ± 1.36	28.26 ± 1.29	28.26 ± 1.44	12.67	0.00*

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (DE), Aumento porcentual (%) y Sig. Bilateral (*P valor*), grupo control (agua destilada), T1 grupo tratamiento 100 mg y T2 grupo tratamiento 250 mg.

En cuanto a las hembras podemos observar un leve aumento del peso promedio semanal para los animales tratados con el extracto acuoso de *H. patens Jacq* durante el periodo de investigación, donde el grupo T1 tiene una leve disminución en la semana dos y grupo T2 una leve disminución en la semana uno (cuadro A-6) (grafica A-2). Teniéndose al final valores del aumento porcentual para el grupo control de 7.55%, grupo tratamiento T1 un valor de 5.84% y para el tratamiento T2 un valor de 5.72%. En la comparación de medias entre grupo control y grupos tratamientos se observa diferencia estadística significativa,

donde se obtiene una Significancia Bilateral (*P valor*) producto de esta comparación, para T1 un *P* valor de 0.00* y para T2 un *P* valor de 0.00* (cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto del extracto acuoso de *H. patens Jacq* (chichipince) en los pesos promedio y aumento porcentual en ratones hembras NIH en dos concentraciones de T1: 100 mg y T2: 250 mg.

Sexo	HEMBRAS						
Grupo	Inicio	sem 1	sem 2	sem 3	sem 4	Aumento (%)	Sib. Bilateral (<i>P</i> valor)
Control	23.04 ±0.19	23.36± 0.78	23.14± 0.18	24.64± 0.51	24.78± 0.52	7.55	
T1	25.30 ±0.77	25.49 ± 0.98	24.97 ± 0.71	26.17 ± 0.77	26.67 ± 1.06	5.84	0.01*
T2	22.00± 0.74	21.94 ± 0.81	22.14± 0.99	23.07 ± 0.97	23.26± 1.03	5.72	0.03*

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (DE), Aumento porcentual (%) y Sig. Bilateral (*P valor*), grupo control (agua destilada), T1 grupo tratamiento 100 mg y T2 grupo tratamiento 250 mg.

4.1.3 Hematología.

Los parámetros hematológicos en los grupos T1 y T2 tratados con las concentraciones del extracto acuoso de *H. patens Jacq*, muestran promedios similares a los observados en su grupo control en todos los componentes del hemograma tanto para los animales machos y hembras. Sin embargo el parámetro de plaquetas en los grupos de hembras T1 y T2 se observan incrementos en sus promedios en relación a los de su grupo control (cuadro A-7) (graficoA-3) y la comparación entre grupos control y tratamientos presentan diferencias estadísticas significativas, donde se obtiene una Significancia Bilateral (*P valor*) para T1 un *P* valor 0.01* y T2 un *P* valor de 0.03* (cuadro 7). En cuanto a los Glóbulos blancos en machos hay una leve disminución en sus promedios en los grupos tratamientos y en hembras un leve incremento en los promedios de los grupos tratamientos, sin presentar diferencias estadísticas significativas.

Cuadro 7. Efecto del extracto acuoso de *H. patens Jacq* en los parámetros hematológicos en ratones NIH en ambos sexo con dos dosis T1: 100 mg y 250 mg.

Parámetro	Grupo	Machos				Hembras			
		Media	±	D.S	Sig. Bilateral	Media	±	D.S	Sig. Bilateral
Glóbulos rojos (10e6/ μ L)	Control	10.84	±	0.29		10.55	±	0.12	
	T1	10.69	±	0.29	0.44	10.42	±	0.42	0.40
	T2	10.65	±	0.30	0.32	10.38	±	0.45	0.30
Hemoglobina (g/dL)	Control	16.58	±	0.22		16.20	±	0.31	
	T1	16.33	±	0.42	0.29	16.00	±	0.63	0.52
	T2	16.39	±	0.41	0.41	16.20	±	0.42	1.00
Hematocrito (%)	Control	53.03	±	0.95		55.22	±	2.29	
	T1	52.46	±	1.13	0.41	56.55	±	3.39	0.45
	T2	52.28	±	1.11	0.27	55.27	±	2.08	0.97
MVC (fL)	Control	49.00	±	1.73		52.36	±	2.05	
	T1	49.14	±	0.87	0.85	54.24	±	1.54	0.07
	T2	49.10	±	0.82	0.89	53.31	±	2.45	0.47
MCH (pg)	Control	15.30	±	0.22		15.34	±	0.24	
	T1	15.28	±	0.30	0.88	15.36	±	0.24	0.88
	T2	15.41	±	0.34	0.56	15.63	±	0.39	0.16
MCHC (g/dL)	Control	31.25	±	0.68		29.38	±	0.86	
	T1	31.10	±	0.37	0.62	28.35	±	0.89	0.05
	T2	31.36	±	0.35	0.70	29.34	±	1.01	0.94
RDW.SD (fL)	Control	32.28	±	0.33		37.50	±	2.46	
	T1	32.33	±	0.99	0.92	38.74	±	1.86	0.29
	T2	32.04	±	0.93	0.53	37.86	±	1.96	0.76
Plaquetas (10e3/ μ L)	Control	1463.25	±	35.45		1302.60	±	114.63	
	T1	1456.50	±	53.78	0.82	1458.90	±	82.70	0.01*
	T2	1458.50	±	57.34	0.88	1430.60	±	88.59	0.03*
VPM (fL)	Control	6.93	±	0.34		7.56	±	0.11	
	T1	6.86	±	0.27	0.73	7.49	±	0.21	0.50
	T2	6.90	±	0.30	0.89	7.56	±	0.21	1.00
G. Blancos (10e3/ μ L)	Control	10.63	±	2.37		10.06	±	2.14	
	T1	8.36	±	1.51	0.07	11.57	±	1.79	0.17
	T2	8.79	±	1.83	0.16	11.18	±	1.62	0.28

Los valores se expresan con la Media \pm Desviación Estándar (DE) y Sig. Bilateral (*p* valor) cuando $P < 0.05$

4.1.4 Bioquímica Sanguínea.

En cuanto a los resultados de la Bioquímica sanguínea, en la mayoría de los parámetros evaluados se observan diferencias entre los valores promedios en ambos grupos tratamientos comparados con los de su grupo control, sin presentar diferencias estadísticas significativas en ambos sexos, exceptuando los parámetros de Bilirrubina total, Nitrógeno ureico y Transaminasa glutámica oxalacética (TGO) únicamente para grupos hembras se observaron diferencias estadísticas significativas la comparación entre grupos tratamientos y su grupo control. (Cuadro 8).

Para el parámetro de Bilirrubina total en el grupo de hembras se observa un leve aumento en el promedio para el grupo T2 con respecto al de su grupo control, presentando diferencia estadística significativa la comparación entre grupo tratamiento T2 respecto a su grupo control, con un P valor de 0.00*. (Cuadro A-8) (Grafico A-4)

En cambio, para el parámetro de Nitrógeno ureico en machos se observan diferencias en los promedios, un leve aumento en el grupo T1 y una leve disminución para el grupo T2 con respecto a su control, pero sin presentar diferencias estadísticas significativas. Mientras que para las hembras se observa una disminución únicamente en el promedio para el grupo T1 respecto a su control, con diferencia estadística significativa con un P valor de valor 0.03* producto de la comparación de grupo tratamiento T1 y su control. (Cuadro A-9) (Grafico A-5).

En cuanto, a la Transaminasa glutámica oxalacética (TGO) debe mencionarse el aumento en los promedios en machos tratados con ambas concentraciones respecto a los de su grupo control, pero sin presentar diferencias estadísticas significativas en la comparación de grupos. Mientras que en hembras se observan aumentos en los promedios los grupos T1 y T2 respecto al grupo control, donde en la comparación entre grupos solo se observa diferencia estadística significativa el grupo T2 con un P valor de 0.02*. (Cuadro A-10) (Grafico A-6)

Cuadro 8. Efecto del extracto acuoso de *H. patens Jacq* en los parámetros de Bioquímica sanguínea en ratones NIH de ambos sexo con dos dosis T1: 100 mg y T2: 250 mg.

