

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

**“ESTUDIO TOXICOLÓGICO SUBCRÓNICO EN RATONES (INH) POR ADMINISTRACIÓN ORAL DE INFUSIÓN DE EPAZOTE (*Chenopodium ambrosioides*)”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

**JOSE GUILLERMO MEJIA VALENCIA**

**ELVERT ANTONIO PARADA PALACIOS**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**LICENCIADOS EN BIOLOGÍA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2009**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

**“ESTUDIO TOXICOLÓGICO SUBCRÓNICO EN RATONES (INH) POR ADMINISTRACIÓN ORAL DE INFUSIÓN DE EPAZOTE (*Chenopodium ambrosioides*)”**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:**

**JOSE GUILLERMO MEJIA VALENCIA**

**ELVERT ANTONIO PARADA PALACIOS**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**LICENCIADOS EN BIOLOGÍA**

**ASESOR:**

\_\_\_\_\_  
**Dr. RIGOBERTO AYALA**

**ASESOR:**

\_\_\_\_\_  
**Lic. MIGUEL ÁNGEL MORENO**

**CUIDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2009**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**  
**FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA**  
**ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**Universidad de El Salvador**

*Hacia la libertad por la cultura*

**“ESTUDIO TOXICOLÓGICO SUBCRÓNICO EN RATONES (INH) POR ADMINISTRACIÓN ORAL DE INFUSIÓN DE EPAZOTE (*Chenopodium ambrosioides*)”**

**TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:**

**JOSÉ GUILLERMO MEJÍA VALENCIA**

**ELVERT ANTONIO PARADA PALACIOS**

**PARA OPTAR AL GRADO DE:**

**LICENCIADOS EN BIOLOGÍA**

**JURADO:**

\_\_\_\_\_

**M Sc. NOHEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO**

**JURADO:**

\_\_\_\_\_

**M Sc. GUILLERMO ERNESTO MARTÍNEZ ESPINOZA**

**CUIDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2009**

**AUTORIDADES UNIVERSITARIAS**

**RECTOR**

**MSc. RUFINO ANTONIO QUEZADA SÁNCHEZ**

**SECRETARIO GENERAL**

**Lic. DOUGLAS VLADIMIR ALFARO CHÁVEZ**

**FISCAL**

**Dr. RENÉ MADECADEL PERLA JIMÉNEZ**

**DECANO**

**Dr. RAFAEL ANTONIO GÓMEZ ESCOTO**

**DIRECTORA DE LA ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**MSc. NOHEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2009**

**TRIBUNAL EXAMINADOR**

**ASESOR**

**Dr. RIGOBERTO AYALA**

**ASESOR**

**Lic. MIGUEL ÁNGEL MORENO**

**JURADO**

**MSc. NOHEMY ELIZABETH VENTURA CENTENO**

**JURADO**

**MSc. GUILLERMO ERNESTO MARTÍNEZ ESPINOZA**

**CIUDAD UNIVERSITARIA, MARZO DE 2009**

## **DEDICATORIA**

A mi padre que en paz descansa. A toda mi familia y en especial a mis abuelos Rosario Molina y Mercedes Parada por su ayuda incondicional.

**Elvert**

Primeramente a Dios, a mi madre Lucila Araceli Valencia, a mi padre José María Mejía y a mis hermanos; Carlos Mauricio, Dolores Beatriz y José María, quienes me apoyaron y me transmitieron confianza para concluir con esta meta. También a mi abuela Dolores Velásquez viuda de Valencia y mis tíos Gumerindo Valle e Inés Velásquez de Valle quienes me ayudaron mucho.

**Guillermo**

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecemos ha Dios por permitirnos llegar hasta esta etapa.

Ha nuestros asesores y jurados, por todos sus aportes en caminos a mejorar la presentación de este documento.

A la escuela de Biología, por abrigarnos y formarnos como profesionales.

A nuestros amigos, por compartir una etapa de nuestras vidas en donde acontecieron muchas alegrías y tristezas inolvidables, todo ello queda guardado en lo más profundo de nuestra mente para no ser olvidado nunca. A todos muchas gracias.

## INDICE

<b>Contenido</b>	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS	XI
LISTA DE FIGURAS	XII
RESUMEN	XII
I. INTRODUCCION	1
II. FUNDAMENTO TEORICO	3
2.1. LAS PLANTAS.	3
2.2. PLANTAS MEDICINALES Y TÓXICAS.	3
2.3. TAXONOMIA DEL EPAZOTE.	4
2.4. DESCRIPCION BOTÁNICA DEL EPAZOTE.	5
2.5. USO DEL EPAZOTE.	5
2.6. METABOLITOS SECUNDARIOS EN CHENOPODIOCEAE.	8
2.7. PRINCIPIOS GENERALES DE LA TOXICOLOGIA.	9
2.8. TOXICODINAMICA.	10
2.8.1. Absorción.	11
2.8.2. Distribución.	11
2.8.3. Excreción.	11
2.8.4. Metabolismo.	12
2.9. TOXICOLOGIA VEGETAL.	13
2.10. METODOS DE ENSAYO EN TOXICOLOGIA.	14
2.10.1. Estudios de toxicidad de dosis repetidas	15
2.11. FISIOPATOLOGIAS DE LAS INTOXICACIONES.	15

2.12. RUTAS DE EXPOSICIÓN PARA SUSTANCIAS TOXICAS.	16
2.12.1. El sistema respiratorio (inhalación).	16
2.12.2 El sistema digestivo (ingestión).	16
2.13. USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.	17
2.14. RATÓN DE LABORATORIO.	17
III. METODOLOGIA	19
3.1. PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN.	19
3.2. ANIMALES UTILIZADOS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN.	19
3.3. ENSAYO DE TOXICIDAD SUB-CRÓNICO/ 90 DÍAS.	19
3.3.1. Observaciones.	20
3.3.2. Peso corporal.	21
3.4. EXÁMENES DE LABORATORIO CLÍNICO.	21
3.4.1. Parámetros hematológicos.	21
3.4.2. Parámetros de química sanguínea.	22
3.5. NECROPSIA MACROSCÓPICA.	22
3.6. EXAMEN HISTOPATOLÓGICO.	23
3.7. ANÁLISIS DE DATOS.	23
IV. RESULTADOS	25
4.1. TOXICIDAD SUBCRÓNICA	22
4.1.1. Observaciones clínicas.	25
4.1.2. Efecto sobre indicadores hematológicos.	25
4.1.3. Efectos sobre indicadores bioquímicos.	26
4.1.4. Necropsia.	29
4.1.5. Histopatología.	30
V. DISCUSIÓN	36

VI. CONCLUSIONES	41
VII. RECOMENDACIONES	43
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	45
IX. ANEXOS	51

## LISTA DE TABLAS

	Página
<b>Contenido</b>	
<b>Tabla 1.</b> Valores promedios iniciales y finales de peso corporal en los grupos de ratones.	25
<b>Tabla 2.</b> Variaciones medias del hematócrito, eritrocitos, recuento total y diferencial de leucocitos a los 90 días de tratamiento, en los grupos control y tratamiento.	26
<b>Tabla 3.</b> Valores promedios de transaminasa (ALT) después de 90 días de experimento, en los grupos control y tratados.	27
<b>Tabla 4.</b> Valores promedios de creatinina después de 90 días de experimento, en los grupos control y tratados.	28
<b>Tabla 5.</b> Valores promedios del peso de órganos en gramos en machos y hembras después de 90 días de tratamiento, en los grupos control y tratados.	29
<b>Tabla 6.</b> Porcentaje de alteraciones histológicas en tejido hepático de ratones control y tratados con infusión de <i>Chenopodium ambrosioides</i> por 90 días.	32
<b>Tabla 7.</b> Porcentaje de alteraciones histológicas en tejido pulmonar de ratones control y tratados con infusión de <i>Chenopodium ambrosioides</i> por 90 días.	33
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de alteraciones histológicas en tejido renal e intestinal de ratones control y tratados con infusión de <i>Chenopodium ambrosioides</i> por 90 días.	34
<b>Tabla 9.</b> Análisis Clúster. Individuos que integran cada grupo.	35

## LISTA DE FIGURAS

Contenido	Página
<b>Fig. 1.</b> Comparación gráfica del promedio de ALT entre ratones de ambos sexos experimentales y control.	27
<b>Fig. 2.</b> Comparación gráfica del promedio de creatinina entre ratones de ambos sexos experimentales y control.	28
<b>Fig. 3.</b> A. Pulmón 10X: infiltrado inflamatorio mononuclear leve focal peribronquial (1), Congestión vascular (2) y congestión vascular septal (3). B. Hígado 10X: congestión vascular (1) y Dilatación vascular (2). C. Pulmón 40X: Infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular (1). D. Riñón 10X: infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular (1) e Infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial (2). E. Intestino delgado 10X: Hiperplasia folicular linfoide. F. Hiper celularidad glomerular.	31
<b>Fig. 4.</b> Resultado del Clúster jerárquico	34

## RESUMEN

Se estudió la especie de *Chenopodium ambrosioides*, para determinar la toxicidad de la infusión de la planta completa por administración de dosis continuas en ratones. Se evaluó la toxicidad de esta planta de acuerdo a la norma 408 de la Organización para la cooperación y el desarrollo económico (OECD). Para determinar la toxicidad subcrónica de la infusión se emplearon ratones albinos suizos INH de ambos sexos, a los que se les administró por vía oral infusiones de la especie estudiada a dosis de 6.4g/ml, 13.4g/ml y 3.2g/ml por 90 días. Al mismo tiempo se realizaron observaciones clínicas diarias con el fin de identificar algún efecto tóxico post administración de la sustancia, además al finalizar los 90 días de administración los ratones fueron sacrificados para realizar exámenes hematológicos y bioquímicos así como estudios macroscópicos e histológicos de los órganos internos. Se encontró que la infusión de epazote a las dosis administrada no causó efecto significativos en los parámetros toxicológicos, en el peso corporal, en hematología y química sanguínea, al igual que tampoco provocó alteraciones anatomopatológicas sobre los órganos y tejidos evaluados. Por lo que la infusión de epazote bajo nuestras condiciones experimentales no presentó actividad tóxica.

## I. INTRODUCCION

Por lo general, en nuestra región la mayor parte de la población utiliza plantas medicinales para curar sus afecciones de salud, ¿pero serán en realidad estas plantas inofensivas?, esta es una de las principales dudas inherentes a la fitoterapia. Razones por las cuales organizaciones internacionales tales como Food and Drug Administration (FDA), Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Proponen la evaluación toxicológica a través de ensayos en animales de experimentación como herramienta para comprobar que sustancias ingeridas de forma intencional al organismo, no produzcan daños sobre la salud del hombre. La evaluación toxicológica tiene como objetivo fundamental aproximar los efectos adversos de una sustancia y aportar datos adecuados al estimar la relación dosis-respuesta.

Se estima que entre 20,000 y 55,000 especies vegetales se han empleado medicinalmente, de las cuales una pequeña cantidad se ha investigado para desarrollar medicamentos. De todas solo 15 a 20 % de las plantas terrestres ha sido evaluadas. En consecuencia, las plantas, incluidas las medicinales no investigadas, continúan representando un conjunto significativo de materia prima para el descubrimiento de nuevos medicamentos (Morón, 2007).

Últimamente un renovado y fortísimo interés por una medicina más natural ha puesto de moda el uso (antiquísimo) de las plantas con fines terapéuticos. Pero, entendamos bien este calificativo; la planta, como fábrica de sustancias con propiedades especiales (medicinales, narcóticas, tóxicas, venenosas, psicoactivas), no establece una compartimentación o límite claro (ni mucho menos general para cada especie y tipo de receptor), entre unos u otros efectos. Así, y según Martínez, (2000) la medicina de base fitoterapéutica no puede en su farmacopea fijar dosis curativas estándar. Unos límites difusos e imprecisos separan lo útil de lo pernicioso, y así se deriva una misma cantidad como adecuada para la patología de determinado sujeto y ser tóxica en otro.

Según Tello, (1997), los efectos tóxicos producidos por las plantas son debido a que ellas han desarrollado un sistema de defensa para su preservación, produciendo químicos con efectos tóxicos sobre los que las ingieren. Igualmente los animales han desarrollado mecanismos de defensa para eliminar las sustancias tóxicas que ingresan, por medio de la acción de los citocromos, (familia de hemoproteínas responsable del metabolismo oxidativo), sin embargo esta biotransformación dá como resultado en ocasiones la producción de metabolitos intermedios que también pueden ser tóxicos por lo que se considera que son pocas las plantas con actividad medicinal que no produzcan actividad tóxica. Al ser ingeridos y a pesar de que se cree que los remedios vegetales no representan un grave problema en cuanto a su toxicidad se ha demostrado que diversas especies vegetales tienen un efecto tóxico para el hombre. (Huerta *et al*, 2003)

La metodología que se utilizó para realizar este trabajo consistió en administrar diariamente la preparación del vegetal por vía oral en tres concentraciones diferentes a distintos lotes de animales de experimentación durante 90 días. Durante el período de administración, se observó atentamente a los animales el apareamiento de signos de toxicidad. Se practicó análisis de laboratorio clínico al final de la administración, necropsia macro y microscópica a los animales sacrificados. La presente investigación se realizó con el propósito de conocer los posibles efectos tóxicos producidos por la infusión de epazote sobre el modelo biológico utilizado.

