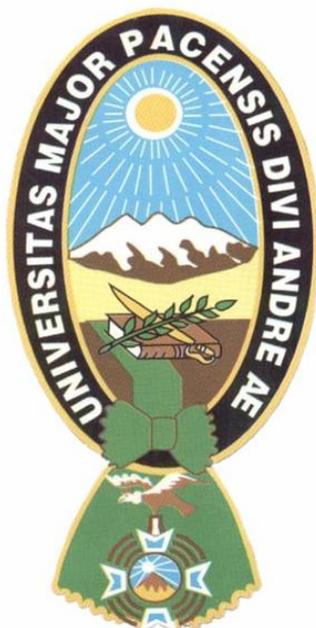


UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS

**MAESTRIA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUIMICAS
AREA FARMACOLOGÍA**



**TOXICIDAD DEL EXTRACTO DE ALCALOIDES TOTALES
DE LA *Galipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta) EN FASE PRECLÍNICA**

Elaborado por: Vania Cecilia Herrera Choque

Asesor: Alberto Giménez Turba Ph.D.

**Tesis de grado para optar al título de Magíster Scientiarum
Mención Biología de Poblaciones**

LA PAZ- BOLIVIA

2008



Tesis de grado
Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas

Toxicidad del extracto de alcaloides totales
de la *Galipea longiflora* Krause Kallunki (Evanta) en fase preclínica

Investigación realizada dentro del proyecto “Enfermedades infecciosas”, bajo el convenio de la cooperación sueca, desarrollado en el Área de farmacología del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas.

Asesor: Alberto Giménez Turba Ph.D.

Autora: Vania Cecilia Herrera Choque

Octubre 2008

DEDICATORIA

A Dios, por guiar cada paso de mi vida

A mi mamá, Juana por su incondicional apoyo

A mi hermana, Ana Gabriela por su apoyo y colaboración

“Toda investigación científica es una búsqueda de Dios y de la eternidad”

Stanley Kubrick

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia de Cooperación Francesa “Institut de Recherche pour le Développement” por otorgarme la beca en la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas.

A la Agencia Internacional de Cooperación de Suecia, por el apoyo en el programa UMSA-ASDI-SAREC.

Al CIPTA por el permiso de colecta de especies medicinales Tacana, sin las cuales no habría sido posible el desarrollo de este trabajo.

A la UMSA por el apoyo a las investigaciones de Farmacopeas Tradicionales

A mi asesor Alberto Giménez PhD, por su dedicación, paciencia, confianza y por su valiosa guía en el complejo campo de la investigación.

Al Dr. Trujillo y al personal del Laboratorio de Patología del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés.

A la Dra. Teresa Álvarez, por su guía en la parte estadística.

A la Dra. Grace Ruiz y al Dr. Juan A. Ávila por su colaboración en la parte experimental de este trabajo.

A la Dra. María L. Daza de la Cátedra de control de medicamentos por su guía en la parte de validación.

Al Dr. Eduardo Gonzales por facilitarme bibliografía.

A mis compañeros de la maestría Marina Guarachi, Juan Carlos Ticona, Efraín Salamanca, Erika Córdoba, Álvaro Bonsak, Hugo Cavero, Luís Apaza y Juan Calle†, por su apoyo y por los inolvidables momentos que compartimos.

INDICE

ABREVIATURAS	I
RESUMEN	II
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	III

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

<i>Galipea longiflora</i>	19
1.1 USOS TRADICIONALES Y ACCION FARMACOLÓGICA.....	20
1.2 EXTRACCIÓN DE ALCALOIDES TOTALES DE LA <i>Galipea longiflora</i> (CAT).....	21
1.3 INVESTIGACIÓN Y DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS.....	22
1.4 VALIDACIÓN DE LOS MÉTODOS ANALÍTICOS.....	23
1.4.1 EXACTITUD.....	23
1.4.2 PRECISIÓN.....	24
1.4.3 LINEALIDAD.....	24
1.4.4 LIMITE DE DETECCIÓN.....	25
1.4.5 LIMITE DE CUANTIFICACION	25
1.4.6 ROBUSTEZ.....	25
1.5 ESTUDIOS EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	25
1.6 TOXICIDAD ORAL AGUDA.....	26
1.7 TOXICIDAD POR ADMINISTRACIÓN CONTINUA DURANTE 28 DÍAS Y TOXICIDAD SUBCRÓNICA.....	27
1.8 TOXICOCINETICA.....	28