Parámetro	Grupo	Machos				Hembras			
		Media	±	D.S	Sig. Bilateral	Media	±	D.S	Sig. Bilateral
Bilirrubina total (mg/dL)	Control	0.17	±	0.00		0.09	±	0.01	
	T1	0.16	±	0.02	0.85	0.09	±	0.05	0.92
	T2	0.15	±	0.02	0.46	0.12	±	0.02	0.00*
Glucosa (mg/dL)	Control	174.25	±	7.63		174.40	±	10.99	
	T1	178.25	±	19.43	0.71	158.38	±	28.67	0.26
	T2	197.50	±	30.39	0.17	182.70	±	32.12	0.47
Nitrógeno ureico (mg/dL)	Control	28.75	±	0.50		27.20	±	1.30	
	T1	30.25	±	2.31	0.24	24.85	±	1.77	0.03*
	T2	27.88	±	2.23	0.47	27.10	±	2.47	0.93
Creatinina (mg/dL)	Control	0.14	±	0.02		0.17	±	0.02	
	T1	0.14	±	0.02	0.46	0.15	±	0.05	0.35
	T2	0.14	±	0.01	0.80	0.18	±	0.02	0.62
Relación BUN/CREA	Control	215.46	±	27.02		161.72	±	22.39	
	T1	212.43	±	30.32	0.87	179.39	±	120.92	0.76
	T2	203.10	±	20.71	0.40	156.72	±	29.20	0.74
Colesterol total (mg/dL)	Control	119.75	±	12.28		85.00	±	17.56	
	T1	115.13	±	9.22	0.48	94.00	±	16.16	0.36
	T2	113.00	±	11.39	0.37	89.10	±	14.83	0.64
Triglicéridos (mg/dL)	Control	276.50	±	70.38		180.60	±	33.22	
	T1	220.63	±	80.62	0.27	153.13	±	80.45	0.49
	T2	197.38	±	24.32	0.14	181.88	±	68.58	0.97
TGO (transaminasa glutámica oxalacética) (UI/L)	Control	79.00	±	16.99		79.00	±	8.00	
	T1	90.00	±	23.69	0.43	87.00	±	20.82	0.43
	T2	94.63	±	24.30	0.28	93.00	±	10.75	0.02*
TGP (transaminasa glutámica pirúvica) (UI/L)	Control	61.25	±	14.66		48.20	±	8.07	
	T1	63.00	±	13.17	0.84	45.00	±	16.54	0.41
	T2	86.63	±	42.70	0.16	48.33	±	10.01	0.98

Los valores se expresan con la Media ± Desviación Estándar (DE) y Significancia Bilateral (*P* valor) cuando *P* < 0.05

4.1.5 Pesos de órganos.

El peso de los órganos extraídos mostró ciertas diferencias entre el grupo control y los grupos tratamientos en ambos sexo de ratones (cuadro 9). El hígado en machos el peso del órgano se observan promedios similares pero sin presentar diferencias estadísticas significativas; mientras que en hembras el peso promedio de los hígados para T1 hay un leve aumento, presentando diferencias estadísticas significativas la comparación entre grupos tratamientos y control con un P valor = 0.02* y para T2 hay una leve disminución en el peso promedio, presentando diferencias estadísticas significativas de P valor = 0.01* respecto a su control. (Cuadro A-11) (Grafico A-7)

Por otra parte los pulmones en machos ambas concentraciones se observan aumentos de peso en sus promedios, únicamente T2 presenta diferencia estadística significativa P valor = 0.01* producto de la comparación entre grupo T2 y su control. Mientras que en hembras guardan similitud en sus pesos promedios con respecto a su grupo control sin diferencia estadística significativa. (Cuadro A-12) (Grafico A-8)

El estómago para machos tratados con tratamientos se observan aumento de pesos promedios respecto a su control, donde T1 presenta diferencia estadística significativa la comparación entre grupos con un P valor= 0.01*. Mientras que en hembras tratadas con ambos tratamientos hay aumento de peso promedio en el órgano sin presentar diferencia estadística significativa. (Cuadro A-13) (Grafico A-9)

Intestino delgado para machos T2 se observa disminución de peso promedio, presentando diferencia estadística significativa P valor = 0.00* producto de la comparación entre grupos respecto a su control y para hembras T1 se observa leve aumento en su peso promedio sin presentar diferencia estadística significativa. (Cuadro A-14) (Grafica A- 10)

Para el caso del intestino grueso para grupos machos mantienen promedios similares respecto a su grupo control sin presentar diferencia estadística significativa y para el grupo de hembras T1 presenta leve aumento en el peso del órgano sin presentar diferencias estadística significativa.

Cuadro 9. Efecto del extracto acuoso de *H. patens Jacq* en los pesos de órganos de ratones machos y hembras NIH.

Parámetro (gr)	Grupo	Machos				Hembras			
		Media	±	D.S	Sig. Bilateral	Media	±	D.S	Sig. Bilateral
Hígado	Control	1.47	±	0.13		1.24	±	0.08	
	T1	1.48	±	0.13	0.84	1.39	±	0.11	0.02*
	T2	1.40	±	0.08	0.29	1.11	±	0.08	0.01*
Corazón	Control	0.12	±	0.01		0.11	±	0.02	
	T1	0.12	±	0.01	0.39	0.27	±	0.41	0.47
	T2	0.13	±	0.03	0.20	0.13	±	0.02	0.09
Pulmones	Control	0.15	±	0.01		0.18	±	0.02	
	T1	0.17	±	0.04	0.40	0.18	±	0.03	0.82
	T2	0.18	±	0.02	0.01*	0.18	±	0.02	0.86
Bazo	Control	0.18	±	0.05		0.24	±	0.01	
	T1	0.13	±	0.03	0.05	0.21	±	0.06	0.18
	T2	0.13	±	0.02	0.17	0.22	±	0.04	0.26
Riñón Izq.	Control	0.23	±	0.01		0.14	±	0.01	
	T1	0.24	±	0.02	0.64	0.17	±	0.02	0.07
	T2	0.23	±	0.02	1.96	0.15	±	0.02	0.42
Riñón Der.	Control	0.22	±	0.02		0.14	±	0.01	
	T1	0.24	±	0.03	0.41	0.16	±	0.01	0.05
	T2	0.26	±	0.04	0.14	0.14	±	0.02	0.87
Estomago	Control	0.45	±	0.08		0.59	±	0.12	
	T1	0.77	±	0.27	0.01*	0.73	±	0.17	0.14
	T2	0.68	±	0.37	0.25	0.64	±	0.13	0.46
Intestino Delgado	Control	2.28	±	0.09		2.00	±	0.26	
	T1	2.10	±	0.24	0.18	2.16	±	0.33	0.43
	T2	1.85	±	0.13	0.00*	1.91	±	0.26	0.54
Intestino Grueso	Control	0.86	±	0.09		0.80	±	0.06	
	T1	0.86	±	0.05	0.87	0.84	±	0.15	0.53
	T2	0.87	±	0.13	0.86	0.80	±	0.09	0.98

Los valores se expresan con la Media ± desviación estándar (D.S) y Significancia Bilateral (*P* valor) cuando $P < 0.05$. Los pesos para cada parámetro están dados en gramos (gr)

4.1.6 Talla de órganos.

Los resultados estadísticos obtenidos en las tallas de los órganos de ratones para ambos sexos tratados con ambas concentraciones, mantienen promedios similares en casi la mayoría de los órganos tallados respecto a los de su grupo control. Únicamente los órganos siguientes presentaron diferencias estadísticas significativas la comparación entre grupos tratamientos y grupo control (cuadro 10). Riñón derecho para hembras T2 se observa disminución de su promedio con diferencia estadística significativa $P= 0.02^*$ producto de la comparación entre grupo con su control (cuadro A-15) (grafico A-11). Mientras que los estómagos de grupos de machos se observan leves incrementos en los promedios, donde solo grupo T1 se observa diferencia estadística significativa la comparación entre los grupos con un $P= 0.01^*$ (cuadro A-16) (grafico A-12). Por otra parte, intestino grueso de grupos de machos tratamientos se observan leves aumentos en sus promedios respecto a su control, donde ambos grupos tratamientos presentan diferencias estadísticas significativas, para T1 un valor $P= 0.01^*$ y T2 un valor $P= 0.02^*$ la comparaciones entre grupos respecto a su control (cuadro A-17)(grafico A-13)

Cuadro 10. Efecto del extracto acuoso de *H. patens Jacq* en las tallas de los órganos de ratones NIH.

Parámetro (mm)	Grupo	Machos				Hembras			
		Media	±	D.S	Sig. Bil.	Media	±	D.S	Sig. Bil.
Hígado	Control	2.65	±	0.26		2.26	±	0.05	
	T1	2.41	±	0.29	0.19	2.36	±	0.21	0.19
	T2	2.34	±	0.21	0.05	2.17	±	0.21	0.22
Corazón	Control	0.88	±	0.10		0.78	±	0.08	
	T1	0.79	±	0.06	0.09	0.84	±	0.10	0.26
	T2	0.78	±	0.07	0.07	0.79	±	0.06	0.79
Pulmones	Control	1.18	±	0.10		1.16	±	0.18	
	T1	1.19	±	0.14	0.87	1.30	±	0.20	0.21
	T2	1.08	±	0.07	0.07	1.24	±	0.32	0.61
Bazo	Control	2.10	±	0.26		2.36	±	0.18	
	T1	2.06	±	0.20	0.79	2.23	±	0.22	0.27
	T2	2.00	±	0.12	0.37	2.23	±	0.18	0.21
Riñón Izq.	Control	1.15	±	0.06		1.00	±	0.07	
	T1	1.13	±	0.10	0.67	0.98	±	0.09	0.68
	T2	1.08	±	0.12	0.26	0.96	±	0.10	0.43
Riñón Der.	Control	1.10	±	0.00		1.02	±	0.04	
	T1	1.08	±	0.13	0.60	0.98	±	0.08	0.32
	T2	1.14	±	0.12	0.40	0.89	±	0.14	0.02*
Estomago	Control	1.43	±	0.10		1.72	±	0.04	
	T1	1.83	±	0.23	0.01*	1.82	±	0.18	0.12
	T2	1.64	±	0.37	0.29	1.63	±	0.24	0.27
Intestino Delgado	Control	46.88	±	1.44		42.40	±	4.34	
	T1	45.75	±	4.23	0.62	47.05	±	7.14	0.21
	T2	47.31	±	3.75	0.83	40.75	±	4.65	0.52
Intestino Grueso	Control	8.43	±	0.15		9.10	±	1.02	
	T1	9.71	±	1.07	0.01*	9.76	±	1.27	0.33
	T2	9.05	±	0.58	0.02*	9.60	±	0.84	0.33

Los valores se expresan con la Media ± desviación estándar (D.S) y Significancia Bilateral (*P* valor) cuando $P < 0.05$. Las tallas para cada parámetro están dadas en milímetros (mm)

4.2 Discusión de resultados.

Zeinsteger *et al* (2003), menciona que la sintomatología de la intoxicación se caracteriza por alteraciones en la locomoción, convulsiones, actitudes posturales anormales y consecuentes inanición y muerte.