## **II. FUNDAMENTO TEORICO**

### **2.1. LAS PLANTAS.**

Las plantas son organismos vivientes autosuficientes pertenecientes al reino vegetal que pueden habitar en la tierra o en el agua. Existen más de 300.000 especies de plantas, de las cuales más de 250.000 producen flores (angiospermas). A diferencia de los animales, que necesitan digerir alimentos ya elaborados, las plantas son capaces de producir sus propios alimentos a través de un proceso químico llamado fotosíntesis. La fotosíntesis consiste básicamente en la elaboración de azúcar a partir del CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) minerales y agua con la ayuda de la luz solar. Producto del proceso fotosintético, es el oxígeno., un producto secundario, que proviene de la descomposición del agua. El oxígeno, que se forma por la reacción entre el CO<sub>2</sub> y el agua, es expulsado de la planta a través de los estomas de las hojas. Para hacer la fotosíntesis se necesita la energía que toma la planta del sol. (Reichholf, 1994)

Las plantas presentan formas muy diversas, algunas las llamamos árboles; otras las conocemos como hierbas; otras presentan una forma arbustiva; algunas se conocen como lianas y otras simplemente como flores. De acuerdo a su altura, a que sean más blandas o más duras, al uso que hacemos de las mismas, etc., las llamamos con nombres diferentes. (Reichholf, 1994)

### **2.2. PLANTAS MEDICINALES Y TÓXICAS.**

Las propiedades de las plantas medicinales se han utilizado desde tiempos remotos en la curación de enfermedades. En la actualidad, en países tecnológicamente avanzados como los Estados Unidos, se estima que un 60 % de la población utilizan habitualmente plantas medicinales para combatir ciertas dolencias. Las plantas constituyen nuestro alimento y pueden constituir igualmente nuestra medicina natural, pero también muchas plantas pueden resultar potencialmente mortales. Las plantas, utilizadas en dosis adecuadas poseen propiedades curativas, pero en cantidades más grandes se convierten en potentes venenos. (Reichholf, 1994)

Las plantas tóxicas son muy abundantes dentro del reino vegetal. Dentro de esta categoría pueden estar implicadas plantas de diferente naturaleza. La toxicidad del mundo vegetal depende de muchos factores. El clima, la época del año pueden determinar que una misma planta sea más tóxica en un momento que en otros. A veces el contenido del subsuelo también influye. Son bien conocidas las intoxicaciones producidas por ingestión de plantas que acumulan componentes. (Reichholf, 1994)

### **2.3. TAXONOMIA DEL EPAZOTE.**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Chenopodiaceae

Subfamilia: Chenopodioideae

Género: Chenopodium

Especie: ambrosioides

(Heike Vibrans, 2005)

## **2.4. DESCRIPCION BOTÁNICA DEL EPAZOTE.**

*Chenopodium ambrosioides* (epazote) es una planta herbácea, natural de América Central que crece hasta una altura de unos 100 cm. Las hojas son ovales y dentadas. La planta tiene un fuerte olor no muy agradable. Posee tallos ramificados sus flores nacen en racimos y originan semillas negras. Se cultiva en las casas y está bien adaptada a climas cálido, semicálido, seco y templado. Crece asociada a la selva tropical caducifolia, subcaducifolia, perennifolia, subperennifolia, matorral xerófilo, bosques mesófilo de montaña, de encino y mixto de pino. (Taylor, 2005)

Para Ramírez, *et al* (2002). El epazote es una planta perteneciente a la familia *Chenopodiaceae*, es una especie de planta empleada en la medicina tradicional; la infusión de sus hojas se administra como remedio contra bronquitis, cura heridas, dolor muscular, flujo vaginal y dolores estomacales, además se atribuyen propiedades vermífugas. Es una planta silvestre anual.

## **2.5. USO DEL EPAZOTE.**

El empleo del “paico” o epazote para las parasitosis intestinales ha sido desplazado por fármacos de síntesis menos tóxicos, pero aún así se mantiene su tradición de uso. La infusión de hojas y flores es utilizada contra el “empacho y dolor de estómago” como, carminativa, antihelmíntica, y digestiva (hojas en infusión o con el mate, en el Caribe y Centro América se la emplea como tónico estomacal, carminativo y antihelmíntico por su acción paralizante y narcótica sobre ascárides, oxiuros y anquilostomas, ineficaz contra tenias y tricocéfalos). La decocción en conjunción con otras cortezas actúan como purgante y abortiva.

Se ha comprobado que su extracto acuoso inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus* en cultivo; las hojas tienen actividad antiamebiana, antifúngica y antimalárica (*Plasmodium falciparum*, *P. vivax in vitro* y *P. berghei*, en ratones en dosis 100 mg/ml). El

aceite posee actividad antibacteriana, antihelmíntica (particularmente contra *Áscaris lumbricoide* demostrado experimental y clínicamente en dosis de 1,5 ml/persona de 75 kg de peso corporal), además es, antifúngica (1.000 ppm), depresora cardíaca, hipotensora, relajante muscular y estimulante respiratoria; disminuye la motilidad gástrica y tiene actividad espasmolítica (Torres, 2003).

Usos específicos por localización (Taylor, 2005):

- Belice
  - Para problemas de digestión, crudas o resacas, flatulencia, parásitos intestinales y como sedante
- Brasil
  - Para provocar abortos, dolores anginosos, contra infecciones bacterianas, bronquitis, heridas, problemas de circulación, resfriados, contusiones, fiebre, desórdenes gástricos, hemorroides, hemorragias, insomnio, flatulencia, parásitos intestinales, laringitis, dificultades menstruales, sinusitis, garganta inflamada, úlceras, espasmos, tuberculosis, gusanos, como repelente de insectos y como sedante
- Ecuador
  - Para la indigestión, flatulencia, parásitos intestinales y digestión lenta
- Haití
  - Contra parásitos, piel lastimada o herida, dolor de estómago, contra gusanos y como antiséptico
- México
  - Para cólicos, desórdenes menstruales, contra los nervios, parásitos dolor de muelas, tumores, retención de agua y parásitos intestinales.
- Panamá
  - Contra el asma, la disentería y parásitos intestinales.

- Perú
  - Para controlar abscesos, artritis, como anticonceptivo, para limpiar la sangre, el cólera, para aliviar contusiones, diabetes, diarrea, problemas digestivos, disentería, edema pulmonar, exceso de mucosa, fracturas, gastritis, hemorroides, histeria, gases intestinales, memoria, desórdenes menstruales, nerviosismo, dolor, parálisis, parásitos, espasmos, reumatismo, inflamación del tracto urinario, vómito, retención de líquidos, como anti ácido, antiséptico y sedante
  
- Trinidad y Tobago
  - Para infecciones por amibas, asma, como control anticonceptivo, disentería, fatiga, palpitaciones y gusanos
  
- Turquía
  - Contra el asma, problemas de digestión, dificultades menstruales, nerviosismo y gusanos
  
- Estados Unidos
  - Para incrementar la producción de leche materna, contra desórdenes menstruales, dolor, parásitos.
  
- Venezuela
  - Para la digestión y contra los gusanos
  
- Otras partes
  - Para abortar, infecciones por amibas, anemia, apendicitis, artritis, asma, dificultades de parto, cólera, resfriados, cólicos, conjuntivitis, disentería, fatiga, fiebre, parasitos intestinales, gases, úlceras intestinales, lactancia, malaria, irregularidades menstruales, nerviosismo, dolor, palpitaciones, parálisis, reumatismos, mordeduras de serpiente, dolor de estomago, espasmos, tumores, retención de agua, gusanos, como antiséptico, insecticida y sedante.

## 2.6. METABOLITOS SECUNDARIOS EN CHENOPODIOCEAE.

El principal componente del aceite esencial en las *Chenopodioideas* es el Ascaridol. El mayor contenido de este aceite se encuentra en las semillas. En el aceite esencial de las diferentes especies de esta subfamilia se ha determinado la presencia de los siguientes metabolitos secundarios (Anónimo, s.a):

- Ascaridol
- p-Cimeno
- (-)-Limoneno
- (+)-Alcanfor
- Aritasona, safrole, N-docosano, N-hentriacontano, N-heptacosano, N-octacosano, beta-pineno
- Metadieno
- Metilsalicilato
- Dimetilsulfóxido

Además, se reportan en diferentes órganos y tejidos los siguientes compuestos:

- Oligosacáridos
- Ácidos (en hojas jóvenes 6-8%, en las más viejas más del 16%)
  - L(-)-ácido málico
  - D(+)-ácido tartárico
  - Ácido oxalúrico
  - Ácido adípico
  - Ácido glicólico
  - Ácido glutárico
- Vitaminas
  - Vitamina C (40-155 mg/100g)
- Aminoácidos
  - Asparagina
  - Glutamina
  - Betaina

- Histamina (arriba de 140 mg/100g peso fresco)
- Flavonoides:
  - Patuletina
  - Espinacetina
  - Espinatoside
- Clorofila (0,3-1,0%).
- Chenopodiósidos A y B
- Saponinas
- Taninos (Castillo, 1994)

## **2.7. PRINCIPIOS GENERALES DE LA TOXICOLOGIA.**

La toxicología es el estudio de los venenos o, en una definición más precisa, la identificación y cuantificación de los efectos adversos asociados a la exposición a agentes físicos, sustancias químicas y otras situaciones. En ese sentido, la toxicología es tributaria, en materia de información, diseños de la investigación y métodos, de la mayoría de las ciencias biológicas básicas y disciplinas médicas, de la epidemiología y de determinadas esferas de la química y la física. La toxicología abarca desde estudios de investigación básica sobre el mecanismo de acción de los agentes tóxicos hasta la elaboración e interpretación de pruebas normalizadas para determinar las propiedades tóxicas de los agentes. (Silbergeld, s.a)

Moreno (2002), describe de una forma muy general el diseño experimental para realizar los estudios toxicológicos, como sigue a continuación:

1. Sustrato biológico/ Especie animal
2. Numero total y distribución de los grupos de animales
3. Selección de las dosis
4. Elección de las vías de administración
5. Duración del estudio (Toxicidad aguda, por dosis repetidas o crónica)
6. Parámetros ha determinar (Examen físico, hematología, bioquímica, estudio macroscópico y estudio histológico)
7. Análisis de resultados

## 8. Condiciones generales del ensayo:

- Recomendaciones y normativas internacionales
- Observación previa de los animales Ambiente idéntico
- Administración y observación a la misma hora
- Sacrificio rápido y poco estresante.

### **2.8. TOXICODINAMICA.**

El organismo humano es un complejo sistema biológico que está organizado en diversos niveles, desde el molecular-celular hasta el de los tejidos y órganos. Es un sistema abierto, que intercambia materia y energía con su medio ambiente a través de numerosas reacciones bioquímicas que están en equilibrio dinámico. El medio ambiente puede estar contaminado por diversos tóxicos. Cuando moléculas o iones tóxicos penetran en ese sistema férreamente coordinado desde el medio en que un individuo trabaja o vive pueden verse perturbados, reversible o irreversiblemente, los procesos bioquímicos normales de la célula, o incluso producirse lesiones y muerte de la célula. En el medio ambiente la biota esta rodeada permanentemente de una gran cantidad de sustancias con las cuales interacciona en todas sus actividades vitales. Aunque todos los compuestos con los que esta en contacto, incluyendo el agua, pueden ser tóxicos en determinadas dosis, es evidente que un gran número de especies han tolerado esta situación. (Peña *et al*, 2001)

Este mismo autor menciona que, para que un toxico cause daño en primer lugar se debe estar expuesto a él y en segundo lugar el toxico tiene que vencer las defensas del organismo que tratan de impedirle que lleguen al tejido blanco en forma activa. Las defensas consisten fundamentalmente en mecanismos que restringen la movilidad y disminuyen el periodo de exposición del tejido blanco. Esto lo puede hacer el organismo poniendo barreras a su desplazamiento hacia determinados tejidos disminuyendo su difusibilidad a través de las membranas celulares facilitando su excreción. El producido por una dosis, depende de la cantidad de toxico que llegue en estado activo, al sitio de acción y del tiempo que se le permita actuar ahí.

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 esto según Peña *et al* (2001), 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 y la vez los define de la siguiente manera.

### **2.8.1. Absorción.**

La absorción de un toxico se define como el proceso por medio del cual este atraviesa membranas y capas de células hasta llegar al torrente sanguíneo. El mecanismo de ingreso del toxico al organismo usa los mismos mecanismos de transporte diseñado para movilizar compuestos de estructura similar.

### **2.8.2. Distribución.**

Se entiende por distribución de un toxico su localización y concentración en diferentes tejidos. La distribución no es la acción de transportar el toxico. Por ejemplo, cuando se dice que un compuesto se distribuye en los órganos A, B y C, no se refiere a como el compuesto se desplazo desde la superficie de absorción hasta los órganos A, B y C, si no al hecho de que el toxico aparece en esos órganos con una concentración a, b y c, respectivamente.

### **2.8.3. Excreción.**

La concentración de un tóxico distribuido se puede disminuir por excreción. Todas las secreciones corporales pueden excretar compuestos químicos pero las tres principales vías son la orina, las heces y el aire exhalado. La excreción de xenobióticos utiliza los mismos mecanismos que tiene el organismo para excretar los desechos metabólicos endógenos.

#### **2.8.4. Metabolismo.**

Se conoce que, para reducir la posibilidad de que una sustancia produzca una respuesta tóxica se debe disminuir la cantidad de sustancia que llega en forma activa al tejido blanco, así como disminuir el tiempo de permanencia de ésta en su sitio de acción.

Lo anterior se logra disminuyendo la difusibilidad del tóxico e incrementando la velocidad de excreción ambos fenómenos se producen cuando se incrementa la polaridad del xenobiótico. Los lípidos se difunden más rápidamente, así que al transformar el xenobiótico en un compuesto más polar se reduce la velocidad de difusión, se aumenta su solubilidad en agua, y esto facilita la excreción en orina.

Al conjunto de vías metabólicas por medio de las cuales los tejidos incrementan la polaridad de un tóxico se denomina biotransformación. Podemos decir la biotransformación de un tóxico consiste fundamentalmente en convertir un xenobiótico no polar en un compuesto soluble en agua o sea un compuesto polar. Este es el mecanismo más común que usan los organismos para eliminar los tóxicos ambientales.