CAPITULO II

METODOLOGÍA

2.1 VALIDACIÓN DEL METODO CUALI-CUANTITATIVO DE CAT.....	32
2.2 PREPARACIÓN DE CAT.....	35
2.3 FORMULACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE CAT.....	36
2.4 POSOLOGIA.....	36
2.5 PREPARACIÓN DE LA ESPECIE ANIMAL.....	36

2.6 CONDICIONES DEL AMBIENTE Y ALIMENTACIÓN.....	37
2.7 TOXICIDAD ORAL AGUDA.....	37
2.7.1 ESTUDIO PRINCIPAL.....	38
2.8 TOXICIDAD ORAL A DOSIS CONTINUA DURANTE 28 DÍAS.....	38
2.9 TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA A DOSIS CONTINUA DURANTE 90 DIAS.....	39
2.10 EVALUACIÓN DE LA NEUROTOXICIDAD.....	40
2.10.1 PRUEBA DEL ALAMBRE "HANGING WIRE TEST"	40
2.10.2 PRUEBA DEL TUBO "CHIMNEY TEST"	41
2.10.3 ENSAYO DE CAMPO ABIERTO CON AGUJEROS "HOLE BOARD TEST"	41
2.11 HISTOPATOLOGÍA.....	42
2.12 TOXICOCINETICA.....	44
2.13 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	45

CAPÍTULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO CUALI-CUANTITATIVO DE CAT POR ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS.....	47
3.2 TOXICIDAD AGUDA.....	52
Piloerección.....	53
Distensión abdominal.....	54
3.3 TOXICIDAD A DOSIS CONTINUA DURANTE 28 DÍAS.....	55
3.4 TOXICIDAD ORAL SUBCRÓNICA A DOSIS CONTINUA DURANTE 90 DÍAS.....	56
3.5 EFECTOS DE LA TOXICIDAD SUBCRÓNICA.....	57
Consumo de alimentos.....	57
Consumo de agua	58
3.6 NEUROTOXICIDAD.....	59
Prueba de caída del alambre "hanging wire test"	59
Prueba de la chimenea "chimney test"	61
Prueba decampo abierto con agujeros "holeboard test"	63