Por otra parte, en este estudio y lo descrito en el apartado de resultados, la administración del extracto acuoso de *Hamelia patens Jacq* (chichipince), no se evidenció la presencia de alteraciones clínicas en los animales de laboratorio para ambos sexos. Por lo tanto la sustancia estudiada en las concentraciones establecidas no presentó ningún signo de deterioro evidente en la salud a causa de un proceso de toxicidad como: ataxia, parálisis, pilo erección, problemas respiratorios, posturas anormales, diarrea, sangrado, temores o convulsiones, ni muerte de los animales de experimentación. Lo que concuerda con el uso seguro de *H. patens* reportado recientemente por otros autores en un artículo de revisión (Ahmad *et al.* 2012).

En cuanto, Mancebo en 2002, afirma que los datos referentes al peso corporal poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones debido a productos químicos, incluso aquellos de baja toxicidad; por lo que, la disminución de más del 10% del peso corporal es considerada un indicativo de efectos adversos a la salud.

Considerando que normalmente después de la administración de sustancias tóxicas se producen pérdidas de peso como consecuencia de la movilización de reservas energéticas del individuo para enfrentar la actividad metabólica incrementada que acompaña los procesos de desintoxicación (Rodríguez, S. 1998). Moreno *et al* 2013, concuerda también que la pérdida de peso corporal, puede atribuirse a la actividad metabólica incrementada como parte de los procesos de desintoxicación.

Respecto al peso corporal como indicador de toxicidad se observó un comportamiento dentro de los parámetros establecidos para la curva de crecimiento de la especie y de la línea de investigación. La administración del extracto acuoso de hojas de *H. patens jacq*, (chichipince) en dos diferentes concentraciones no afectó la ganancia diaria de pesos de los animales machos con los tratamientos, los cuales tuvieron tendencia al incremento en sus promedios semanales y presentando diferencias estadísticas significativas la comparación entre el aumento porcentual de los grupos tratamientos respecto a su grupo control. Según Pordomingo *et al.* (2004), los taninos son sustancias que estimulan el aumento de peso y esta puede ser una de las razones por lo que los machos tratamientos hayan presentado mejores aumentos porcentuales que los machos control.

Por otra parte, Moreno *et al* 2013. Este aumento podría estar relacionado a un mayor consumo de alimento debido que la sustancia de estudio podría tener propiedades para la estimulación del apetito, pero lo cual debe estar sujeto a futuros estudios con dicho extracto

Las respuestas entre machos y hembras se han relacionado con sus diferencias en una gran variedad de procesos fisiológicos (por ejemplo, las hembras pueden excretar una mayor cantidad de algunas sustancias tóxicas en las hemorragias menstruales y en la leche transfiriéndolas al feto, pero sin embargo experimentan una tensión adicional durante el embarazo, el parto y la lactancia), actividades enzimáticas, mecanismos de reparación genética y factores hormonales, así como con la presencia de depósitos de grasa relativamente mayores en las hembras, lo que produce una mayor acumulación de algunos tóxicos lipófilos, como los disolventes orgánicos y algunos fármacos. (Castro, V. et , al. 2004) Respecto a lo anterior, esto podría explicar el leve incremento de pesos promedios en los animales hembras tratamiento. Lo cual indicaría que en hembras haya una mayor susceptibilidad a cambios fisiológicos y movilización de mayores reservas energéticas para enfrentar la actividad metabólica incrementada.

Los exámenes hematológicos y de bioquímica sanguínea son indicadores del alcance y la profundidad de los efectos adversos de una sustancia sobre un órgano específico (González et al. 2006). Además el estrés causado por la manipulación e inmovilización suele ocasionar una elevación del hematocrito y recuento de leucocitos así como variaciones en los valores de bioquímica sanguínea. (Ávila Illanes, J.A. et al. 2013). Por otra parte Meyer & Harvey, Sf. La trombocitosis es el recuento plaquetario por encima del rango de referencia normal, en líneas generales es secundaria a la hiperproducción de trombopoyetina u otros factores, la trombocitosis secundaria puede ocurrir luego de la hemorragia o en asociación a ella. Esto es especialmente común cuando la hemorragia activa causa anemia por deficiencia de hierro, también puede suceder con algunas anemias hemolíticas, en diversas enfermedades inflamatorias crónicas y como respuesta de rebote a la trombocitopenia.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los diferentes parámetros para la hematología en animales machos y hembras las leves variaciones observadas en los diferentes promedios, no corresponden a un proceso de toxicidad ya que, guardan relación a los de su grupo control sin presentar diferencias estadísticas significativas. En cuanto a la presencia de diferencias estadísticas significativas en plaquetas para hembras T1 y T2, podrían tener relación al aumento en la actividad metabólica y no a un proceso de toxicidad y desde el punto de vista clínico esos valores obtenidos en grupos tratamientos guardan estrecha

relación con los de su grupo control. Aunque Suckow, M.A, *et al.* Sf, determina promedios de plaquetas en ratones de laboratorio en rangos de los 1084 – 1992 $10^3/\mu\text{L}$, por lo tanto, los valores obtenidos en la investigación para los grupos tratamientos están dentro de los rangos normales para esta especie animal.

Las alteraciones bioquímicas del organismo son resultado de la exposición a un compuesto químico que también modifica la composición celular sanguínea (Mancebo *et al* 2002). De las pruebas analíticas que se realizan en los laboratorios, sin duda el grupo que determina el funcionalismo hepático es de los más solicitados. El hígado, cuya función es múltiple, es un órgano vital encargado de eliminar, metabolizar, almacenar y vehicular diversas sustancias y fármacos. (Sánchez Visconti, G. 2009).

En cuanto a la bioquímica sanguínea reportada en este estudio, se observa diferencias estadísticas significativas únicamente los parámetros de Bilirrubina total, Nitrógeno ureico y Transaminasa glutámica oxalacética únicamente en hembras. Un aumento de la bilirrubina total en general y de la bilirrubina conjugada en particular, sugiere una obstrucción del conducto biliar. (Sánchez Visconti, G. 2009). En cuanto a la urea, esta se sintetiza en el hígado, por lo que una disfunción hepática puede dar valores de BUN bajos. (Sánchez Visconti, G. 2009).

La AST (aspartato-aminotransferasa) o TGO (transaminasa glutámica oxalacética) es una enzima muy sensible pero muy poco específica a la hora de determinar disfunciones hepáticas. Su sensibilidad es alta debido a que es una enzima que se localiza en el citosol y las mitocondrias de las células, por lo que una elevación puede indicar una lisis completa del hepatocito. Las elevaciones de TGO suelen ir asociadas a las de TGP en alteraciones del hígado. Sin embargo, no es un marcador hepático muy específico, ya que se encuentra en considerables cantidades en el músculo estriado y cardíaco. También se eleva con cortico esteroides y fenobarbital. (Sánchez Visconti, G. 2009).

Por lo tanto, estas leves variaciones en estos parámetros, podría confirmarse según Cai Yan, *et al* 2003, que determina que las hembras son más susceptibles a la toxicidad de un compuesto. Desde el punto de vista clínico los valores obtenidos para Bioquímica Clínica con diferencias estadísticas significativas, guardan estrecha relación en cuanto a los de su grupo control. Por lo tanto no podríamos atribuir un efecto tóxico por parte de la sustancia de ensayo.

Por otra parte, en relación a los órganos, los cambios en el tamaño, forma, superficie, color, consistencia y peso; determinan la presencia de daños toxicológicos (Höfle 2007). Por su

parte Dybing *et al* 2002 explica que el peso relativo de los órganos es fundamental para diagnosticar si el órgano fue expuesto a la lesión o no. El corazón, el hígado, el riñón, el bazo y los pulmones son los primeros órganos afectados por reacción metabólica causada por agente tóxico. Igualmente, Kumar *et al* 2008 explica que la hinchazón celular es la primera manifestación de casi todas las formas de lesión en las células, y es más manifiesta considerando el órgano en su totalidad, pues cuando afecta a muchas células de este causa una cierta palidez, aumento de la turgencia y en el peso.

De esta manera se explicaría, los resultados obtenidos en los pesos y tallas de los órganos de ratones machos y hembras tratados con el extracto acuoso de *Hamelia patens Jacq*, donde hubo diferencias estadísticas significativas en relación a su grupo control. Pero desde el punto de vista clínico en el estudio macroscópico no se evidenció presencia de alteraciones en tamaño, forma, consistencia, superficie y color de los órganos que nos indiquen un efecto toxico debido a la administración de la sustancia de estudio.