En algunos casos la biotransformación resulta en la producción de un metabolito que es más tóxico que el compuesto original. Si estos metabolitos se acumulan y vencen las defensas del organismo entonces pueden producir un daño que se manifieste en una respuesta tóxica.

El proceso de penetración de un tóxico desde el medio ambiente hasta los lugares en que va a producir su efecto tóxico dentro del organismo puede dividirse en tres fases:

1. La fase de exposición, que comprende todos los procesos que se producen entre diversos tóxicos y/o la influencia que tienen sobre ellos los factores ambientales (luz, temperatura, humedad, etc.). Los tóxicos pueden sufrir transformaciones químicas, degradación, biodegradación (por microorganismos) y desintegración.
2. La fase toxicocinética, que comprende la absorción de los tóxicos en el organismo y todos los procesos subsiguientes: transporte por los fluidos corporales, distribución y acumulación en

tejidos y órganos, biotransformación en metabolitos y eliminación del organismo (excreción) de los tóxicos y/o metabolitos.

3. La fase toxicodinámica, que se refiere a la interacción de los tóxicos (moléculas, iones, coloides) con lugares de acción específicos en las células o dentro de ellas —receptores—, con el resultado último de un efecto tóxico.

Las moléculas o iones tóxicos presentes en el medio ambiente penetran en el organismo a través de la piel y las mucosas o a través de las células epiteliales del tracto respiratorio y el tracto gastrointestinal, según cuál sea el punto de entrada. Esto significa que las moléculas y los iones tóxicos han de atravesar membranas celulares de esos sistemas biológicos, así como un complejo sistema de membranas interiores de la célula. Todos los procesos toxicocinéticos y toxicodinámicos se producen en el nivel molecular-celular. Son muchos los factores que influyen en esos procesos, y que cabe dividir en dos grupos básicos:

- La constitución química y las propiedades fisicoquímicas de los tóxicos.
- La estructura de la célula, especialmente las propiedades y función de las membranas que rodean la célula y sus órganos interiores. (Djuric', s.a citado por Silbergeld)

## **2.9. TOXICOLOGIA VEGETAL.**

La permanente expansión de conocimientos en la ciencia botánica se ha manifestado en la creciente importancia de especialidades o ramas tales como la genética vegetal, la anatomía botánica, la ecología de las plantas y la fitopaleontología. El número de especializaciones sigue en paulatino aumento y los progresos logrados en el conjunto de estudios botánicos durante el presente siglo han tenido trascendentales repercusiones en el nivel de vida de la moderna sociedad humana.

La toxicología vegetal no podía mantenerse al margen de este avance, sobre todo después del impactante auge que experimentó en todo el orbe la disciplina toxicología, en los últimos 25 años, y así también ella ha llegado a constituir otra importante rama más, no solo de la ciencia botánica, sino también de la clínica médica. Las plantas tóxicas existentes en nuestro

medio son por lo general nativas y silvestres, pero las hay también que son exóticas, en su mayoría ornamentales, que crecen en jardines, invernaderos o interiores de las habitaciones. Las silvestres son habitualmente malezas, que se desarrollan en terrenos de barbecho, jardines o a lo largo de los caminos, en praderas o bosques. Otras son cordilleras, algunas crecen en desperdicios o estiércol, en la vecindad de viviendas humanas y finalmente, unas pocas, vegetan en terrenos pantanosos. Los principios activos, por medio de los cuales las plantas ejercen sus efectos tóxicos, están constituidos por alcaloides. Glucósidos, aceites volátiles, ciertas sustancias indiferentes y algunas toxinas. (Bruning, 1974)

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)

## **2.10. METODOS DE ENSAYO EN TOXICOLOGIA.**

La mayoría de los estudios mecanicistas se inicia con una descripción toxicológica referida a animales o a observaciones clínicas en humanos. Idealmente, los estudios con animales comprenden cuidadosas observaciones clínicas y de comportamiento, un minucioso examen bioquímico de los elementos de la sangre y la orina en busca de signos de deterioro funcional en los principales sistemas biológicos del cuerpo, y una evaluación post-mortem de todos los sistemas orgánicos, mediante examen microscópico, para comprobar la lesión (véanse las directrices de ensayos de la Organisation for Economic Co-operation and Development (OCDE); las directivas de la UE sobre evaluación química; las normas sobre ensayos de la Environmental Protection Agency (EPA) de los Estados Unidos, y la normativa sobre sustancias químicas del Japón). En los humanos, y con la excepción del examen post-mortem, todo ello equivale a un concienzudo examen físico que se realiza en un laboratorio a lo largo de dos o tres días.

Comprender los mecanismos de la toxicidad es el arte y la ciencia de la observación, de la creatividad en la selección de técnicas para ensayar diversas hipótesis y de la integración

innovadora de signos y síntomas en una relación causal. Los estudios mecanicistas se inician con la exposición, hacen un seguimiento de la distribución temporal y el destino en el organismo (farmacocinética) y miden el efecto tóxico resultante a algún nivel del sistema y a algún nivel de dosis. Al provocar la toxicidad, sustancias diferentes pueden actuar a niveles diferentes del sistema biológico. (Watanabe, s.a citado por Silbergeld)

### **2.10.1. Estudios de toxicidad de dosis repetidas.**

Los estudios de toxicidad de dosis repetidas deberían realizarse con el objeto de definir:

- (1) Efectos tóxicos basados en exposición repetida y/o acumulativa del compuesto y/o sus metabolitos,
- (2) La incidencia y severidad del efecto en relación a la dosis y/o duración de la exposición,
- (3) Dosis asociadas a respuestas tóxicas y biológicas, y
- (4) Un NOAEL (nivel sin efecto adverso observado, o en otras palabras la dosis más alta que no produce efecto tóxico).

### **2.11. FISIOPATOLOGIAS DE LAS INTOXICACIONES.**

Según Bodin & Cheinisse (1969). Los mecanismos de la agresión tóxica son extremadamente complejos y variados, siendo difíciles de comprender sin poseer una sólida cultura médica y sin tener ciertos conocimientos de la patología experimental. La acción de los tóxicos puede descomponerse en varios efectos fundamentales, tales como:

- Los primarios con efecto cáustico, el cual produce una destrucción química de los tejidos vivos. Otro aspecto del efecto tóxico primario es la citotoxicidad, aquí los tóxicos tienen la propiedad de atacar específicamente determinados tejidos, en los que perturban directamente el funcionamiento celular. Y como último aspecto tenemos el producido por ciertas sustancias que no actúan más que en sujetos predispuestos y en dosis aparentemente despreciables.

- En los efectos secundarios, las grandes manifestaciones tóxicas secundarias, al contrario de los efectos primarios, no tiene ningún carácter específico, correspondiendo a la repercusión de estos efectos sobre las funciones vitales del organismo (como la respiración, la circulación y la excreción) y a su eventual desfallecimiento. Lo más frecuente es que sea aquí donde se sitúa el peligro de muerte en el curso de las intoxicaciones agudas, siendo en estos casos donde pueden intervenir con máximo de eficacia las técnicas de reanimación médica.

## **2.12. RUTAS DE EXPOSICIÓN PARA SUSTANCIAS TOXICAS.**

### **2.12.1. El sistema respiratorio (inhalación).**

La inhalación es el medio más fácil rápido de exposición a las sustancias tóxicas porque estas sustancias se absorben fácilmente en el sistema respiratorio. El recubrimiento del sistema respiratorio no es eficaz para evitar la absorción de sustancias tóxicas en el cuerpo. El sistema respiratorio comprende las vías nasales, la tráquea, la laringe y los pulmones. Los siguientes factores según Agency for Toxic Substances & Disease Registry (ATSDR), afectan la inhalación de sustancias tóxicas:

- La concentración de sustancias tóxicas en la atmósfera,
- La solubilidad de la sustancia en la sangre y en los tejidos,
- La tasa respiratoria,
- La duración de la exposición,
- El estado del sistema respiratorio, y
- El tamaño de la partícula tóxica.

### **2.12.2 El sistema digestivo (ingestión).**

La ingestión de sustancias tóxicas generalmente es incidental o inadvertida. El sistema digestivo comprende la boca, el esófago (conducto por donde pasan los alimentos), el estómago y el intestino (grueso y delgado). La función principal del sistema digestivo es digerir y absorber los alimentos que comemos. Según ATSDR la absorción de sustancias tóxicas es afectada por factores físicos y químicos como la estructura del cuerpo y el

tiempo que permanecen en el cuerpo los alimentos que contienen las sustancias. Una vez que se absorbe una sustancia química, los efectos que provoca dependen de la concentración que se presenta en los órganos afectados, su forma química y física, lo que ocurre después de la absorción y cuánto tiempo permanece la sustancia en el tejido o el órgano afectado. Después de que la sustancia química es absorbida en la sangre, se distribuye a todo el cuerpo de inmediato; se traslada de un órgano o tejido a otro (translocación) o se transforma en un nuevo compuesto (biotransformación)

### **2.13. USO DE ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

El animal de experimentación es una de las piezas fundamentales en la biomedicina, tanto en los proyectos de investigación como en las pruebas diagnósticas y en los controles de productos farmacológicos. La Ciencia de Animales de Laboratorio fue creada para ayudar a la comunidad científica a mejorar todos los aspectos concernientes a la experimentación animal. Cabe destacar que el número de animales utilizados debe ser el mínimo necesario para poder evaluar la hipótesis y dar resultados estadísticamente útiles. Por lo tanto, podemos resumir que la Ciencia de Animales de Laboratorio se ocupa, simultáneamente, de mejorar la investigación biomédica y de asegurar el bienestar animal. (Medicina, 1996)

### **2.14. RATÓN DE LABORATORIO.**

El ratón de laboratorio es un roedor, usualmente de la especie *Mus musculus*, que se utiliza para la investigación científica. Con frecuencia los ratones de laboratorio son blancos. Los ratones de laboratorio deben pertenecer a una cepa pura o endogámica. Los individuos de una misma cepa llevan los mismos genes, por lo cual se facilita la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos (fármacos, entorno físico, etc.) sin que se produzca confusión debido a las diferencias genéticas. (Parker M. 2002)

Las características que han hecho del ratón de laboratorio el modelo biológico y biomédico más utilizado en las investigaciones científicas según Parker M. (2002) son:

1. Fácil manejo
2. Tamaño apropiado para la crianza y manipulación
3. No requieren demasiados cuidados.
4. Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos.
5. Tienen un alto número de crías.
6. Poseen un breve período de gestación (19-21 días) y rápido destete a los 20 días.
7. Las hembras producen un gran número de óvulos, los cuales al ser fecundados son muy resistentes.
8. Al ser mamíferos euterios, al igual que el hombre, tienen un genoma muy similar a los humanos diploide.

### **III. METODOLOGIA**

El presente estudio se realizó conforme lo establecido en la guía para el cuidado y uso de los animales de experimentación (CCAC, 1998).

El método de ensayo de toxicidad oral subcrónica descrita a continuación reproduce las directrices del documento; Ensayo de toxicidad oral subcrónica: toxicidad oral por administración continuada, 90 días en roedores (OECD, 1998).

#### **3.1. PREPARACIÓN DE LA INFUSIÓN.**

En un recipiente se colocó el material vegetal, se agregó 100 ml agua hirviendo, luego se tapó y se dejó reposar por 5 minutos, utilizando una gaza se separó el líquido de los tallos, semillas y hojas de la planta. La infusión se depositó en botes de color ámbar y almacenados a 4 °C.

#### **3.2. ANIMALES UTILIZADOS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN.**

Para determinar la toxicidad subcrónica del extracto se emplearon ratones albinos suizos INH, todos procedentes del Bioterio de CENSALUD (Centro de Investigación y Desarrollo en Salud), de dos meses y una semana los cuales fueron mantenidos en un cuarto a temperatura ambiente con un ciclo de luz/oscuridad de 10-12h. La alimentación consistió en alimento convencional para ratones y agua a voluntad. La sustancia de ensayo se administró por vía oral mediante una cánula intragástrica rígida 19G cada 24 horas, el volumen administrado fue en relación al peso corporal (1ml/100 g de peso corporal).

#### **3.3. ENSAYO DE TOXICIDAD SUB-CRÓNICO/ 90 DÍAS.**

Para comprobar que cualquier sustancia produce efectos sobre el organismo es necesario e importante obtener todo tipo de información que permitan hacer una valoración cualitativa y cuantitativa de la toxicidad inducida por la sustancia de ensayo, dichos datos se obtienen mediante la utilización de métodos de análisis específicos que permitan hacer una valoración más precisa sobre el daño en los sistemas biológicos; asumiendo que cualquier variación en los parámetros estudiados es el resultado a una respuesta causada por

el agente o sustancia estudiada. Información obtenida de las evaluaciones físicas, exámenes de laboratorio clínico, necropsia y análisis histopatológicos, son los parámetros más adecuados para determinar la toxicidad, por que cualquier desviación de la normalidad es un fuerte argumento para asegurar la peligrosidad o no de las sustancias estudiadas. (OECD, 2000)

Para el estudio principal se utilizaron tres grupos de ensayo con su respectiva concentración (T1=6.4g/ml, T2=13.4g/ml, T3=3.2g/ml) y un lote control, Se confeccionaron grupos de veinte animales (10 de cada sexo) cada uno, identificados individualmente mediante un sistema de marcaje con ácido púrico.

Las concentraciones de ensayo se administraron diariamente a los ratones durante 90 días. El volumen máximo de líquido que se administró dependió del peso promedio de cada grupo de ratones, este volumen se fue ajustando semanalmente con base a la ganancia de peso de los ratones, al grupo control se le administro diariamente agua destilada de esta forma se garantizo que recibieran la misma manipulación que los grupos experimentales.