3.7 PESO CORPORAL.....	64
3.8 ESTUDIO DE ÓRGANOS.....	68
3.9 HISTOPATOLOGIA.....	73
3.10 TOXICOCINÉTICA.....	77

CAPITULO IV

CONCLUSIONES	79
RECOMENDACIONES	81
V. BIBLIOGRAFIA.....	82
VI. ANEXOS	

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1	Desarrollo de un nuevo fármaco.....	22
Figura 2.1	Estudio preliminar de toxicidad aguda de CAT.....	37
Figura 2.2	Estudio principal de toxicidad aguda de CAT.....	38
Figura 2.3	Proceso de fijación, deshidratación y aclaramiento de los tejidos.....	42
Figura 2.4	Tinción de los tejidos.....	43
Figura 3.1	Relación lineal entre la absorbancia y la concentración de CAT.....	48
Figura 3.2	Influencia del pH en la determinación de CAT.....	50
Figura 3.3	Influencia de la luz UV en la determinación de CAT.....	51
Figura 3.4	Influencia de la temperatura en la determinación de CAT.....	51
Figura 3.5	Porcentaje de ratones machos y hembras con piloerección motora..	54
Figura 3.6	Porcentaje de ratones machos y hembras con distensión abdominal.	55
Figura 3.7	Media del consumo de alimentos en ratones hembras y machos expuestos a CAT durante 18 semanas	58
Figura 3.8	Media del consumo de agua en ratones hembras y machos expuestos a CAT durante 18 semanas.....	59
Figura 3.9	Prueba de caída del alambre en ratones hembras y machos expuestos al CAT por 28 días.....	60
Figura 3.10	Prueba de caída del alambre en ratones hembras y machos expuestos al CAT por 90 días.....	60
Figura 3.11	Prueba de la chimenea en ratones hembras y machos expuestos al CAT por 28 días	62
Figura 3.12	Prueba de la chimenea en ratones hembras y machos expuestos al CAT por 90 días.....	62
Figura 3.13	Prueba de hole board en ratones expuestos al CAT por 28 días.....	64
Figura 3.14	Peso de ratones hembras (toxicidad aguda).....	65
Figura 3.15	Peso de ratones machos (toxicidad aguda).....	65
Figura 3.16	Peso de ratones hembras (toxicidad a dosis continua por 28 días).....	66
Figura 3.17	Peso de ratones machos (toxicidad a dosis continua por 28 días).....	66
Figura 3.18	Peso de ratonas hembras (toxicidad a dosis continua por 90 días).....	67
Figura 3.19	Peso de ratones machos (toxicidad a dosis continua por 90 días).....	67
Figura 3.20	Peso de los órganos de ratones hembras (toxicidad aguda).....	69
Figura 3.21	Peso de los órganos de ratones machos (toxicidad aguda).....	69
Figura 3.22	Peso de riñones de ratones machos inoculados con CAT (5g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=3) (toxicidad aguda.....	70
Figura 3.23	Peso de los órganos de ratones hembras (toxicidad a dosis continua por 28 días).....	70
Figura 3.24	Peso de los órganos de ratones machos (toxicidad a dosis continua por 28 días).....	71
Figura 3.25	Peso de riñones de ratones machos inoculados con CAT (toxicidad a dosis continua por 28 días).....	71

Figura 3.26 Peso de los órganos de ratones hembras (toxicidad subcrónica a dosis continua por 90 días).....	72
Figura 3.27 Peso de los órganos de ratones machos (toxicidad subcrónica a dosis continua por 90 días).....	72
Figura 3.28 Tejido de riñón de ratón control, tejido de riñón de ratón expuesto a CAT (toxicidad aguda), tejido de riñón ratón expuesto a CAT (toxicidad a dosis continua por 28 días), tejido de riñón de ratón expuesto a CAT (toxicidad subcrónica a dosis continua por 90 días).....	75
Figura 3.29 Tejido de riñón de ratón control y de riñón de ratón expuesto a CAT por 90 días.....	76
Figura 3.30 Tejido de hígado de ratón control y de ratón expuesto a CAT por 90 días.....	76
Figura 3.31 Media de la concentración en plasma vs tiempo posterior a la administración v.o. de 5g/Kg a ratones.....	77
Figura 3.32 Media de la concentración en plasma vs tiempo, posterior a la administración v.o. de 1g/Kg a conejos.....	78

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Diluciones de CAT en HCl 1N a partir de la solución madre.....	32
Tabla 3.1 Regresión lineal del método espectrofotométrico para la determinación de CAT.....	47
Tabla 3.2 Exactitud del método de espectrofotometría UV para la determinación de CAT.....	48
Tabla 3.3 Precisión intermedia del método espectrofotométrico para la determinación de CAT.....	49
Tabla 3.4 Repetibilidad del método espectrofotométrico para la determinación de CAT	49
Tabla 3.5 Efecto letal de la dosis única de CAT a diferentes niveles de dosis administrados v.o. en ratones.....	52
Tabla 3.6 Piloerección en el cuello y en todo el cuerpo en ratones expuestos a dosis única de CAT a diferentes niveles administrados por v.o. en ratones.....	53
Tabla 3.7 Efecto letal en ratones expuestos a 5g/Kg de CAT por 28 días.....	56
Tabla 3.8 Efecto letal en ratones expuestos a 5g/Kg de CAT por 90 días.....	57
Tabla 3.9 Estudio histopatológico de los órganos de ratones expuestos a CAT.....	74
Tabla 3.10 Concentración de alcaloides a diferentes días después de la administración de CAT por 90 días.....	77
Tabla 3.11 Parámetros toxicocinéticos en ratones inoculados con 5g/Kg (100mg) de CAT.....	78
Tabla 3.12 Parámetros toxicocinéticos en conejos inoculados con 1g/Kg (3g) de CAT.....	79