5. CONCLUSIONES.

El estudio toxicológico con el extracto acuoso de *Hamelia patens Jacq* por vía oral por 28 días en ratones de ambos sexo, no se presentaron signos de toxicidad ni disminución en el peso corporal en los ratones en ambos sexos.

Los resultados obtenidos para Hematología y Química Clínica en hembras, guardan estrecha relación con los de su grupo control, por lo tanto no son indicativos de un efecto de toxicidad causado por el extracto acuoso en las dosis utilizadas.

Las variaciones de promedios de pesos y tallas de órganos, no son indicativos de un efecto de toxicidad por parte de la sustancia, ya que, al estudio macroscópico de órganos no se evidenció lesiones o daño.

6. RECOMENDACIONES.

Debido a que los animales tuvieron tendencia al incremento de peso significativamente en machos más que todo, se recomienda evaluar si el extracto acuoso de *Hamelia patens Jacq* tiene algún efecto para el estímulo del apetito.

Se recomienda en futuras evaluaciones con el extracto acuoso de *Hamelia patens Jacq*, se utilicen animales machos, debido que en hembras podrían existir más fuentes de variaciones fisiológicas y metabólicas que interfieran con los resultados, quedando a criterio de cada investigador y acorde a la investigación que se realice.

Se recomienda incluir un estudio Histopatológico en futuras evaluaciones con el extracto acuoso de *Hamelia patens Jacq*, para determinar la presencia de daño celular.

7. BIBLIOGRAFÍAS.

Abramov, A.Y.; Zamaraeva, M.V.; Hagelgans, A.I.; Azimov, R.R.; Krasilnikov, O.V. 2001. Influence of plant terpenoids on the permeability of mitochondria an lipid bilayers. Chem.

Ahmad A, Pandurangan A, Singh N, Ananad P. 2012. A mini review on chemistry and biology of *Hamelia Patens* (Rubiaceae). Pharmacognosy Journal 4(29):1-4.

Akihisa T & K Yasukagua. 2001. Antitumor promoting and anti-inflammatory activities of triterpenoids and sterol from plants and fungi. In Stud. Nat. Prod. Chem. ED Elsevier SC. 25 43-87. Toxicol., 51: 36.

Akbarabad M.A & P. Murugaian. 2000. Aspects of the male reproductive toxicity/male antifertility property of andrographolide in albino rats: effect on the testis and the cauda epididymidal spermatozoa. Phytother Res. 14(6):432-5.

Arcila VH. Patología y diagnóstico clínico en pequeños y grandes animales. Bogotá: Universidad Cooperativa de Colombia; 2005.

Ávila Illanes, J.A. et al. 2013. Determinación de valores de referencia hematológicos y bioquímicos en ratones albinos swiss criados y reproducidos en el bioterio de Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas. En línea, PDF. BO, La Paz. Disponible en: http://www.revistasbolivianas.org.bo/pdf/rcfb/v1n1/v1n1_a09.pdf

Bar N. 2004. Un hito científico: Se secuencio el genoma del ratón, principal modelo experimental. Pro Diversidad. Recuperado de <http://www.prodiversitas.bioetica.org/prensa/40.htm>

Balkaya, M., Voyvoda, H., Ünsal, C., Çeler, H. (2001). Some hematological and biochemical characteristics of male and female Sprague-Dawley rats. Disponible en: <http://veteriner.istanbul.edu.tr/vetfakdergi/yayinlar/2001-1/Makale-5.pdf>.

Benjamín M. Manual de patología clínica en veterinaria. México D.F.: Editorial Limusa; 1991.

Bouc P.J & J.H Lamprecht. 1999. Plant sterols and sterolins: a review of their immunomodulating properties. *Altern Med Rev.* 4(3):170-7.

Bruning, W. 1974. Intoxicaciones vegetales en la infancia. *Rev. Chilena Pediatría*, Vol. 45, N^o 1.

Brundtland, G. 2003. Access to essential medicines: a global necessity. In: *Essential drugs monitor.* World Health Organization (ed), Switzerland. 32:12-13.

Cai Yan, Dai Tiane, Ao Yan, Konishtamiko I, Chuang Kuang-Hsiang, Lue Yanhe, Chang Chawnshang, Wan Andyu-Jui Yvonne. (2003). Cytochrome P450 Genes Are Differentially Expressed in Female and Male Hepatocyte Retinoid X Receptor Deficient Mice. *Endocrinology* 144(6):2311–2318.

Cáceres, A. 1996. Plantas de Uso Medicinal en Guatemala. Guatemala, GT. Editorial Universitaria. p.133 – 134

Castro, V.; Da Costa, F.; Garcia-Pineres, A.; Kisiel, W. ; Klaas, C.; Merfort, I.; Murillo, R.; Rüngeler, P.; Schulte- Mönning, J. y Siedle, B. (2004). Quantitative structure activity relationship of sesquiterpenelactones as inhibitors of the transcription factor NF-kappaB. *Journal of Medicinal Chemistry* , 47,6042-6054.

Coles E. 1989. Diagnóstico y patología en veterinaria. 4. ^a ed. México D.F.: Interamericana, McGraw-Hill.

Cunningham, S.A. 1994. Measuring the relationships between floral duration and fruit set for *Hamelia patens* (Rubiaceae). *Biotropica* 26(2): 227-229.

Doxey DL. Patología clínica y procedimientos de diagnóstico en veterinaria. México D.F.: Editorial Manual Moderno; 1987

Dybing, E.; Doe, J.; Groten, J.; Kleiner, J.; O'Brien, J. (2002). Hazard characterization of chemicals in food and diet: dose response, mechanism and extrapolation issues. *Food Chem. Toxicol.* 42, 237-282.

Erazo, L; Van Leeuwen, R; Marroquín, H. 2001. Medicinas etnoveterinarias: Conocimiento campesino en El Salvador. (En línea). San Vicente-San Carlos Lempa. SV. 6p. Consultado en: 10 de Febrero de 2015. PDF. Disponible en: http://www.ethnovetweb.com/docs/leeuwen_annex16.pdf

Fuentes Paredes, FM de; Mendoza Yanavilca, RA; Rosales Fernández, AL; Cisneros Tarmeño, RA. 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. (En línea). Lima, PE. Instituto Nacional de Salud. Consultado el 3 de Diciembre de 2014. PDF. Disponible en: http://www.ins.gob.pe/insvirtual/images/otrpubs/pdf/GUIA_ANIMALES_RATON.pdf

García Escobar, IR 2009. Evaluación clínica e histológica de heridas que cicatrizan por segunda intención en perros, al tratarlas con chichipince (*Hamelia patens Jacq*). Médico Veterinario. Guatemala, GT. Universidad de San Carlos de Guatemala. 61p.

González Y, Scull CI, Bada AM, Fuentes D, Gonzalez B, Argueta ME, et al. 2006. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas durante 28 días del extracto acuoso de *Cecropia peltata* L. (yagruma) en ratas Cenp: SPRD. Rev Cubana Plant Med 11(2).

González, Julio César. 1992. “Botánica Medicinal Popular, Etnobotánica Medicinal de El Salvador”; Asociación Jardín Botánico La Laguna, Antiguo Cuscatlán, septiembre 1992, páginas 7, 25, 29, 31, 44, 46, 51, 64, 74, 76, 85, 89, 94, 98, 110, 124, 125, 128.

GRIN (Germplasm Resources Information Network, US.). 2007. GRIN Taxonomy for Plants: *Hamelia patens* Jacq (En línea). Consultado 8 Enero. 2015. Disponible en: <http://www.arbolesornamentales.com/Hameliaapatens.htm>

Howard, R. A. 1989. Flora of the Lesser Antilles, Leeward and Windward Islands. Vol. 6. Arnold Arboretum, Harvard University, Jamaica Plain, MA. 658 p.

Höfle U. (2007). Técnicas de Diagnóstico Post-Mortem: Necropsia y Toma de Muestras. España: Sevilleja de la Jara. Disponible en: http://encontroiberico.no.sapo.pt/docs/Necropsias_TomaMuestras_UHofle.pdf

Hsu H.Y, Yang .JJ & C.C Lin. 1997. Effects of oleanolic acid and ursolic acid on inhibiting tumor growth and enhancing the recovery of hematopoietic system postirradiation in mice. *Cancer Lett.* 111(1-2):7-13.

Ibisch, P. L., S. G. Beck, B. Gerkmann & A. Carretero. 2003. Ecoregiones y ecosistemas. Pp 47–88. En: P. Ibisch & G. Mérida (eds.). *Biodiversidad: La Riqueza de Bolivia. Estado de Conocimiento y Conservación.* Fundación Amigos de la Naturaleza, Santa Cruz de la Sierra.

Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Mitchell, Richard N. (2008). Robbins Patología humana 8ª edición. ElServier Sounders.

Liogier, H.A. 1990. Plantas medicinales de Puerto Rico y del Caribe. Iberoamericana de Ediciones, Inc. San Juan, PR. 566 p.

Liogier, H.A. 1997. Plantas medicinales de Puerto Rico y del Caribe. Iberoamericana de Ediciones, Inc. San Juan, PR. 566 p.