### **3.3.1. Observaciones.**

Las observaciones clínicas que se perciben durante el periodo de exposición sirvieron para relacionar la toxicidad. Esto se puede utilizar como una fuerte evidencia de apoyo para relacionar los efectos dosis-respuesta y pueden desempeñaran un papel importante en la determinación del punto final. (OECD, 2000)

Antes de iniciar la administración de la infusión vegetal todos los animales se sometieron al menos a una observación clínica exhaustiva (para poder realizar comparaciones en un mismo sujeto). Las observaciones se registraron cuidadosamente. El período de observación fue de 90 días.

Se realizaron observaciones clínicas fuera de la jaula de alojamiento una vez al día; teniendo en cuenta el período más agudo de los efectos tras la administración (las primeras 4 horas). Los animales fueron observados a última hora del día. (Ver anexo 3 y 4). Los signos anotados incluyeron, cambios en la piel, pelo, ojos, mucosas, presencia de lagrimeo, piloerección, respiración anómala, etc. (Ver Anexo 4).

### **3.3.2. Peso corporal.**

Cambios en el peso corporal (aumentos o pérdidas), en animales de experimentación es un criterio de mucha importancia para determinar la posible toxicidad de las sustancias estudiadas. Los cambios en el peso tienen mucha influencia sobre aspectos metabólicos, hormonales y mecanismos homeostáticos. Por lo tanto, para los estudios toxicológicos, observar cómo se comporta este parámetro en el transcurso de la investigación es fundamental, puesto que es un indicador de toxicidad muy confiable. (OECD, 2000)

Los animales fueron pesados una vez por semana con una balanza digital marca COBOS. El ajuste de los volúmenes se hicieron cada dos semanas y el control del peso como indicador de toxicidad se registró una vez por semana para los grupos experimentales y control. Al final de la prueba los ratones sobrevivientes se pesaron antes de sacrificarse.

### **3.4. EXÁMENES DE LABORATORIO CLÍNICO.**

Las pautas reguladoras sugieren generalmente que se midan rutinariamente en estudios de toxicidad subcrónicos y crónicos parámetros clínicos, tales como los hematológicos, química. Variaciones normales en valores biológicos inter-animal y su alteración puede ser respuesta a la sustancia estudiada. (OECD, 2000)

Los exámenes clínicos se realizaron con el fin de conocer los posibles daños sobre otros sistemas biológicos como el sanguíneo, además se verificaron el funcionamiento hepático y renal por medio del análisis bioquímico de enzimas indicadores para estos órganos.

Las determinaciones hematológicas y de química sanguínea se llevaron a cabo a los 90 días de administración de la infusión. Los exámenes de bioquímica sanguínea se realizaron en el Área de Laboratorio clínico de CENSALUD; para el hemograma completo se contrató los servicios de un laboratorio clínico privado.

#### **3.4.1. Parámetros hematológicos.**

Cualquier variación en el perfil sanguíneo, es respuesta a diferentes procesos fisiológicos y patológicos; por lo que se hace necesario medir los parámetros hematológicos que brindan información general de las condiciones internas del modelo biológico. Para

esto se tomaron 0.5 ml de sangre mediante la técnica retroorbital en tubos con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) para luego ser transportadas al laboratorio donde fueron analizados.

Los análisis fueron dirigidos a conocer variaciones en: Hemoglobina (Hb), hematocrito (Hto), leucocitos totales (Leuc), conteo diferencial de leucocitos que incluye neutrófilos (N) y linfocitos (L). (Ver anexo 5)

### **3.4.2. Parámetros de química sanguínea.**

Con el fin de detectar fallas en el funcionamiento de órganos específicos, se realizaron determinaciones bioquímicas a partir de suero sanguíneo de las siguientes enzimas: Alanino aminotransferasa (ALT) y Creatinina (Crea). (Ver anexo 6).

Siguiendo la técnica retroorbital, se extrajo sangre (0.5 ml) de los ratones por medio de microcapilares heparinizados, esta se colocó en tubos endorf de 1.5 ml., luego se llevó al laboratorio de serología de CENSALUD. La sangre fue centrifugada en una microcentrifuga marca SELECTA por 5 min 12,000 rpm.

El suero separado se mezcló con volúmenes estandarizados de los reactivos comerciales, esta mezcla fue procesada mediante un espectrofotómetro marca LIGHTWAVE con longitudes de onda de 340 nanómetros para ALT y 500 nanómetros para la Creatinina.

### **3.5. NECROPSIA MACROSCÓPICA.**

La patología tiene un papel importante en toxicología puesto que proporciona información en diferencias de la morfología del tejido fino y del órgano que establecen la presencia o la ausencia de lesiones y si las hay relaciona el efecto de la dosis para tales lesiones. Así mismo, los datos de la patología pueden facilitar la interpretación de otros datos tales como cambios del peso o resultados de la hematología. (OECD, 2000)

Al finalizar el estudio los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical para luego practicarles una necropsia macroscópica completa y detallada a todos los animales empleados en el estudio, incluyó un examen detenido de la superficie corporal externa, la cavidad torácica y abdominal con su contenido, para detectar posibles alteraciones

macroscópica como producto de la toxicidad. Así como también se determinó el peso de hígado, corazón, pulmones, riñón, estomago y páncreas.

Los órganos fueron conservados, fijados en solución de formol al 10% para su posterior estudio histopatológico.

### **3.6. EXAMEN HISTOPATOLÓGICO.**

Se examinaron histológicamente los tejidos más importantes, aquellos encargados de la metabolización y eliminación de los agentes tóxicos por ser los más susceptibles a sufrir toxicidad. A razón de lo anterior, se tomaron muestras de pulmón, hígado, riñón e intestino delgado en frascos rotulados de Gerber con una solución de formalina al 10%.

Los fragmentos seleccionados correspondientes a todos los grupos, fueron embebidos en parafina y cortados en secciones con un grosor de 4 micras con un micrótopo marca LEYCA, las cuales fueron teñidos con hematoxilina y eosina, dicho procedimiento fue realizado por técnicos especialistas en histología. Los cortes fueron descritos al observarlos bajo un microscopio simple, FOCUS INSTRUMENTS en todos sus campos, bajo la dirección del especialista del área de patología de CENSALUD.

### **3.7. ANÁLISIS DE DATOS.**

El análisis de varianza (ANOVA) sirve para comparar varios grupos de una variable cuantitativa. El ANOVA permite obtener información sobre el resultado de comparación entre varios grupos. Es decir, permite concluir si los sujetos sometidos a diferentes tratamientos difieren significativamente. Para tal objetivo, se utilizó el paquete estadístico SPSS 12 para Windows, bajo la fórmula:

$$Y_{ij} = \mu + \pi_i + \varepsilon_{ij} \quad \text{con } i=1, \dots, a \text{ y } j=1, \dots, n$$

Donde:

$Y_{ij}$	Es la j-ésima observación
$\mu$	Es la media general de las observaciones
$\pi_i$	Es el efecto del i-ésimo tratamiento
$\varepsilon_{ij}$	Es el término usual del error aleatorio

Para los datos de histología se utilizó un análisis clúster, con el paquete de distribución libre PAST. Análisis “cluster”, o de conglomerados, es un nombre genérico utilizado para identificar una gran variedad de procedimientos usados para establecer una clasificación. Estos métodos parten de un conjunto de datos con información relevante acerca de una serie de casos (en nuestro caso presencia ó ausencia de lesiones) e intentan reorganizarlos en grupos homogéneos, en base a esa informa.

## IV. RESULTADOS

### 4.1. TOXICIDAD SUBCRÓNICA

#### 4.1.1. Observaciones clínicas.

En las observaciones clínicas que se realizaron diariamente a los animales tratados con la infusión de “epazote” no se evidenciaron signos de toxicidad ni efectos adversos, tales como: cambios en el pelaje, apariencia de ojos y mucosas, así como la actividad motora, el comportamiento fue normal, observándose una adecuada respuesta ante los estímulos (táctiles, auditivos, etc.)

Los resultados del peso corporal en general muestran una clara tendencia al aumento (Ver tabla 1). Esta tendencia constante se mantuvo durante el tiempo para ambos sexos, sin embargo los machos aumentaron más de peso que las hembras en todos los grupos tratados.

Los grupos experimentales al final del estudio obtuvieron mayor aumento porcentual en peso al ser comparados con el grupo control el cual logró una ganancia del 10.82% para machos y 15.35% para las hembras y los menores porcentajes corresponde a los grupos tratados.

Tabla 1. Valores promedios iniciales y finales de peso corporal en los grupos de ratones.

Peso corporal en gramos								
Sexo	Macho				Hembra			
Grupo	Inicio	Final	Diferencia	Aumento (%)	Inicio	Final	Diferencia	Aumento (%)
Control	30.95±1.52	34.31±1.99	3.35±2.46	10.82	22.35±1.02	25.78±1.26	3.43±0.81	15.35
T1	29.54±1.81	34.15±2.31	4.61±1.86	15.60	24.44±1.98	26.43±1.42	1.99±2.41	8.14
T2	27.97±3.52	31.20±1.93	3.22±2.31	11.51	22.57±1.56	25.72±1.95	3.15±1.26	13.96
T3	29.40±2.13	32.85±1.33	3.45±3.04	11.73	23.44±0.96	25.36±1.09	1.92±0.23	8.19

Los valores se expresan como la media ± D.S. (desviación estándar)  $p > 0.05$

#### 4.1.2. Efecto sobre indicadores hematológicos.

Los valores de los indicadores hematológicos por grupo de tratamiento para cada sexo pueden apreciarse en la tabla 2, los cuales se presentan como valores medios ± desviación estándar (D.S). Obsérvese que los valores medios de cada componente del

hemograma de los ratones experimentales son muy similares a los del grupo control en ambos sexos. (Anexo 5)

Tabla 2. Variaciones medias del hematocrito, eritrocitos, recuento total y diferencial de leucocitos a los 90 días de tratamiento, en los grupos control y tratamiento.

Grupo	Sexo	Hto (%)	Hb (gs%)	GR (xmmc)	GB (xmmc)	N (%)	L (%)
Control	M	33.2±1.7	11.05±0.55	3925000±170782.5	3725±206.15	13.75±2.2	86.25±2.2
	H	33.5±1.9	11.12±0.60	3975000±221735.5	2675±287.22	10.75±0.9	81.25±5.5
T1	M	34±2.16	11.30±0.70	4000000±216024.6	3400±316.22	16.75±6.6	84.0±5.4
	H	34.2±1.2	11.15±0.17	3975000±50000	2750±387.29	13.50±4.5	84.25±5.9
T2	M	35.2±2.3	11.70±0.80	4125000±236290.7	4050±953.93	13.25±4.9	86.0±5.16
	H	32.5±3.1	10.80±1.0	3925000±330403.7	3675±221.73	11.25±3.8	88.75±3.8
T3	M	30.5±6.4	10.15±2.1	3576250±915381.2	2875±525.19	12.25±4.9	86.25±6.7
	H	34.0±1.6	11.3±0.57	4075000±170782.5	3050±885.06	11.75±3.5	84.5±7.1

Los valores se expresan como la media ± D.S.  $p > 0.05$

#### 4.1.3. Efectos sobre indicadores bioquímicos.

El efecto del extracto sobre la función hepática y renal de los ratones, fue medido a través de cambios en Alanino amino transaminasa (ALT) y creatinina (Tabla 3 y 4) respectivamente. La figura 1 muestra la representación gráfica de los valores promedios de ALT en machos y hembras tratados y no tratados, en cuanto a los valores más alto de este indicador bioquímico se puede apreciar en el grupo control de machos el cual obtuvo el valor promedio más alto 49.21U/L y los valores promedios menores correspondieron a los grupos tratados, caso diferente en las hembras donde el valor promedio más alto correspondió al T1 con 46.5 U/L y los promedios menores para los restantes grupos. Mediante las comparaciones de los niveles séricos de ALT de los grupos experimentales con el control se pudo establecer que el grupo T2 machos difiere con el grupo control.

Tabla 3. Valores promedios de transaminasa (ALT) después de 90 días de experimento, en los grupos control y tratados.

Grupo		ALT(U/L)	
Sexo	Macho	Hembra	
Control	49.21 ± 8.48	28.13 ± 9.04	
T1	43.05 ± 16.21	46.5 ± 12.18	
T2	30.75 ± 6.54*	33.57 ± 15.96	
T3	35.35 ± 9.47	43.8 ± 12.78	

Los valores se expresan como la media ± D.S. \*p <0.05.y p >0.05 para los demás.

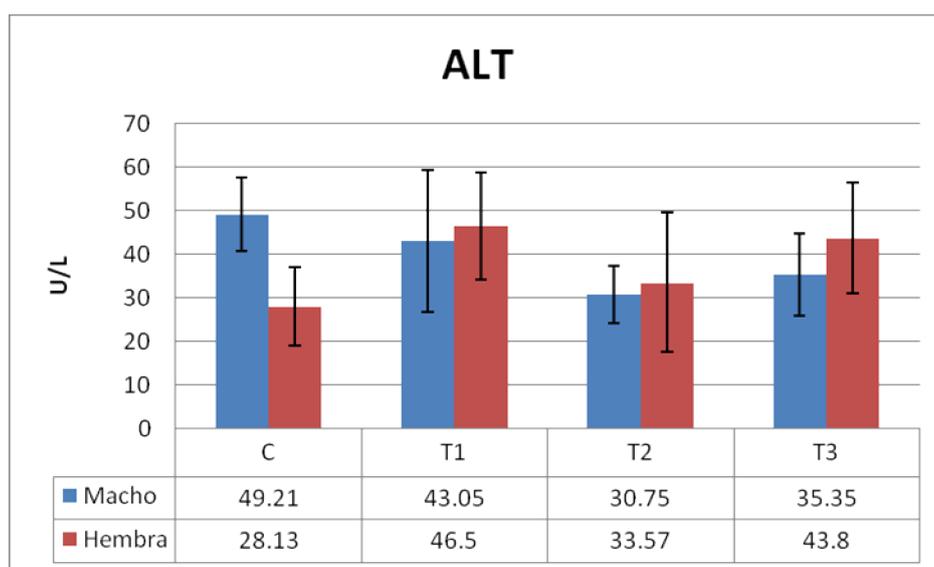


Fig. 1. Comparación grafica del promedio de ALT entre ratones de ambos sexos experimentales y control.