ANEXOS

ANEXO I

1. Ficha de observación para cada animal
2. Prueba de caída del alambre en ratones
3. Prueba de la chimenea en ratones
4. Ensayo de campo abierto con agujeros en ratones "Hole board"

ANEXO II

1. Valores de absorbancia a distintas concentraciones de CAT aplicadas al cálculo de linealidad.
2. Valores de absorbancia a distintas concentraciones de CAT.
3. Valores de concentración de CAT a partir de los datos de absorbancias para el cálculo de precisión.
4. Valores de concentración de CAT a partir de los datos de absorbancias para el cálculo de repetibilidad
5. Límites de cuantificación y detección a diferentes concentraciones de CAT en HCl 1N.
6. Absorbancias de distintas diluciones de CAT a distintas concentraciones de HCl 1N.
7. Absorbancias de distintas diluciones de CAT en HCl 1N expuestos a diferentes tiempos de exposición
8. Absorbancias de distintas diluciones de CAT en HCl 1N expuestos a diferentes temperaturas.

ANEXO III

1. Pesos de los órganos dosis única a tres niveles de CAT
2. Peso de ratones expuestos 28 días a dosis repetida v.o. 5g/Kg de CAT
3. Peso de los órganos de los animales en el estudio de dosis continua durante 28 días
4. Peso de los órganos de hembras y machos en el estudio durante 90 días

ANEXO IV

1. Valores de las absorbancias de las muestras de suero de ratones expuestos v.o. a 5g/Kg de CAT para el cálculo de los parámetros toxicocinéticos.
2. Valores de las absorbancias de las muestras de suero de conejos expuestos v.o. a 1g/Kg de CAT para el cálculo de los parámetros toxicocinéticos.

ABREVIATURAS

Abs, absorbancia
AUC, área bajo la curva
b, pendiente
CAT, Extracto de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora*
cm, centímetros
C_{max}, Concentración máxima
C_{min}, Concentración mínima
°C, grados Celsius
C.V., Coeficiente de variación
CLV, cromatografía líquida al vacío
r², coeficiente de determinación
r, coeficiente de correlación
D.S., Desviación estándar
CH₂Cl₂, diclorometano
DL₅₀, Dosis Letal media
ER, Error relativo
FDA, Food and drug administration
g, gramos
h, hora
HCl, ácido clorhídrico
ICH, International Conference on Harmonization
NaOH, hidróxido de sodio
KOH, Hidróxido de potasio
Kg, Kilogramos
Ka, Constante de absorción
Ke, Constante de eliminación
LD, Límite de detección
LC, Límite de cuantificación
µg, microgramos
min, minutos
mg, miligramos
MTD, Dosis máxima tolerada
MLD, Dosis letal mínima
mL, mililitros
m.s.n.m., metros sobre el nivel del mar
mm, milímetros
nm, nanometros
N, Normal
NOAEL, Nivel de dosis sin efectos adversos observados
OECD, Organisation for Economic Cooperation and Development
pH, potencia de hidrogeniones
%, por ciento
p.c., peso corporal
p/v, peso /volumen
rpm, revoluciones por minuto

RMN, Resonancia Magnética Nuclear
SAM, Sistema Armonizado Mundial
Na₂SO₄, Sulfato de sodio
t_{1/2}, vida media
TLC - MS, cromatografía en capa delgada
USP, United States Pharmacopeia
UV-vis, Ultravioleta - visible
v.o. vía oral