Lin C.N; Lu C.M; Cheng.M.K; Gan k.h & S.J Won. 1990. The cytotoxic principles of *Solanum incanum*. *J Nat Prod (Lloydia)*; 53 (2).

Li J, Guo WJ & QY Yang . 2002. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J Gastroenterol.* 8(3):493-5.

Little, E.L., Jr., R.O. Woodbury, and F.H. Wadsworth. 1974. Trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Vol. 2.. *Agriculture Handbook* 449. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC. 1,024 p.

López Luengo, T. 2001. Saponósidos (en línea). Consultado 28 mar. 2009. Disponible en http://www.doymafarma.com/doymafarma/ctl_ser_vlet?_f=37&id=13015492 SI

Maldonado, C. 2005. Las rubiáceas encontradas en el proyecto de Inventario Botánico de la región de Madidi. *Ecología en Bolivia*, Vol. 40(3): 199-211

Mancebo A, Scull I, González Y, Arteaga M, González B, Fuentes D. (2002). Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. Rev Toxicol. 19:73 -8.

Marshall, M.V., Draney, D., Sevick-Muraca, E.M., Olive, D.M. (2010) Single-Dose Intravenous Toxicity Study of IRDye800CW in Sprague-Dawley Rats. Mol Imaging Biol DOI: 10.1007/s11307-010-0317x

Melo A. A; Querol C. B; Henríquez A. T & J. A Henríquez. 1986. Cytostatic, cytotoxic and mutagenic effects of voacristine, an indole alkaloid in wild-type and repair-deficient yeasts. Mutation research, 171(1), 17-24.

Meyer & Harvey, Sf. El laboratorio en Medicina Veterinaria; Interpretación y Diagnostico. Ed 2. Inter-Medica editorial.

Moreno Mendoza, M. A., Parada Palacios, E. A., Mejía Valencia, J.G., Espinoza Madrid, P. A. (2013). Toxicología subcrónica de infusión de *Chenopodium ambrosioides* (epazote) por administración oral en ratones NIH. Revista Cubana de Plantas Medicinales 18(1) 157-170.

Naithani V; Haider S & P Kakkar. 2001 Plant toxins: a historical, evolutionary, economic and toxicological account. Journal of Ecophysiology & Occupational Health, 1(3 & 4), 339-364.

Núñez, M.D. 1982. Plantas medicinales de Costa Rica y su folclore, Editorial Universidad de Costa Rica. 318p.

OECD. (1998). Guideline for the testing of chemicals N° 408. Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Organization for Economic Cooperation and Development.

OECD. (2001). Guideline for Testing Of Chemicals N°420. Acute Oral Toxicity–Fixed Dose Procedure. Organization for Economic Cooperation and Development.

Ovesná Z, Kozics K & D Slamenová . 2006. Protective effects of ursolic acid and oleanolic acid in leukemic cells. **Mutat Res.** 600(1-2):131-7. Epub 2006 Jul 10.

Paciorek, C.J., B.R. Moyer, R.A. Levin, and S.L. Halpern. 1995. Pollen consumption by the hummingbird flower mite, *Proctolaelaps kirmsei*, and possible fitness effects on *Hamelia patens*. *Biotropica* 27(2): 258-262.

Pordomingo, A., Volpi Lagreca, G., García Pilar T. & G. Grigioni. 2004. Efecto del Agregado de Taninos en Dietas de Distinto Nivel de Grano en Vaquillonas para Carne Alimentadas en Confinamiento Sobre la Calidad de la Carne. Investigación en Producción Animal. Región Subhúmeda y Semiárida Pampeana, Boletín de Divulgación Técnica. EEA Anguil. No. 88 Pág. 72 -82.

Peña, C. 2001. Toxicología ambiental: Evaluación de riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at

PLANTER. 1989. Aprovechamiento de Extractos Vegetales de la Flora Salvadoreña. OPS – OMS. v. 1. p. 495 SI

Quesada Hernández, A. 2008. Las plantas medicinales. *Revista biocenosis*. 20: 1-23

Raintree Nutrition. 2004. Biological Activities for Extracts and compoends of Scarlet Bush (*Hamelia patens*). www.rain-tree.com

Raintree Nutrition. 2001. Scarlet bush. Raintree Nutrition, Inc. 3p. <http://www.raintree.com/scarletbush.htm>.

Reyes Chilpa R; Rivera J; Oropeza M; Mendoza P; Amekraz B; Jankowski C & M Campos. 2004. Methanol extracts of *Hamelia patens* containing oxindole alkaloids relax KCl-induced contraction in rat myometrium. *Biological & Pharmaceutical Bulletin* (2004), 27(10), 1617-1620.

Rios M. Y & B Aguilar-Guadarrama. 2006. Alcaloides indólicos, terpenos, esteroles y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). *Rev Cubana Plant Med*; 11(1)

Ríos M. Y & B Aguilar-Guadarrama. 2006. Alcaloides indólicos, terpenos, esteroides y flavonoides de las hojas de *Hamelia patens* Jacquin (Rubiaceae). *Rev Cubana Plant Med*; 11(1)

Rodríguez, S. et al. 1998. Toxicología de VA-DIFTET por aplicación a dosis única en ratones. *Revista de Toxicología*. 1998. (15)59-63

Romero, A.; Zeinsteger, P.; Teibler, P.; Montenegro, M.; Ruiz de Torrent, R.; Ríos, E.; Acosta de Pérez, O. 2001-2002. Lesiones hepáticas inducidas por componentes volátiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones. *Rev. Vet.* 12/13: 1 y 2.

Sánchez Visconti, G. 2009. Función hepática y parámetros analíticos; *Revista de la asociación Madrileña de veterinarios de animales de compañía*. C/ Querol, 4. 28033-Madrid

Suckow, M.A. et al sf. The Laboratory mouse- the book.

Scofield, D. 1998. All Native Plants of South Florida. Consultado el: 10 de Octubre del 2000. Disponible en: www.fig.cox.miami.edu

STEYERMARK, J.A. 1974. Rubiaceae en: T. LASSER (ed.), *Fl. Venez.*, vol. 9, part. 1, 2, 3

Timm, KI. 1989. Orbital venous anatomy of the Mongolian Gerbil with comparison to the mouse, hamster and the rat. *Laboratory Animal Science*, **39**, 262-264.

Tokuda H, Ohigashi H, Koshimizu K & Y Ito. 1986. Inhibitory effects of ursolic and oleanolic acid on skin tumor promotion by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Cancer Lett.* 33(3):279-85.

Vivas Garay, JA. 2008. Toxicología Veterinaria. (en línea). Universidad Nacional Agraria. Managua. NI.Consultado 13 octubre 2017. Disponible en: <http://repositorio.una.edu.ni/2448/1/nl74V856.pdf>

Zeinsteger P. A; Romero A; Montenegro M; Ríos E; Acosta de Pérez O. C & N.L Jorge. 2003. Toxicidad de la planta *Ipomoea fistulosa* (aguapeí o mandiyurá) en ratones.

Universidad Nacional Del Nordeste. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Resumen: V-018. SI

Zeinsteger, P.A; Acosta de Pérez, O.; Teibler, P.; Rios, E.; Jorge, N. 2001. Hepatotoxicidad de compuestos volátiles de *Senecio grisebachii* (primavera). Comunicaciones Científicas y Tecnológicas – Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes. Publicación sin referato. SI

Zeinsteger, A.; Teibler, P; Montenegro, P.; Rios, A.; Acosta de Pérez, O. 2003. Toxicidad hepática de componentes volátiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones. Universidad Nacional del Nordeste Abstracts V-017

8. ANEXOS.

Marcado y etiquetado de los grupos experimentales.



Figura A- 1. Marcado con ácido pícrico



Figura A- 2. Etiquetado y conformación de grupos.

Metodología para preparación del extracto acuoso.



Figura A- 3. pesado de la harina de chichipince



Figura A- 4. cocción a 340°C



Figura A- 5. Filtrado de sustancia



Figura A- 6. tubos llenos en Holder



Figura A- 7. programación de GENEVAC.



Figura A- 8. GENEVAC.

Extracción de suero sanguíneo para Bioquímica clínica.

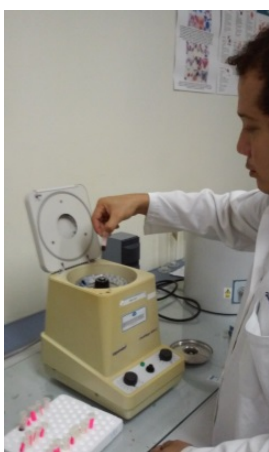


Figura A- 9. Centrifugado.



Figura A- 10. Pipeteo de suero sanguíneo.



Figura A- 11. suero sanguíneo

Cuadro A- 2. Hoja de observaciones clínicas.