Tabla 4. Valores promedios de creatinina después de 90 días de experimento, en los grupos control y tratados.

Grupo	CREATININA (mg/dL)	
Sexo	Macho	Hembra
Control	0.16±0.09	0.13±0.007
T1	0.12±0.05	0.19±0.030
T2	0.34±0.09	0.24±0.179
T3	0.24±0.13	0.19±0.029

Los valores se expresan como la media ± D.S.  $p > 0.05$ .

La figura 2 muestra que el mayor promedio para creatinina corresponde al grupo T2 con  $0.34 \pm 0.09$  mg/dL, no obstante los resultados de los otros grupos fueron menores principalmente el grupo de la T1 machos cuyo valor fue de  $0.12 \pm 0.05$  mg/dL. Obsérvese además que el grupo T2 hembra aparece con el mayor promedio  $0.24 \pm 0.179$  y los restantes grupos con los menores promedios.

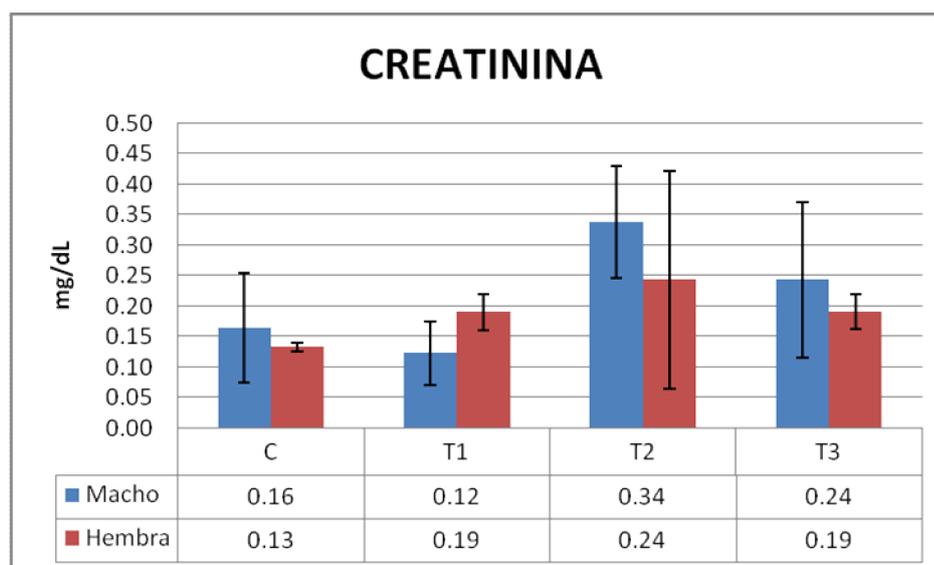


Fig. 2. Comparación grafica del promedio de creatinina entre ratones de ambos sexos experimentales y control.

#### 4.1.4. Necropsia.

Al realizar la necropsia no se encontraron alteraciones macroscópicas, debido a que las características morfológicas de los órganos de los grupos experimentales tenían una apariencia similar a las del grupo control en cuanto a superficie, consistencia, color, tamaño y peso. Con respecto al peso de órganos, los datos de estos se presentan en las tablas 5; en ella se muestran los valores promedios de los pesos de órganos en machos y hembras. La tabla permite apreciar que los órganos pulmón y estomago del grupo control machos fueron los de mayor peso al contrastarlos con los grupos experimentales, no así con los otros órganos; puesto que para hígado los mayores valores fueron para el grupo T1, corazón T2, riñón T3 y T2 para páncreas.

Al realizar la misma exploración de datos en las hembras, se establece que las hembras del T1 resultaron con valores más elevados para estos órganos: hígado, corazón, pulmón, riñón y páncreas al compararlos con el grupo control. Las hembras control presentaron los pesos mayores para estomago con respecto a los grupos experimentales.

Tabla 5. Valores promedios del peso de órganos en gramos en machos y hembras después de 90 días de tratamiento, en los grupos control y tratados.

Grupo	Sexo	Hígado	Corazón	Pulmones	Riñón	Estomago	Páncreas
Control	M	1.60 ± 0.21	0.15 ± 0.02	0.24 ± 0.06	0.28 ± 0.02	1.24 ± 0.47	0.10 ± 0.01
	H	1.23 ± 0.11	0.12 ± 0.02	0.20 ± 0.05	0.19 ± 0.016	1.32 ± 0.22	0.13 ± 0.04
T1	M	1.70 ± 0.13	0.16 ± 0.03	0.21 ± 0.04	0.29 ± 0.02	1.21 ± 0.41	0.18 ± 0.08
	H	1.35 ± 0.14	0.15 ± 0.02	0.22 ± 0.04	0.22 ± 0.027	1.27 ± 0.32	0.18 ± 0.08
T2	M	1.52 ± 0.23	0.17 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.91 ± 0.23	0.25 ± 0.36
	H	1.28 ± 0.20	0.15 ± 0.03	0.19 ± 0.04	0.20 ± 0.046	0.85 ± 0.22	0.16 ± 0.06
T3	M	1.58 ± 0.07	0.15 ± 0.03	0.20 ± 0.04	0.30 ± 0.02	0.87 ± 0.22	0.24 ± 0.05
	H	1.21 ± 0.18	0.14 ± 0.03	0.18 ± 0.02	0.18 ± 0.015	0.66 ± 0.16	0.16 ± 0.07

#### 4.1.5. Histopatología.

Los órganos preservados en formol al 10% fueron fijados e incluidos en parafina se obtuvieron secciones utilizando un micrótomo, luego se tiñeron con hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio óptico.

En la fig. 3 se muestran los cortes de pulmón, hígado, riñón e intestino delgado con sus respectivos hallazgos histológicos. Las lesiones encontradas se expresan en porcentaje para cada grupo en las tablas 7, 8 y 9, mostrando que las alteraciones más frecuentes encontradas en los tejidos analizados fueron; a) infiltrados inflamatorios mononucleares focal o multifocal, b) congestión y dilatación vascular y c) congestión vascular septal todos estos hallazgos fueron encontrados tanto en los grupos control como en los experimentales. A diferencia de los hallazgos anteriores, aparece la hiperplasia folicular linfoide, como un hallazgo que se reportó para los grupos experimentales.

**Hígado:** En la tabla 6 se muestran las alteraciones presentes en el tejido hepático, entre estas tenemos: a) infiltrado inflamatorio mononuclear focal, en donde el porcentaje mayor se encontró en el grupo control con un 36.36% y el menor en el grupo del T3 con 9.09%. b) La congestión vascular fue mayor en el grupo del T3 con 36.36% y el menor en el grupo del T2 con un 13.63%. c) La dilatación vascular fue mayor en los grupos con el T1 y T3 con un porcentaje de 27.58% para cada uno y menor en el grupo control con un 20.68%. d) Los núcleos puntiformes subcapsulares fueron observadas mayoritariamente en el grupo del T3 con un 40% mientras que en el grupo control presento solo un 5%, también se observó en una mínima cantidad. e) La desorganización trabecular y esta solamente se observó en el grupo del T1 en un 80% y en el T2 que fue del 20%. En la figura 10 se observan algunas alteraciones de los organos.

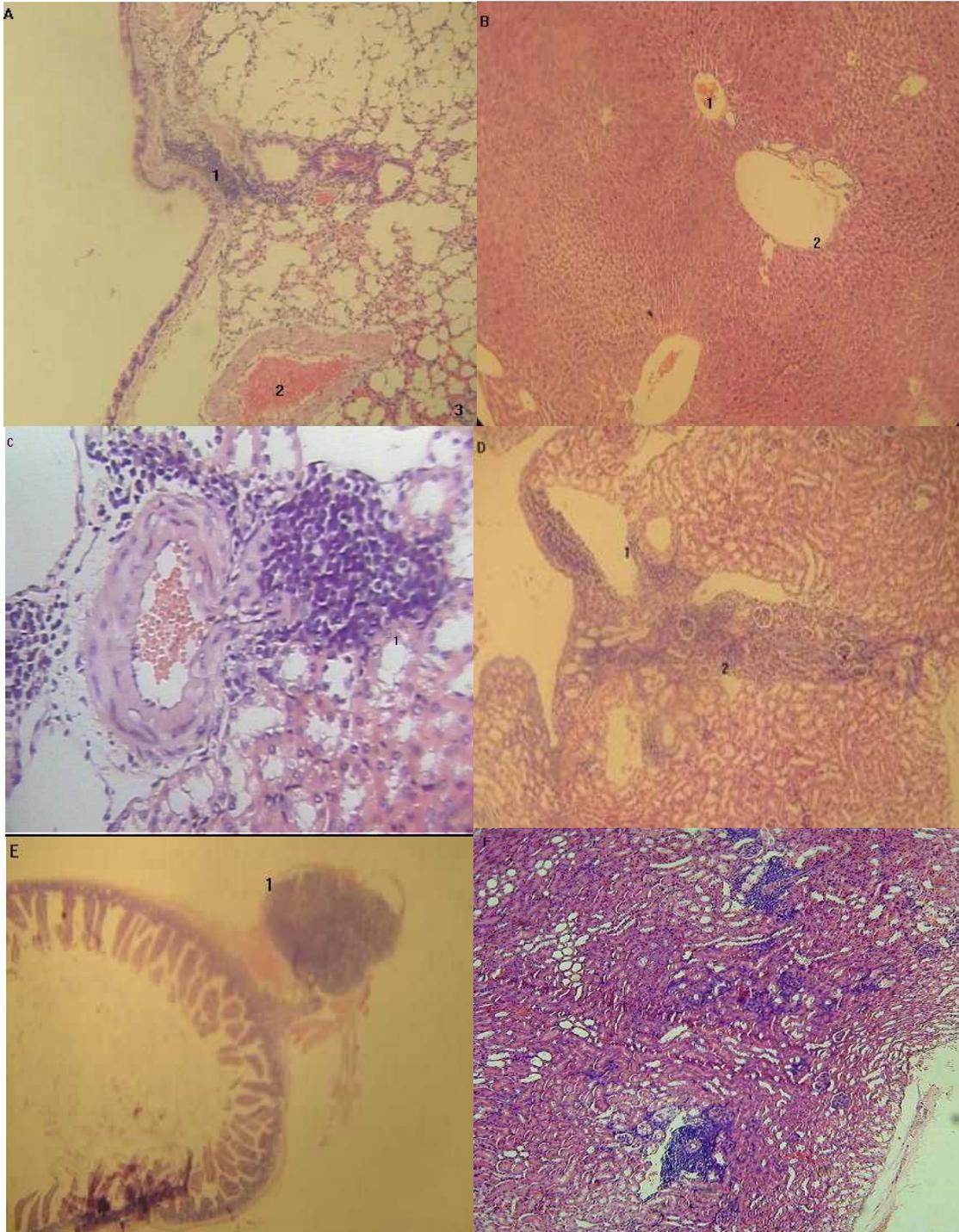


Fig. 3. A. Pulmón 10X: infiltrado inflamatorio mononuclear leve focal peribronquial (1), Congestión vascular (2) y congestión vascular septal (3). B. Hígado 10X: congestión vascular (1) y Dilatación vascular (2). C. Pulmón 40X: Infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular (1). D. Riñón 10X: infiltrado inflamatorio mononuclear perivascular (1) e Infiltrado inflamatorio mononuclear intersticial (2). E. Intestino delgado 10X: Hiperplasia folicular linfoide. F. Hipercelularidad glomerular.

Tabla 6. Porcentaje de alteraciones histológicas en tejido hepático de ratones control y tratados con infusión de *Chenopodium ambrosioides* por 90 días.

Alteraciones expresadas en %					
Concentración	IIMN focal	Congestión vascular	Dilatación vascular	Núcleos puntiformes subcapsulares	Desorganización trabecular
Control	36.36	18.81	20.68	5	-
T1	27.27	31.81	27.58	25	80
T2	27.27	13.63	24.13	30	20
T3	9.09	36.36	27.58	40	-
TOTAL	100	100	100	100	100

**Pulmón:** en la tabla 7 se presentan las alteraciones observadas en tejido pulmonar donde se reportaron; a) infiltrados inflamatorios mononuclear focal con un mayor porcentaje en los grupos control y T1 ambos con un 29.41%, mientras que el menor porcentaje se reportó para el grupo del T2 con un 17.64%. b) Los infiltrados inflamatorios mononuclear multifocal fueron observados en mayor cantidad en el grupo del T1 con un 42.85%, mientras que en los grupos control y T3 ambos se encontraron en un 14.28%. c) La congestión vascular se encontró en mayor porcentaje en el grupo control con un 50% y el menor en el grupo del T3 con un 10%, sin embargo en el grupo del T2 no fue reportado. d) La dilatación vascular se encontró en mayor porcentaje en el grupo del T1 siendo esta de 55.55% y el menor porcentaje se observó en los grupos del T2 y T3 ambos con 11.11% y e) la congestión vascular septal presentó su mayor porcentaje en los grupos del T2 y T3 con un 28.57% y el menor en el grupo control que fue de un 19.04%. En la figura 10 y 11 se pueden observar algunas de las alteraciones mencionadas.

Tabla 7. Porcentaje de alteraciones histológicas en tejido pulmonar de ratones control y tratados con infusión de *Chenopodium ambrosioides* por 90 días.

Concentración	Alteraciones expresadas en %				
	IIMN focal	IIMN multifocal	Congestión vascular	Dilatación vascular	Congestión vascular septal
Control	29.41	14.28	50	22.22	19.04
T1	29.41	42.85	40	55.55	23.80
T2	17.64	28.57	-	11.11	28.57
T3	23.52	14.28	10	11.11	28.57
TOTAL	100	100	100	100	100

- IIMN: Infiltrado inflamatorio mononuclear.

**Riñón e intestino:** la tabla 8 presenta las alteraciones encontradas en el riñón e intestino delgado. En cuanto a riñón, solamente se identificaron; a) infiltrados inflamatorios mononucleares focales fue mayoritariamente reportado en el grupo control con un 33.33% y en menor porcentaje en el grupo del T2 con un 16.66% (fig. 12). Y b) la hiper celularidad glomerular se identificó en los grupos del T2 en un 60% y en el T3 con un 40%; por otro lado, el examen al microscopio realizado en el intestino delgado solamente revela la presencia de hiperplasia folicular linfoide que como se mencionó anteriormente solamente se observó en los grupos experimentales teniendo el mayor porcentaje el grupo del T3 con un 46.15% y el menor porcentaje el grupo del T2 con el 23.07%.

Tabla 8. Porcentaje de alteraciones histológicas en tejido renal e intestinal de ratones control y tratados con infusión de *Chenopodium ambrosioides* por 90 días.

Alteraciones expresadas en %			
Concentración	IIMN focal	Hiper celularidad glomerular	Hiperplasia folicular linfoide.
Control	33.33	-	-
T1	22.22	-	30.76
T2	16.66	60	23.07
T3	27.77	40	46.15
TOTAL	100	100	100

El dendograma que resulta en la clasificación jerárquica de los individuos en base a las variables especificadas, utilizando la distancia Euclídea y el método de Ward, para los datos binarios de histología se presenta en la Figura 4.

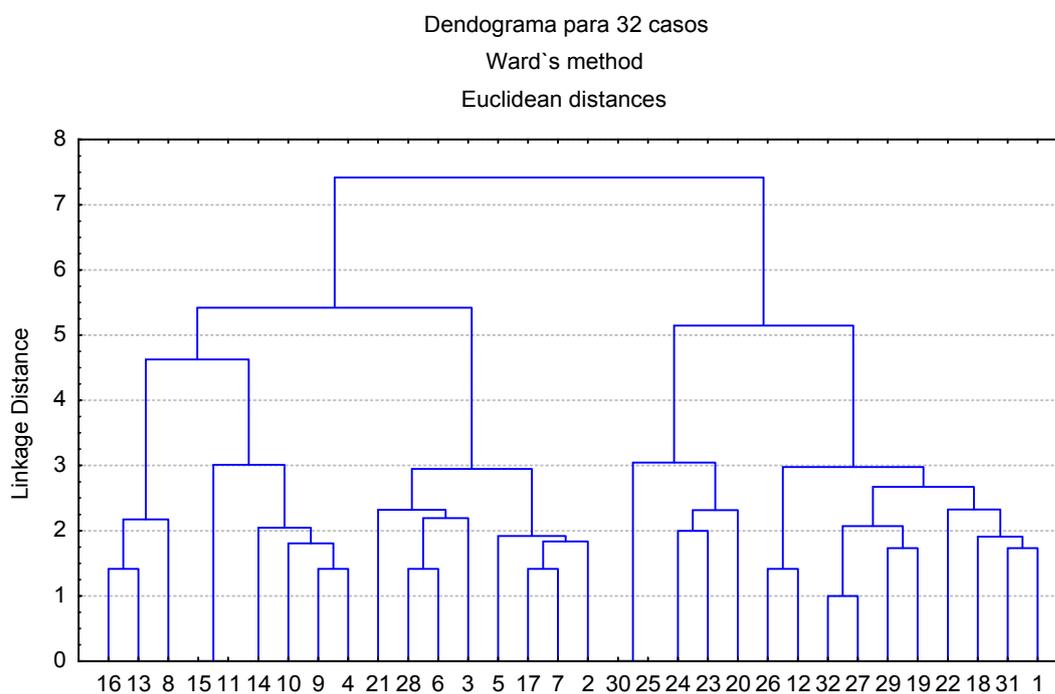


Fig. 4. Resultado del Clúster jerárquico

En base a estos resultados, se ha realizado un análisis clúster no jerárquico, para 4 grupos. Los individuos que contiene cada clúster pueden verse en el cuadro 9, obsérvese la distribución de los grupos y se pueden describir como sigue. El grupo uno está formado en, esencia, por individuos del tratamiento 1 y dos individuos del grupo control (4,8). El grupo dos lo forman: los ratones del grupo control, los individuos 17, 21 y 28 pertenecen a los tratamientos 2 y 3 respectivamente. El grupo tres lo componen los ratones 20, 23, 24 del tratamiento 2 y dos individuos del grupo del grupo 3 (25 y 30). El grupo cuatro incluye 10 animales, uno del grupo control y tratamiento que son los ratones 1 y 12 respectivamente, tres ratones del tratamiento 2(18,19 y 22), los restantes cinco ratones (26, 27, 29, 31, 32) del grupo experimental 3.

Tabla 9. Análisis Clúster. Individuos que integran cada grupo.

Grupo 1	16, 13, 8, 15, 11, 14, 10, 9, 4.
Grupo 2	21, 28, 6, 3, 5, 17, 7, 2.
Grupo 3	30, 25, 24, 23, 20.
Grupo 4	26, 12, 32, 27, 29, 19, 22, 18, 31, 1.

## V. DISCUSIÓN

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. Respecto a lo anterior, nuestras observaciones clínicas conducen en un primer momento a una baja toxicidad de la sustancia, debido a que no se registraron alteraciones etológicas ni morfológicas que pudieran ser producto de la sustancia administrada. A favor de lo anterior, y en estudios similares (Pérez *et al*, 2008; Toledo *et al*, 2007), no se reportaron cambios en los parámetros toxicológicos (Ver anexo 3).

En cuanto al peso corporal Mancebo (2002), afirma que los datos referentes a éste y al consumo de alimentos, poseen una gran sensibilidad para detectar alteraciones debidas a productos químicos, incluso aquellos de baja toxicidad. Normalmente, después de la administración de sustancias tóxicas se producen pérdidas de peso en relación con el grado de toxicidad. Esto es consecuencia de la movilización de las reservas energéticas del individuo para enfrentar la actividad metabólica incrementada que acompaña los procesos de detoxificación (Bourzac, 1998).

De esta manera al analizar sobre los resultados obtenidos, se comprueba que no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y tratados. Pero para Acuña *et al.* (2005), el aumento de peso a favor en los grupos tratados machos puede deberse a las sustancias químicas que poseen las plantas, entre estas tenemos: alcaloides, esteroides, taninos, glucósidos, alcoholes y quinonas. Y según Pordomingo *et al.* (2004), los taninos son sustancias que estimulan el aumento de peso y esta puede ser una de las razones por las que los machos del tratamiento hayan aumentado más su peso que los machos control. caso contrario las hembras tratadas que respondieran con una disminución del peso corporal, lo que podría ser considerado como un efecto deletéreo inducido por la sustancia.

Por otro lado, este aumento porcentual del peso corporal del grupo de machos tratamiento podría indicar según Kaye *et al.* (1989), un aumento de señales moleculares estimulantes de la conducta alimentaria provocado posiblemente por el efecto directo o indirecto de sustancias químicas presentes en *Chenopodium ambrosioides*. Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos en un estudio toxicológico agudo oral de *Eucalyptus saligna* realizado por León *et al.* (1999), quienes mencionan que el aumento de peso en los animales del grupo tratamiento de dicha investigación puede relacionarse con las sustancias químicas de la planta, sustancias que en algunos de los casos se encuentran presentes en *Chenopodium ambrosioides*. No así en las hembras donde ocurrió un efecto contrario, ya que las tratadas obtuvieron los menores valores porcentuales y que en cierta medida pudieran ser explicados ha una baja toxicidad de la infusión de epazote. Caso contrario las hembras tratadas que respondieran con una disminución del peso corporal, lo que podría ser considerado como un efecto deletéreo inducido por la sustancia.

El resultado de la exposición a un compuesto químico, generalmente produce alteraciones bioquímicas e incluye modificaciones en la composición celular sanguínea. Por lo tanto, Mancebo (2002), propone que para la interpretación de los datos procedentes de los análisis de laboratorio clínico, tanto de hematología como de bioquímica sanguínea, resultaría de gran utilidad el establecimiento de rangos normales a partir de una población dada no alterada, a los que él denomina el grupo control.

De acuerdo a lo anterior, se puede considerar que los indicadores hematológicos no fueron afectados por la sustancias de ensayo manteniéndose dentro de los rangos normales, ya que en ninguna de las comparaciones realizadas existió diferencias significativas respecto a los controles, lo que indica que el tratamiento no afecto los componentes celulares básicos que contiene la sangre al igual que en investigaciones similares realizadas por Capo, 2008 y Aurrecochea, 2004.

Para el caso de la bioquímica sanguínea, deben de ser considerados como indicadores de daño hepático (Transaminasas) y renal (Creatinina), solo en casos que se

encuentre aumentado su valor (Torres, 2006). Para este estudio no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para Creatinina entre el grupo control y el tratado, aunque se hallaron lesiones histológicas en hígado y riñón, los valores de las enzimas fueron normales, ya que no hubo lesiones celulares de importancia que generalmente vienen acompañadas de cambios enzimáticos significativos.

No obstante, los valores de ALT del grupo 2 machos mostró diferencias significativas con respecto al control (Tabla. 3), esto carece de importancia biológica debido a que los valores se encuentran dentro del rango establecido para la especie (CCAC, 1998). Estos resultados son coherentes con investigaciones similares (Arango *et al*, 2005; Lagarto *et al*, 2005), en donde los valores se mantienen dentro de estos rangos.

Con respecto al estudio anatomopatológico o necropsia, Höfle (2007), sugiere que para determinar la presencia de daños toxicológicos en órganos internos estos deben presentar cambios en el tamaño, la forma, la superficie, el color y la consistencia. También deben existir cambios significativos en el peso de los órganos. Mientras que los resultados obtenidos en esta investigación para este parámetro no muestran cambios macroscópicos observables de los órganos internos examinados como los anteriormente mencionados, ni diferencias significativas en el peso de órganos entre el grupo control y los tratados, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Acuña *et al*. (2005) y Amole & Izegebu (2005) quienes no reportan alteraciones significativas en los órganos estudiados.

En lo que concierne a la histopatología, la congestión hepática observada en los animales, aparece como un trastorno hemodinámico inespecífico común en análisis post-mortem y sin otras lesiones crónicas, no está relacionada con toxicidad química (Isaza *et al*, 2005). Las alteraciones de tipo congestivo reportados en el hígado tanto en los grupos tratados como en los control podrían deberse a un descenso del flujo sanguíneo secundario al éstasis venoso en el momento del sacrificio. Estos cambios se producen fundamentalmente por la anoxia que sufren las células y por la acción prolongada del éstasis. En un órgano parenquimatoso como el hígado se puede manifestar como hemorragias y congestión centrolobulillar entre otros (Lagarto *et al*, 2005).

López (2006), menciona que el estrés es uno de los factores externos más frecuentes que inhibe los mecanismos de defensa en los pulmones, entre las células encargadas de desarrollar esta función están, los macrófagos alveolares y células alveolares. Según este autor la inhibición de estos mecanismos es la causa principal de aparición de lesiones tales como, infiltrados inflamatorios, congestión y dilatación vascular; mismos hallazgos para la presente investigación, por lo tanto se considera que dichas lesiones pueden haber sido provocadas por el estrés causado al ser manipulados, más que por la infusión administrada, ya que tanto el grupo control como los tratados las presentaron.

En cuanto a las lesiones inflamatorias intersticiales renales es posible que no sean efectos tóxicos del extracto, sino lesiones que aparecen con alguna frecuencia en esta especie animal y que algunos autores atribuyen a las proteínas de la dieta (Isaza *et al*, 2005). Lagarto (*op. cit.*), por su parte menciona que es un tipo de lesión común en roedores. La patogénesis de esta lesión según este autor se relaciona con la pérdida de proteínas tras el aumento de porosidad de la membrana basal.

Con lo que respecta al tracto gastrointestinal, es un sistema orgánico de considerable complejidad, el cual está formado por numerosos tipos de tejidos y realiza múltiples funciones. Consecuentemente, posee posibles lugares para la producción de efectos tóxicos por la acción de sustancias químicas. Además, este sistema constituye la entrada habitual a los componentes de la dieta, y tiene un considerable potencial para la exposición a agentes tóxicos (Lagarto *et al*, 2002). Además se sabe que *Chenopodium ambrosioides*, posee (en mayor o menor proporción) terpenos entre sus componentes, y estos son capaces de alterar la permeabilidad de la membrana celular, en especial sobre mecanismos de transporte iónico (Zeinsteger *et al*, 2003).

Por lo tanto, en el presente estudio que muestra una asociación entre la administración subcrónica de la infusión de epazote y la aparición de la hiperplasia folicular linfóide, la reacción histopatológica inespecífica de la pared intestinal puede estar

relacionada especialmente con los compuestos terpénicos que según Zeinsteger *et al* (2003), algunos de ellos han sido descritos como de toxicidad baja o alta. En base a lo anteriormente mencionado y de acuerdo al cambio histopatológico de la mucosa intestinal, es valido atribuírselos a los componentes químicos presentes naturalmente en *Chenopodium ambrosioides*. Ha pesar de ser una reacción inespecífica, lo que significa es que puede ser causada por cualquier factor ya sea externo o interno.