Protocolo: _____ Sustancia de ensayo: _____
 Concentración o dosis: _____ Fecha inicio: _____ Fecha final: _____ Semana n°: _____
 Vía administración: _____ Sexo _____ Especie: _____ Cepa: _____ Edad inicial: _____

Grupo: control tratamiento centinela

Parámetro de Toxicidad	Animal	ANIMAL 1						ANIMAL 2						ANIMAL 3						ANIMAL 4						ANIMAL 5					
	Día	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D1	D2	D3	D4	D5	D6
Ataxia																															
Deshidratación																															
Diarrea																															
Parálisis																															
Pilo-erección																															
Respiración ▪																															
Salivación																															
Sialorrea																															
Tremores y convulsiones																															
Vasodilatación periférica																															
Vasoconstricción periférica																															
Actividad Motora ○																															
Apariencia de piel *																															
Ojos y membranas mucosas *																															
Reacción a estímulos ○																															

Clave:

- 0 Normal 1 Acelerada 2 Disminuida
- 0 Normal 1 Ausente 2 Exagerada
- * 0 Normal 1 Enrojecimiento 2 Sequedad 3 Excesiva humedad

OBSERVACIONES:

Responsable: Denis Morales

Cuadro A- 4. Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación.

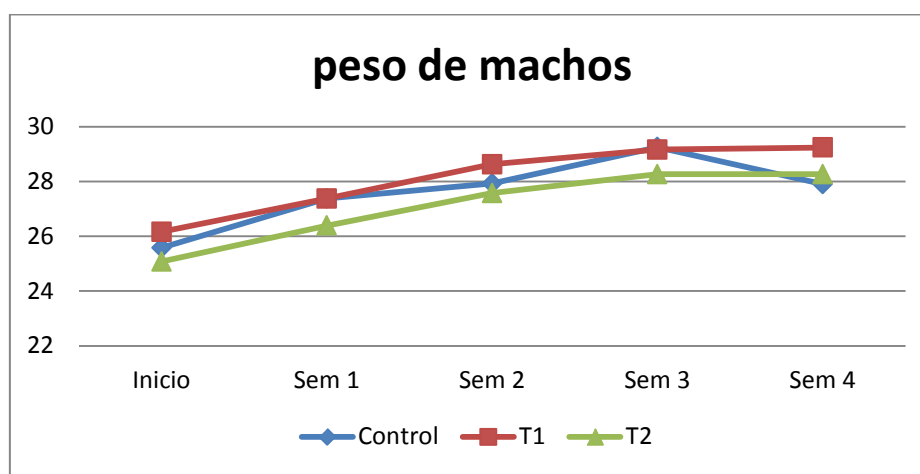
Apariencia pelo	Textura, color, caída.
Apariencia piel	Enrojecimiento, sequedad, exudación.
Ojos y membranas mucosas	Enrojecimiento, sequedad, secreción anormal.
Ataxia	Pérdida del equilibrio, caminata errática.
Parálisis	Pérdida de respuesta en cualquier extremidad.
Reacción a estímulos	Respuesta al tacto o ruido.
Vasoconstricción periférica	Palidez.
Vasodilatación periférica	Enrojecimiento
Pilo-erección	Pelaje erizo.
Salivación	Exceso de secreción bucal.
Actividad motora	Aumento o disminución de la actividad normal, refleja o no.
Tremores y convulsiones	Contracción muscular anormal espontánea. Contracción o estiramiento muscular descontrolado.
Respiración	Aumento o disminución en la frecuencia respiratoria.
Deshidratación	Prueba de Robinou: pellizco de la piel, sin el retorno de esta a su posición normal.
Diarrea	Heces blandas o deposición acuosa

Controles de pesos en machos y hembras.

Cuadro A- 5. Pesos promedios de grupos machos.

	Inicio	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
Control	25.575	27.375	27.925	29.25	27.9
T1	26.162	27.375	28.625	29.162	29.237
T2	25.075	26.387	27.575	28.262	28.262

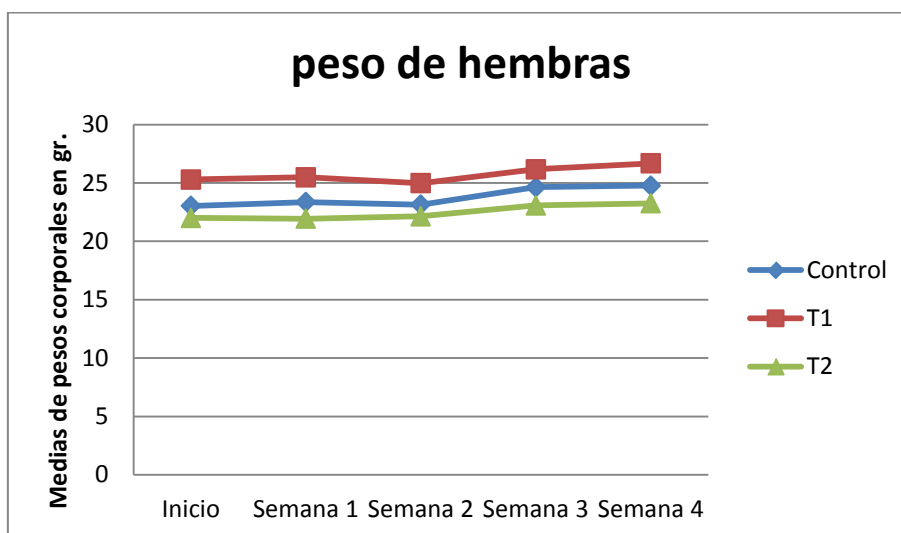
Figura A- 12. Representación de los pesos promedios en grupos machos.



Cuadro A- 6. pesos promedios de los grupos hembras.

	Inicio	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 4
Control	23.04	23.36	23.14	24.64	24.78
T1	25.3	25.49	24.977	26.17	26.677
T2	22	21.94	22.14	23.07	23.26

.Figura A- 13. representación de los pesos promedios en grupos hembras.

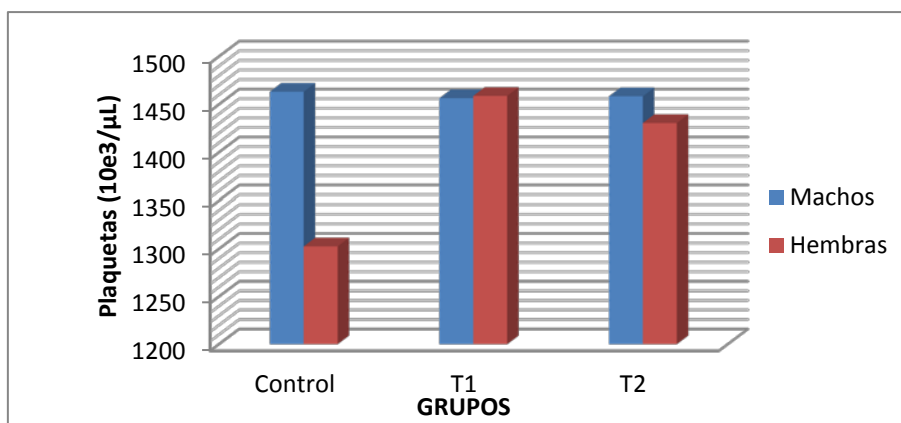


Comportamiento del parametro plaquetario entre machos y hembras.

Cuadro A- 7. promedios de Plaquetas en machos y hembras.

	Grupo	Machos	Hembras
Plaquetas (10e3/ μ L)	Control	1463.25	1302.6
	T1	1456.5	1458.9
	T2	1458.5	1430.6

Figura A- 14. comparacion del parametro de plaquetas en machos y hembras.



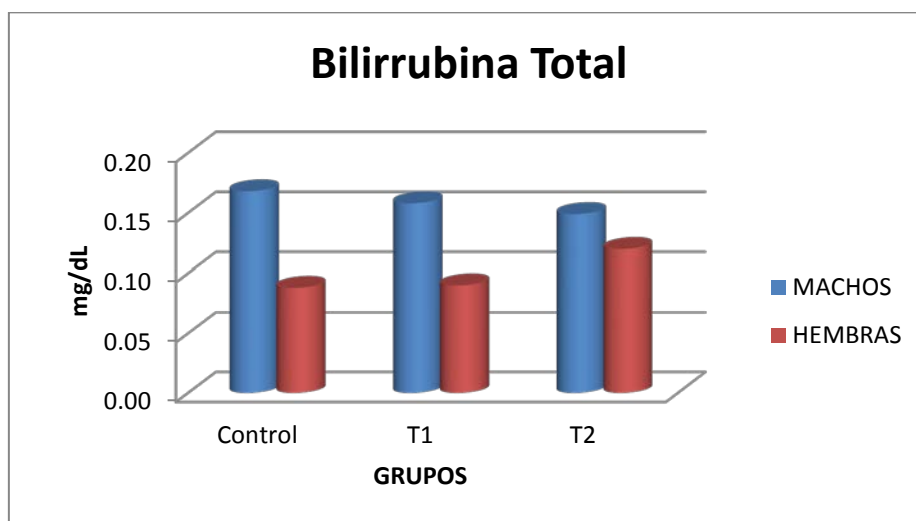
Suckow, M.A, et al. Sf, 1084 – 1992 10e3/ μ L

Comportamiento de los parámetros Bioquímica Clínica.

Cuadro A- 8. Promedios de Bilirrubina total en machos y hembras.