## VI. CONCLUSIONES

Con lo que concierne a los parámetros toxicológicos, no se encontraron alteraciones etológicas y morfológicas en los signos clínicos, que puedan ser ocasionadas por la infusión de epazote (*Chenopodium ambrosioides*) administrada oralmente, debido a estos resultado, se concluye que la sustancia no resultó ser tóxica para estos parámetros en los ratones INH.

Aunque existió aumento de peso corporal para los machos tratados y disminución para las hembras tratadas, ambos resultados carecen de significancia estadística para todos los grupos.

Los exámenes hematológicos y bioquímicas son de gran de valor en los ensayos toxicológicos a largo plazo, ya que estos son indicativos de la gravedad que puede causar una sustancia tóxica; por lo tanto a falta de significancia estadística en lo parámetros medidos para esta investigación; se puede asegurar que la administración subcrónica (90 días) de la sustancia de ensayo no causó daño sistémico ni orgánico en los ratones tratados.

Habiendo un comportamiento morfológico similar entre los órganos estudiados de los animales experimentales y el grupo control e incluso en el peso absoluto de órganos tampoco existió diferencias significativas, se puede asegurar que la sustancia administrada no causa ningún tipo de lesión orgánica que se pueda percibir a simple vista.

En el caso del análisis de conglomerados en donde se busca la conformación de grupos similares (Fig. 4), nótese la presencia de individuos controles y del grupo experimental en cada uno de los clúster. Al no existir una conformación homogénea de individuos pertenecientes al mismo grupo, no se puede establecer mediante este análisis una clara diferenciación en base a las lesiones histológicas. Confirmándose que los daños encontrados en los grupos experimentales no son resultado de la sustancia de ensayo debido a que estas mismas lesiones se reportaron para el grupo control, a excepción del daño en la

pared intestinal y aunque se consideró para el análisis no influyo para la conformación de los clúster.

En general, bajo nuestras condiciones experimentales la administración continua de *Chenopodium ambrosioides* por vía oral a estas dosis, no conduce a alteraciones en el biomodelo experimental que pudieran ser considerados como signos tóxicos al no haber daños macroscópicos, histológicos y bioquímicos, por lo que se considera a la infusión no toxica.

## VII. RECOMENDACIONES

Las plantas medicinales y aromáticas juegan un importante papel en el cuidado de la salud de las personas. Hasta el advenimiento de la medicina moderna, el hombre dependió de ellas para el tratamiento de sus enfermedades. La sociedad humana en todas las épocas, ha acumulado un vasto arsenal de conocimientos tradicionales sobre el uso de las plantas medicinales. Aproximadamente el 80 % de la población de la mayor parte de los países en desarrollo todavía usan la medicina tradicional derivada de plantas para satisfacer las necesidades primarias de salud. Los propósitos de la ciencia actual llevan a la transformación del conocimiento tradicional en científico, los hábitos y costumbres en terapias comprobadas y los preparados, remedios, infusiones y cocimientos en suplementos nutricionales y productos farmacéuticos. (Menéndez, 2006).

La mayor parte de los remedios naturales que se venden sin receta médica y los de preparación doméstica son consideradas inocuos y pueden ser beneficiosos cuando se utilizan correctamente; cuando no, pueden ser dañinos y peligrosos. Al no estar sujetos a un control de calidad oficial en muchos países, su calidad y autenticidad varían ostensiblemente. Muchos carecen de eficacia comprobada y pueden provocar reacciones inesperadas. (Morón, 2007).

Por lo tanto con base en nuestros resultados proponemos que:

- ❖ Considerando que la concentración de los diferentes compuestos químicos varía dependiendo de la parte de la planta, edad, época del año, lugar de colecta y si el material de la planta está seco o fresco. Sería de mucha importancia conocer la concentración real de ascaridol presente en esta planta considerando dichas variables.
  
- ❖ Para esta investigación se utilizaron concentraciones relativamente bajas, debido a esto se recomienda prolongar el tiempo de exposición y esto con el fin de dilucidar

dudas en cierta manera, con la hiperplasia folicular linfoide de los grupos tratados y esta manera monitorear el avance patológico.

- ❖ Evaluar el efecto de la infusión sobre cultivos celulares de intestino ya que de esta manera se excluyen muchas variables del modelo biológico utilizado, que pueden tanto directa como indirectamente influido sobre la formación de la hiperplasia folicular linfoide y excluyendo esos factores se puede hacer un análisis más robusto y específico.
- ❖ Se recomienda trabajar con otros modelos biológicos, ya que las normas para estudios a largo plazo propuestas por la OECD sugiere utilizar dos especies animales para este tipo de investigaciones con el fin de evaluar las respuestas toxicológicas a diferentes categorías taxonómicas.
- ❖ Buscar métodos alternativos para minimizar el uso de ratones u otros modelos biológicos que se dispongan, esto con el fin de reducir el número de animales utilizados para futuras investigaciones toxicológicas, pero teniendo en cuenta que sean igual de efectivos al comparar los resultados obtenidos.
- ❖ Utilizar otra técnica de sangrado, ya que la técnica retro orbital no permite obtener los volúmenes relativamente grandes de sangre para realizar todas las pruebas de los parámetros hematológicos y bioquímicos. De acuerdo a esto se propone realizar la técnica de punción cardiaca con la cual se puede obtener mayores volúmenes de sangre para que permitirán realizar todas las pruebas hematológicas y bioquímicas que requieren los estudios toxicológicos.
- ❖ Se debería realizar más investigación científica de la planta estudiada, como de otras plantas medicinales, debido a su importancia en la salud humana y la medicina; ya que por medio de estos estudios se puede ayudar a la población a tener una mayor seguridad de lo que consumen.

## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Acuña, Alegria, c.; Alva, G.; Blas, L.; Bustamante, K.; Lopez, E.; Ludeña, K. 2005. Congreso Mundial de Medicina Tradicional. Universidad San Martín de Porres. Lima, Perú. pp. 5-6.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Disponible: [http://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology\\_curriculum/modules/2/es\\_lecture\\_notes.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/training/toxicology_curriculum/modules/2/es_lecture_notes.html)
- Amole, O & M.C. Izebu. 2005. Chronic Toxicity of *Chenopodium ambrosioides* in Rats. Lagos State University, College of Medicine, Departments of Pharmacology and Morbid Anatomy, IKEJA, Nigeria. *Biomedical Research* 16 (2): 111-113.
- Anónimo. s.a. Evaluación de diferentes concentraciones de ascaridol a partir de aceite esencial de epazote (*Chenopodium ambrosioides*) en ratones. Disponible en: [http://www.itesm.edu/wps/portal?WCM\\_GLOBAL\\_CONTEXT=/wps/wcm/connect/QRO/Quer%C3%A9taro/](http://www.itesm.edu/wps/portal?WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/QRO/Quer%C3%A9taro/).
- Arango, M.; Mejía, G.; Mejía, J.; Ríos, A.; Pozo, R.; Chica, L. Determinación de la toxicidad subaguda de *Zebrina pendula* en ratas. *Biosalud* 2005 (14), 56 – 66.
- Aurrecochea, J.; Cepero, W.; Perez, R.; Ávila, A.; Guzman, A.; Cruz, G. Evaluación de la toxicidad por administración única del producto QT2B21 en ratas Sprague Dawley. *Rev Cubana Plant Med* 2004;9(1)
- Bodin F. & C. F. Cheinisse. 1969. Toxicología Práctica. Ediciones Guadarrama S.A. Madrid, España. 255 pp.

- Bourzac, I.; Rodríguez, S.; Pérez, P.; Gonzales, P.; Muños, E.; Marrero, O.; Fariñas, M.  
Toxicología de VA-DIFTET por aplicación ha dosis única en ratones. *Rev. Toxicol.*  
(1998) 15: 59-63.
- Bruning, W.1974. Intoxicaciones vegetales en la infancia. *Rev. Chilena Pediatría*, Vol. 45,  
Nº 1.
- Capo, J.; Pavon, V.; Menendez, R.; Domínguez, C. Toxicología subcrónica del extracto  
acuoso de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev Cubana Plant Med* 2008;  
13(1): [www.imbiomed.com.mx](http://www.imbiomed.com.mx)
- Castillo, C., Torres, A. 1994. Determinación de la forma farmacéutica adecuada para la  
administración de la esencia *Chenopodium ambrosioides* (Epazote). Escuela de  
Química y Farmacia. Facultad de Química y Farmacia. Universidad de El Salvador.
- Canadian Council on Animal Care (CCAC) .1998. Guide for the care and use of laboratory  
animals., Ottawa, Canada. Disponible en línea :<[www.ccac.com](http://www.ccac.com)>
- Food and Drug Administration (FDA). 2006. Estudios para evaluar la seguridad de residuos  
de medicamentos veterinarios en alimentos para humanos: enfoque general de los  
estudios. Disponible en línea < <http://www.fda.com> >
- Heike, Vibrans. 2005. Malezas de México. Disponible en: <<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/chenopodiaceae/chenopodiumambrosioids/fichas/pagina1.htm>>
- Höfle U. 2007. Técnicas de Diagnóstico Post – Mortem: Necropsia y Toma de Muestras.  
Sevilleja de la Jara, España. 23 pp.

Huerta, E., Rodríguez, J., Ramírez, D., Martínez, R., Padilla M. 2003. Toxicología Aguda Oral de la decocción la *Peperomia pellucida* (L.) H.B.K. (Corazón de hombre). Disponible en línea < <http://www.sertox.com.ar/retel/n02/001.pdf> >

Isaza, G.; C, Arango.; Buritica, O.; Marulanda, H. Determinación de la toxicidad subcrónica de la *Zebrina péndula* en ratones. *Biosalud*, Volumen 14, Enero - Diciembre, 2005. pgs 67 - 77

Kaye W., Berrettini W. , Gwirtsman H. , Gold P. , George D. , Jimerson D. & Ebert M. Contribution of CNS Neuropeptide (NPY, CRH, and beta-endorphin) Alterations to Psychophysiological Abnormalities in Anorexia Nervosa. *Psychopharmacol Bull* 1989; 25(3): 433-438.

Lagarto, A.; Tillan, J.; Pavón, V.; Rodríguez, J.; Pardo, Z.; Ponce, M.; Guerra, I.; Vega, I. Toxicidad aguda oral y subcrónica en ratas de un extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. *Rev. Toxicol.* (2005) 22: 175-179.

\_\_\_\_\_. Evaluación toxicológica de las tabletas de Acimin: un suplemento nutricional de calcio y magnesio de origen natural. *Rev. Toxicol.* (2002) 19: 41-46.

Leon, M., Alfonso I., Molina J., Cadenas J. & C. Gómez. 1999. Toxicología Aguda Oral *Eucaliptus saligna*. Instituto Superior de Ciencias Médicas "Dr. Carlos J. Finlay". Cuba. *Rev. Cubana Plant. Med.* 3(2):87-9.

López A. 2006. Patología del Sistema Respiratorio. Sin Ed. Atlantic Veterinary College. 18pp.

Mancebo, A.; Scull, I.; González Y.; Arteaga M.; González B.; Fuentes D.; Hernández O.; Correa, M. Ensayo de toxicidad a dosis repetidas (28 días) por vía oral del extracto acuoso de *Morinda citrifolia* en ratas Sprague Dawley. *Rev. Toxicol.* (2002) 19: 73-78.

Medicina. 2006. Ética en el Uso de Animales de Experimentación. Disponible en: <<http://www.medicinabuenaosaires.com/revistas/vol56-96/5/animalesdexp.htm>>

Menéndez, I. Actualidad de la Medicina Tradicional Herbolaria. *Rev Cubana Plant Med* 11 (2) Ciudad de la Habana abr.-jun 2006. Disponible en: [www.imbiomed.com.mx](http://www.imbiomed.com.mx)

Moreno, I. Evaluación toxicológica. *Rev. Toxicol.* (2002) 19: 97-144

Moron, F. Necesidad de investigaciones sobre plantas medicinales. *Rev Cubana Plant Med.* 2007;12(4). Disponible en: [www.imbiomed.com.mx](http://www.imbiomed.com.mx).

Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2000. Guidance Document on the Recognition, Guidance Notes for Analysis and Evaluation of Repeat-Dose Toxicity Studies. Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No 23.

Organization for Economic Co-operation and Development.. 1998. Test Guideline 408. Repeated Dose 90-day Oral Toxicity Study in Rodents. En: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation & Development, Paris.

Organization for Economic Co-operation and Development.. 2001. Test Guideline 420. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. En: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Organisation for Economic Cooperation & Development, Paris.

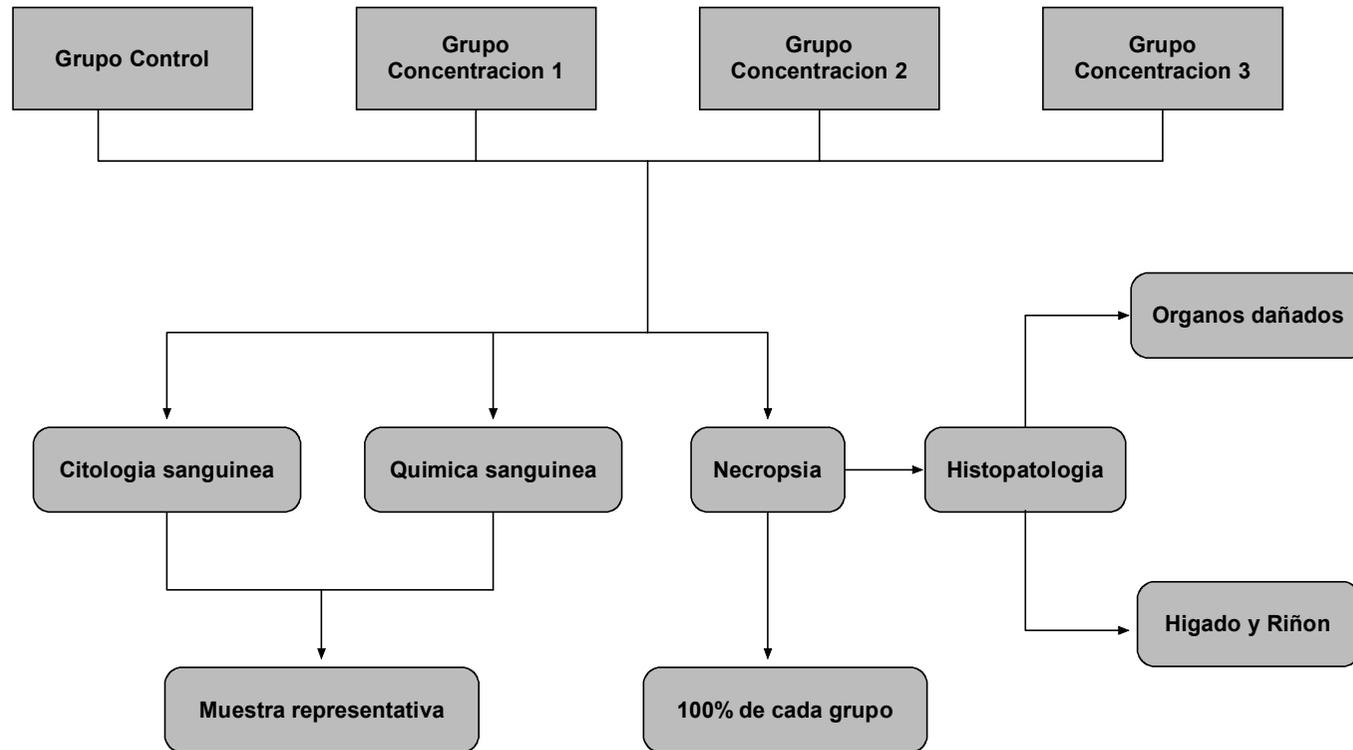
- Parker M. 2002. Biomethodology of the Mouse. The University of Iowa. Disponible en:  
<<http://research.uiowa.edu/animal/?get=mouse>>
- Peña, C.; Carter, D.; Fierro, F. 2001. Toxicología ambiental: Evaluación de riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>.
- Pérez, M.; Monteagudo, E.. Toxicidad aguda de un extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* Cav. en el modelo de sube y baja en ratas. *Rev Cubana Plant Med* 2008; 13(2). Disponible en Internet: [www.imbiomed.com.mx](http://www.imbiomed.com.mx).
- 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.
- Ramírez, F., Reyes J., Martínez D. 2002. Principales plantas de uso medico popular en los municipios de Ahuachapan, Atiquizaya, Jujutla y Tacuba del Departamento de Ahuachapan. Escuela de Biología. Facultad Multidisciplinaria de occidente. Universidad de El Salvador.
- Reichholf, J. 1994. Enciclopedia de la naturaleza, Reino Vegetal. Editorial Plaza and Janes / Adena WWF. Vol. 2. Barcelona, España. 219 pp.
- Silbergeld, E.s.a. Toxicología.. Disponible <<http://www.mtas.es/insht/EncOIT/pdf/tomo1/33.pdf>>

- Taylor, L. 2005. The Healing Power of Rainforest Herbs. Disponible en: <<http://www.rain-tree.com/epazote.htm>>
- Tello, J. 1997. Hepatotoxicidad de hierbas medicinales: Conocimiento profundo de la relación plantas-animales y la muerte celular. *Gastroenterology* 1997; 113(4): 1408-1411
- Toledo, D.; Monteagudo, E.; 2007. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. *Rev. electrón. Vet.* 8 (3): 353-360.
- Torres A., Ricciardi G., Agrelo A., Ricciardi A. & A. Bandoni. 2003. Examen del Contenido en Ascaridol del Aceite Esencial de *Chenopodium ambrosioides* L., (paico) Universidad Nacional del Nordeste Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Buenos Aires, Argentina. *FACENA* 19: 27-32.
- Torres, Y.; Campos, I.; Barro, A.; Morales, D.; Navarro, B.; Pérez, M.; Sosa, V. 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* 2006;11(2).
- Zeinsteger, A.; Teibler, P; Montenegro, P.; Rios, A.; Acosta de Pérez, O. Toxicidad hepática de componentes volátiles de *Senecio grisebachii* (margarita del campo o primavera) en ratones. Universidad Nacional del Nordeste Abstracts V-017. 2003.

# ANEXOS

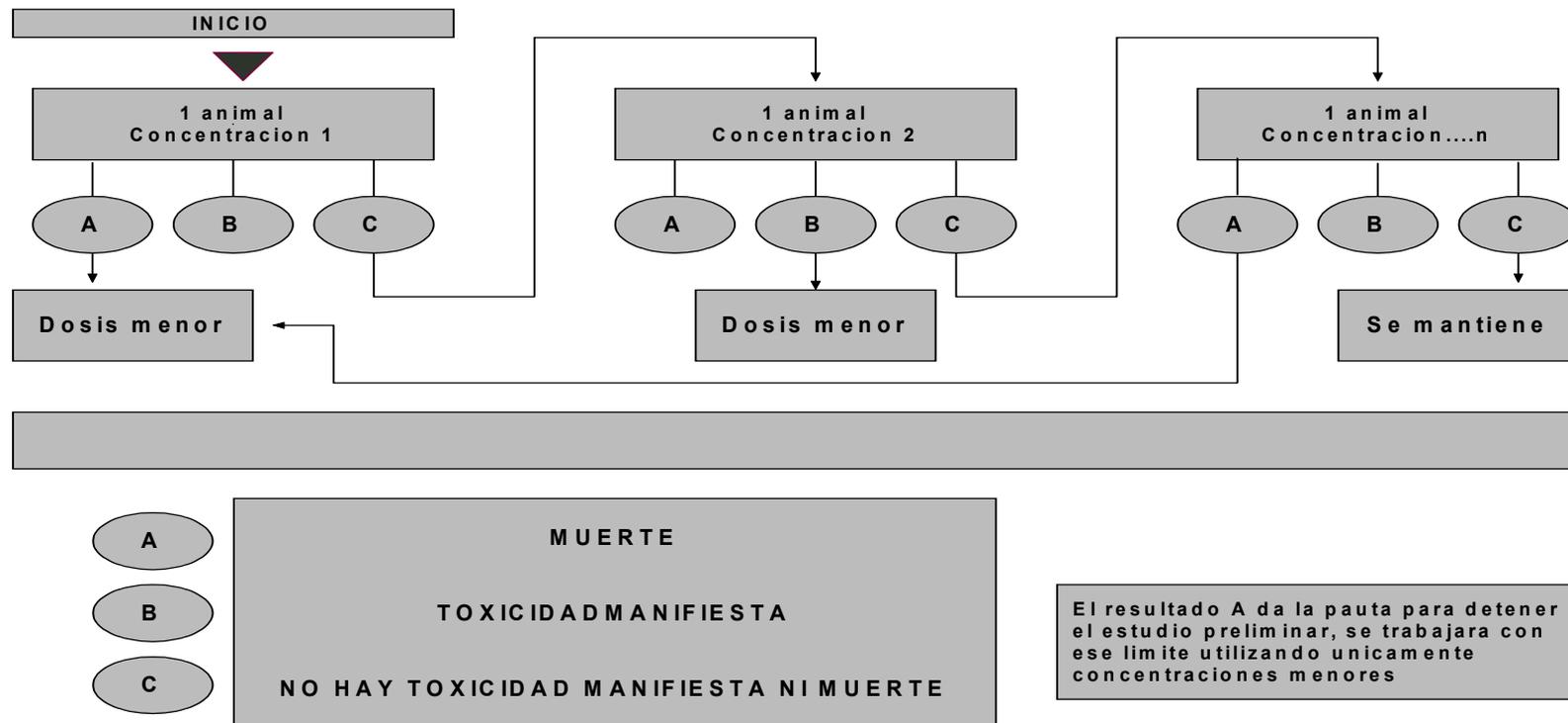
## Anexo 1

Esquema representativa del diseño experimental del estudio toxicológico de *Chenopodium ambrosioides*.



## Anexo 2

### Diagrama del estudio preliminar.



Fuente OECD, 2001

### Anexo 3

#### Descripción de parámetros de toxicidad en animales de experimentación.

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

Fuente: Laboratorio de Ensayos Biológicos UCR

## Anexo 4

### Hoja de registro de parámetros de toxicidad.

Numero de Ratón \_\_\_\_\_ Concentración \_\_\_\_\_ Sexo \_\_\_\_\_

Signo clínico	Días																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Ataxia																														
Parálisis																														
Reacción a estímulos																														
Vasoconstricción periférica																														
Vasodilatación periférica																														
Piloereccion																														
Salivación																														
Actividad motora																														
Tremores y convulsiones																														
Respiración anómala																														
Deshidratación																														
Diarrea																														
Apariencia de pelo																														
Apariencia piel																														
Ojos membrana y mucosa																														

**\*Criterios de evaluación**

**Ausente = 0**

**Leve = 1**

**Moderado = 2**

**Grave = 3**

**Muy Grave = 4**

## Anexo 5

### Valores de referencia hematológicos\*

ESPECIES	Glóbulos rojos X 10 <sup>12</sup> /L	Hb g/L	PCV L/L	Plaquetas sanguíneas X 10 <sup>9</sup> /L	Glóbulos blancos X 10 <sup>9</sup> /L	Neutrófilos 10 <sup>9</sup> /L	Linfocitos 10 <sup>9</sup> /L	Volumen sanguíneo. (ml/kg)
GATO	7.5 5.0-10.0	120 80-150	0.37 0.24-0.45	190-400	12.5 5.5-19.5	7.5 2.5-12.5	4.0 1.5-7.0	66.7 45-75
GANADO BOVINO	7.0 5.0-10.0	110 80-150	0.35 0.24-0.46	220-640	8.0 4.0-12.0	2.0 0.6-4.0	4.5 2.5-7.5	57 55-60
PERRO	6.8 5.5-8.5	150 132-193	0.45 0.38-0.57	145-440	11.5 6.0-17.0	7.0 3.9-12.0	2.8 1.0-4.8	83-101
COBAYO	5.2 4.8-5.9	110-140	0.43 0.37-0.46	450-630	3.8-13.5	2.6 2.0-3.1	6.4-7.5	65-90
HÁMSTER	7.5 5.0-9.2	168 146-200	0.5 0.46-0.52	300-570	7.6 5.0-10.0	1.5-3.5	6.1-7.0	65-80
CABALLO	9.0 6.8-12.9	144 111-190	0.41 0.32-0.53	80-397	9.0 5.4-14.3	4.7 2.3-8.6	3.9 1.7-6.8	72 75-100
RATÓN	9.1 7.9-10.1	110-145	0.37-0.46	600-1200	5.0-13.7	0.4-2.7	7.1-9.5	70-80

\* Los valores normales pueden variar con la edad, el sexo, la raza y las funciones de los animales.

Fuente CCAC, 1998

## Anexo 6

### Valores de referencia de bioquímica clínica.

ESPECIES	Glucosa mmol/L	Urea mmol/L	Colesterol Total mmol/L	Proteína			Amino- transferasa Aspartato (AST, SGOT) U/L	Amino- transferasa Alanina (ALT, SGPT) U/L	Fosfatasa Alcalina U/L
				Total g/L	Albúmina g/L	Globulina g/L			
PERRO	3.61-6.55 (5.05±0.67)	7.14-19.99 (12.14±2.86)	3.50-6.99 (4.61±0.98)	54-71 (61±5)	26-33 (29±2)	27-44 (34±5)	23-66 (33±12)	21-102 (47±26)	20-156 (66±36)
COBAYO Hartley (500-800g)	4.94-5.29 (5.12)	15.35-17.99 (16.67)	-	48-56 (52)	24-27 (25)	-	46-48 (47)	38-45 (41)	66-74 (70)
HAMSTER Siriano (100g)	3.61-4.07 (3.84)	14.85-21.49 (18.33±3.08)	4.71-6.13 (5.42)	64-73 (67±5)	32-37 (35±2)	-	53-124 (79±32)	21-50 (35±11)	8-18 (13±5)
CABALLO	4.16-6.39 (5.30±0.47)	7.14-17.14	1.94-3.89 (2.88±0.04)	52-79 (63±6)	26-37 (31±3)	26-40 (33±7)	226-366 (296±70)	3-23 (14±11)	143-395 (244±101)
RATON CD-1 (CrI:CD- 1(ICR)BR)	9.71-18.60 (15.00)	12.14-20.59 (16.07)	1.27-2.48 (1.89)	42-60 (51)	21-34 (28)	18-82 (22)	55-251 (139)	28-184 (95)	28-94 (67)
CF-1 (CrI:CF- 1BR)	9.10-20.48 (14.46)	8.57-19.99 (14.99)	2.72-4.16 (3.49)	54-65 (60)	30-40 (35)	18-31 (24)	30-314 (177)	76-208 (143)	67-303 (167)

Fuente CCAC, 1999

## Anexo 7

### Hoja de datos de necropsia.

# identificación \_\_\_\_\_

Fecha de colección \_\_\_\_\_ de necropsia \_\_\_\_\_

Historia \_\_\_\_\_

SEX M \_\_\_ H \_\_\_ EDAD \_\_\_ Peso (g) \_\_\_\_\_

CONDICION CORPORAL: Buena \_\_\_\_\_ regular \_\_\_\_\_ mala \_\_\_\_\_

ORGANOS	superficie	consistencia	color	tamaño	peso
		lisa, áspera, granular, arrugada	firme, quebradizo, esponjoso	Homogéneo/manchado, rojo, negro, café, morado, bronceado, amarillo(H,C), rosado, gris(P)	
Hígado					
Corazón					
Pulmones					
Bazo					
Riñón					
Estomago					
Páncreas					
Intestino delgado					
Intestino grueso					