B. total (mg/dL)	MACHOS	HEMBRAS
Control	0.17	0.09
T1	0.16	0.09
T2	0.15	0.12

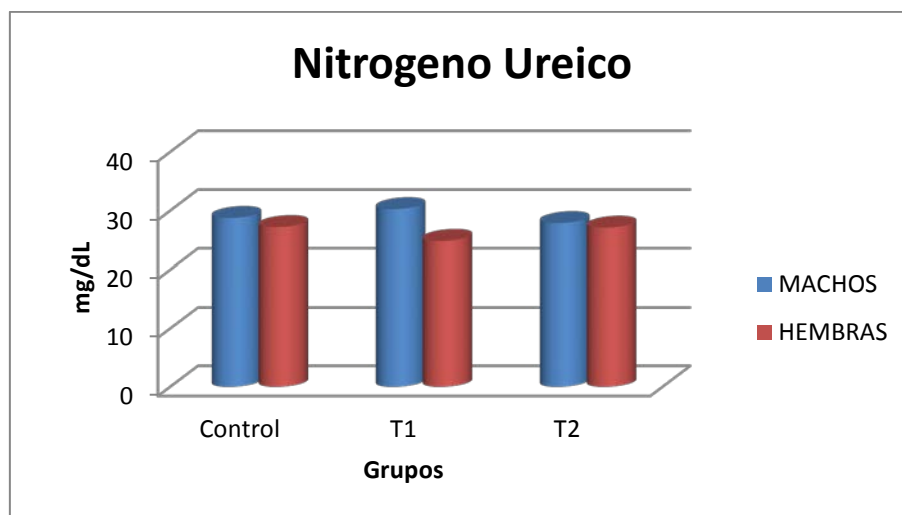
Figura A- 15. Comparación de la Bilirrubina total en machos y hembras.



Cuadro A- 9. Promedios de Nitrógeno ureico en machos y hembras.

N. Ureico	MACHOS	HEMBRAS
Control	28.75	27.2
T1	30.25	24.85
T2	27.87	27.1

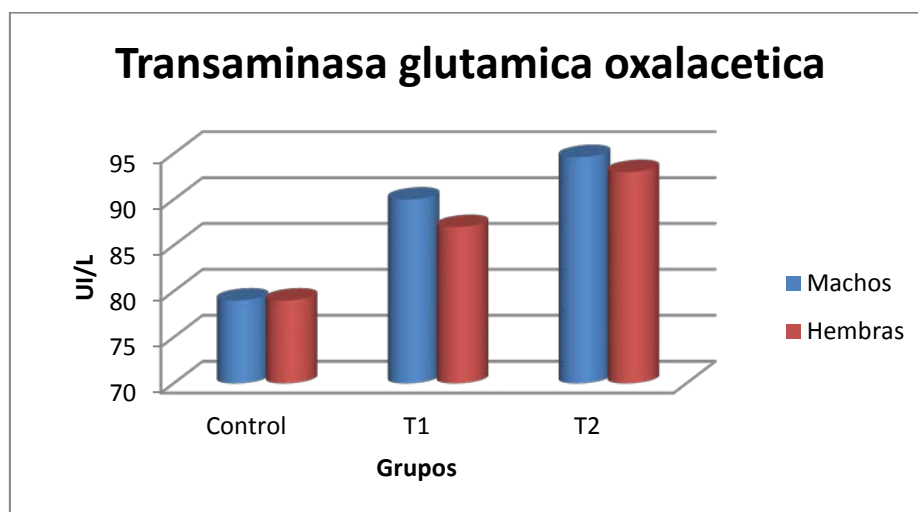
Figura A- 16. Comparación de Nitrógeno ureico en machos y hembras.



Cuadro A- 10. Promedios Transaminasa Glutámica Oxalacetica

TGO	Grupos	Machos	Hembras
TGO (UI/L)	Control	79	79
	T1	90	87
	T2	94.63	93

Figura A- 17. Comparación de TGO en machos y hembras.

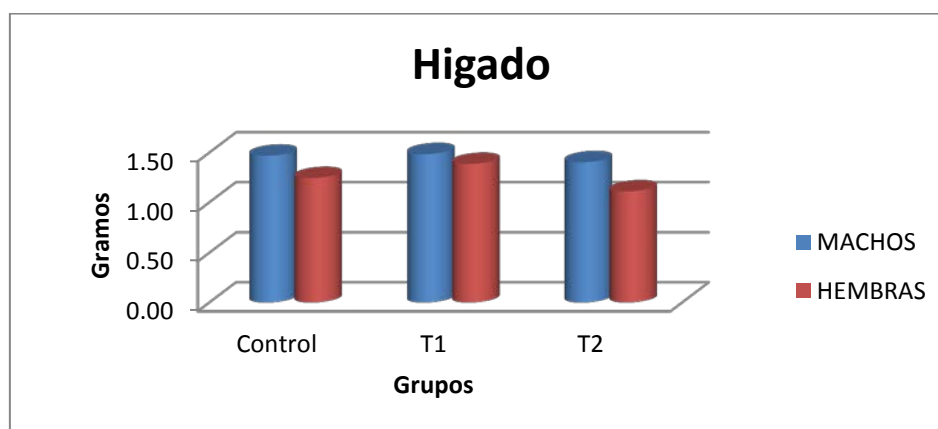


Relación de pesos de órganos en machos y hembras.

Cuadro A- 11. promedios de peso de hígados en machos y hembras.

	MACHOS	HEMBRAS
Control	1.47	1.24
T1	1.48	1.39
T2	1.40	1.11

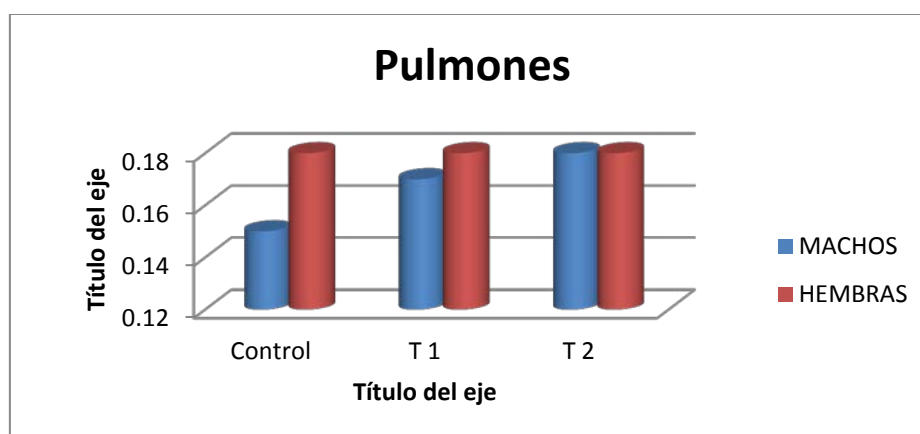
Figura A- 18. Comparación los pesos de hígados en machos y hembras.



Cuadro A- 12. promedio de pesos de pulmones en machos y hembras.

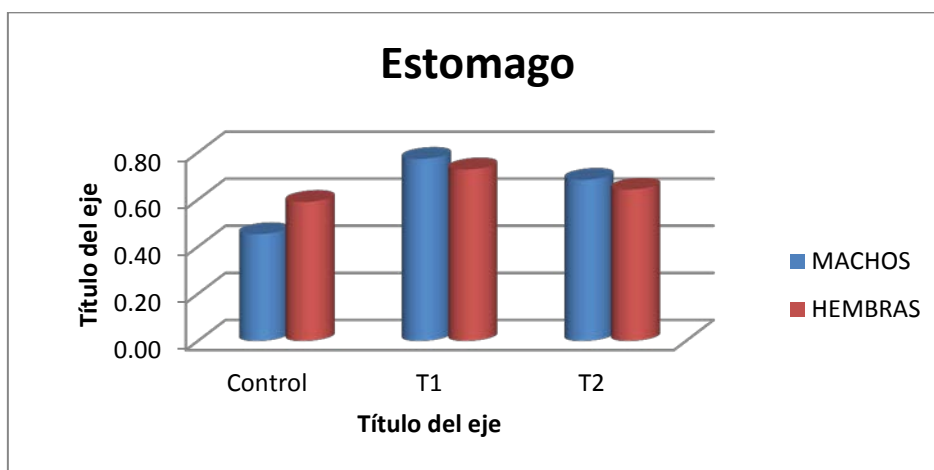
	MACHOS	HEMBRAS
Control	0.15	0.18
T 1	0.17	0.18
T 2	0.18	0.18

Figura A- 19. Relación de pesos de pulmones en machos y hembras.

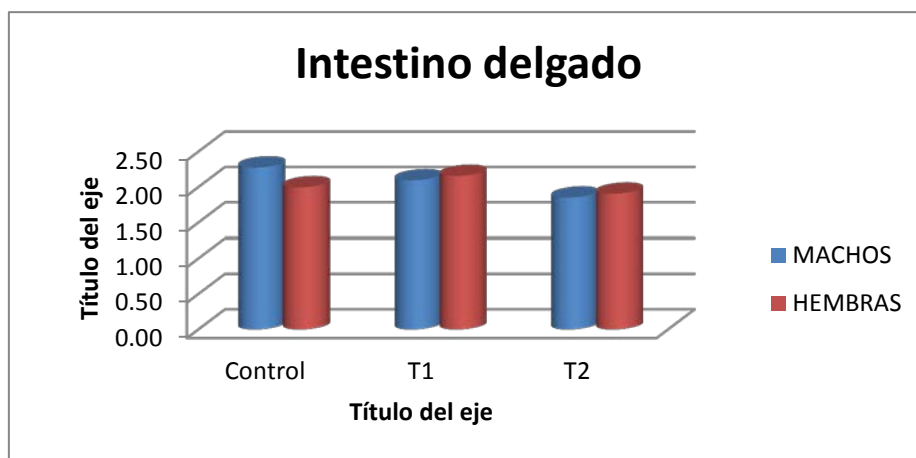


Cuadro A- 13. Promedios de pesos de estómagos en machos y hembras.

	MACHOS	HEMBRAS
Control	0.45	0.59
T1	0.77	0.73
T2	0.68	0.64

Figura A- 20. Relación de pesos de estómagos de machos y hembras.**Cuadro A- 14.** Promedios de pesos de intestinos delgados en machos y hembras.

	MACHOS	HEMBRAS
Control	2.28	2.00
T1	2.10	2.16
T2	1.85	1.91

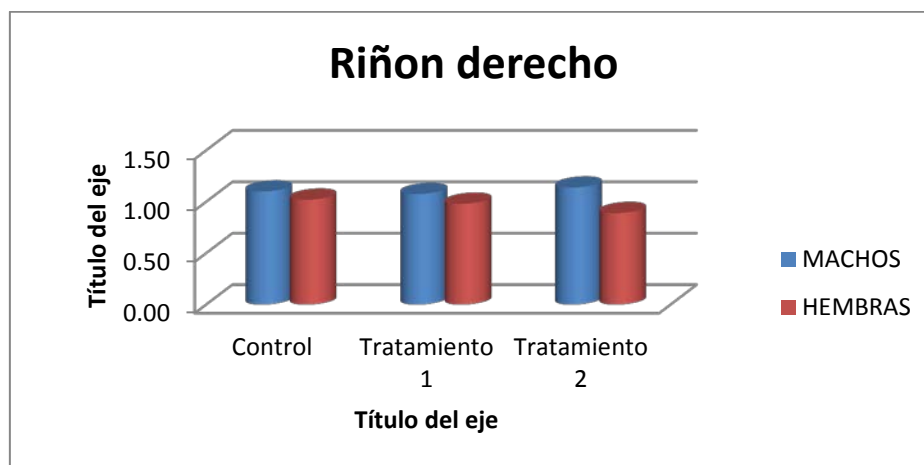
Figura A- 21. Relaciones de pesos de intestino delgado en machos y hembras.

Relación de tallas de órganos de machos y hembras

Cuadro A- 15. Promedios de tallas de riñón derecho de machos y hembras.

	MACHOS	HEMBRAS
Control	1.10	1.02
T1	1.08	0.98
T2	1.14	0.89

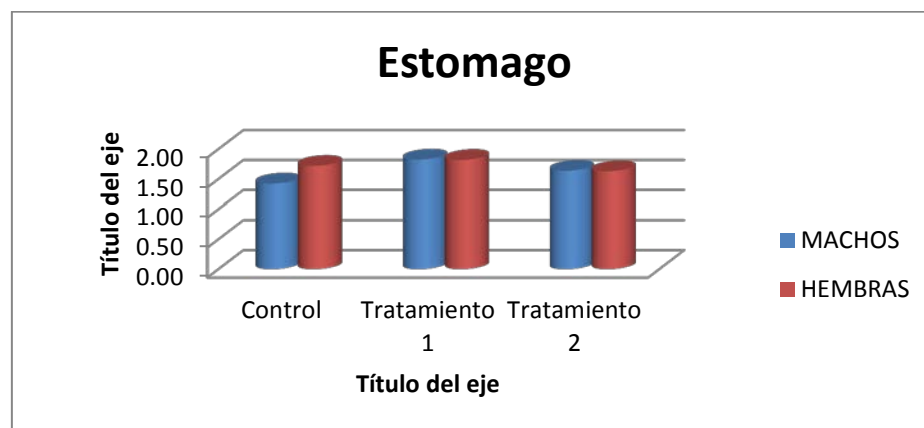
Figura A- 22. Relaciones de tallas de riñón derecho en machos y hembras.



Cuadro A- 16. promedios de tallas de estómagos de machos y hembras.

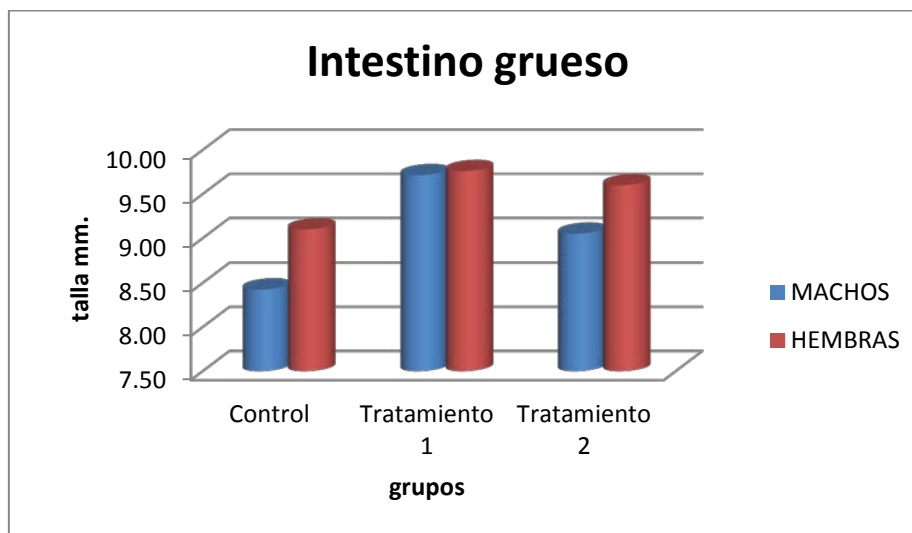
	MACHOS	HEMBRAS
Control	1.43	1.72
T1	1.83	1.82
T2	1.64	1.63

Figura A- 23. Relaciones entre tallas de estómagos de machos y hembras.



Cuadro A- 17. promedios de tallas de intestinos gruesos de machos y hembras.

	Machos	Hembras
Control	8.43	9.10
T1	9.71	9.76
T2	9.05	9.60

Figura A- 24. Relaciones de tallas de intestinos gruesos de machos y hembras.

Cuadro A- 18. Tabla de referencia de Hematología en ratón.

Parameter	Reported Mean Values	Units
Packed cell volume	38.5-45.1	%
Red blood cell number	5.0-9.5	10 ⁶ cells/mm ³
Red blood cell diameter	5.5-6.0	μm
Hemoglobin concentration	10.9-16.3	g/dl
MCV	48.0-56.0	f
MCH	11.9-19.0	pg
MCHC	25.9-35.1	g/dl
Platelets	1084-1992	10 ³ platelets/μl
White blood cells	3.0-14.2	10 ³ cells/μl
Neutrophils	0.46-2.20	10 ³ cells/μl
Eosinophils	0.00-0.38	10 ³ cells/μl
Basophils	0.00-0.09	10 ³ cells/μl
Lymphocytes	3.22-11.20	10 ³ cells/μl
Monocytes	0.40-1.43	10 ³ cells/μl

^aValues are for "adult" mice, or 1-8 month old mice (per referenced sources); sources referenced include 7, 8, 10, and 11; the table represents data obtained from male and female mice of various strains and laboratory and housing conditions. Reported ranges and standard deviations for some parameters are very large.

Suckow, M.A, *et al.* Sf

Cuadro A- 19. Tabla de referencia Bioquímica Sanguínea del ratón

Analyte Evaluated	Reported Mean Values	Justification and/or Organ System
Glucose	106–278 mg/dl	Pancreas (diabetes)
Urea nitrogen (BUN)	19–34 mg/dl	Kidney
Creatinine	0.5–0.8 mg/dl ^b	Kidney
Sodium	147–167 meq/L	Electrolyte/water balance
Potassium	5–9 meq/L	Electrolyte/water balance
Chloride	104–120 meq/L	Electrolyte/water balance
Calcium	9–12 mg/dl	Thyroid/parathyroid, intestine, pancreas, kidney, bone metastasis
Phosphorus	6–13 mg/dl	Kidney
Iron	210–474 mg/dl	Iron transport and storage
Alanine aminotransferase (AST or SGPT)	26–120 IU/l	Liver
Aspartate aminotransferase (AST or SGOT)	69–191 IU/l	Liver, heart, skeletal muscle
Alkaline phosphatase (ALP)	44–118 IU/l	Liver, GI tract, kidney, bone
Lactic dehydrogenase (LDH)	26.8–34.4 mu/ml	Liver, heart, skeletal muscle, LDH-elevating virus infection
Sorbitol dehydrogenase (SDH)	27–37 IU/l	Liver
Creatinine kinase	2.5–3.7 IU/l	Heart and skeletal muscle, muscular dystrophies
Total protein	43–64 g/l	Liver function, immunoglobulin status
Albumin	20–47 g/l	Liver function
Cholesterol	63–174 mg/dl	Liver
Triglycerides	71–164 mg/dl	Cardiovascular disease
Total bilirubin	0.3–0.8 mg/dl	Heme catabolism, cholestasis

^aValues from references 2, 7, and 8

^bCreatinine levels > 0.7 mg/dl are generally in mice older than one year.

Suckow, M.A, et al. Sf