RESUMEN

La importancia de contar con estudios preclínicos de los alcaloides totales de *Galipea longiflora* (CAT) es fundamental para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas contra la leishmaniasis. Nuestros resultados de validación del método analítico cuali-cuantitativo de CAT por espectrofotometría UV-Vis entre 330-335nm presentan exactitud y precisión para su cuantificación entre 1,72-7,81µg/mL y son detectables entre 0,567-7,81µg/mL con un intervalo de linealidad entre 0,244–7,81µg/mL, las absorbancias no variaron por aumento de temperatura ni exposición a luz UV pero sí a 0,244µg/mL y por efecto del pH. La toxicidad aguda de CAT en ratones Swis albinos por administración única v.o. de 1,5; 5 y 10g/Kg muestran 0% de mortalidad resultado que sobrepasa los intervalos de clasificación SAM, por lo tanto se considera al CAT como sustancia no tóxica con un $DL_{50} > 10g/Kg$, NOAEL de 10g/Kg, MTD de 10g/Kg y $MLD > 10g/Kg$, las observaciones clínicas revelan distensión abdominal y piloerección. La sobrevivencia a dosis continua por 28 días fue de 100% y la de toxicidad subcrónica por 90 días fue de 92% con disminución en el consumo de agua y alimentos. El peso corporal total se mantuvo constante en ambos sexos excepto en machos expuestos por 90 días con un incremento significativo las últimas semanas del ensayo. La concentración acumulada por 90 días fue de 1,276µg/mL 24h posteriores a la última administración y se mantuvo constante aún después de 11 días. La autopsia reveló neumatosis gastrointestinal y vasos mesentéricos dilatados, aumento significativo en el peso de los riñones de machos expuestos a dosis única de 5g/kg y continua por 28 días como también en intestinos de machos expuestos a dosis continua de 5g/Kg por 90 días. El examen histopatológico revela congestión a nivel glomerular y degeneración vacuolar renal a dosis única de 10g/Kg y continua por 28 días a 5g/Kg además congestión venocentrolobulillar y necrosis hepatocelular en machos expuestos diariamente 90 días a 5g/Kg. En el estudio de toxicocinética en ratones se obtuvo $C_{max}=2,54\mu g/mL$ a las 9h, $AUC_{0-\infty}$ de 22,505µg h/mL y $t_{1/2}$ de 10,46h posteriores a la administración v.o. de 5g/Kg. En modelos conejos se obtuvo $C_{max}=3,7\mu g/mL$ de CAT a las 5h, $AUC_{0-\infty}$ de 28,9µg h/mL y $t_{1/2}$ de 8,2h posteriores a la administración de 1g/Kg.

SUMMARY

The importance of having preclinical studies of the total alkaloids of *Galipea longiflora* (CAT) is fundamental for the development of new therapeutic alternatives against the leishmaniasis. Our results of quali-quantitative validation for the analytic method of CAT by UV-vis spectrophotometry between 330-335nm present accuracy and precision for their quantification among 1,72-7,81 μ g/mL and they are detectables between 0,567-7,81 μ g/mL with a linearity interval between 0,244-7,81 μ g/mL, the absorbances did not vary for increase of temperature neither exhibition to UV light, but is possible to 0,244 μ g/mL and for pH effect. The sharp toxicity of CAT in albino Swis mice for one administration o.w. of 1,5; 5 and 10g/Kg shows 0% of mortality that surpasses the intervals of classification SAM, therefore it is considered to the CAT like non toxic substance with a DL50>10g/Kg, NOAEL 10g/Kg, MTD 10g/Kg and MLD>10g/Kg, the clinical observations reveal abdominal distension and hair erection. The survival to dose continue by 28 days was of 100% and the sub cronical toxicity for 90 days was of 92% with decrease in the consumption of water and food. The total corporal weight stayed constant in both sexes except in males exposed by 90 days with a significant increment the last weeks of the rehearsal. The concentration accumulated by 90 days was of 1,276 μ g/mL 24h later to the last administration stayed constant after 11 days. The autopsy revealed gastrointestinal pneumotosis and vessel mesenteric dilatated, significant increase in the weight of the kidneys of exposed males to unique dose of 5g/kg and continued by 28 days as well as in bowels of exposed males to continuous dose of 5g/Kg for 90 days. The histopathologic exam reveals congestion to glomerular level and renal vacuolar degeneration to unique dose of 10g/Kg and continued for 28 days at 5g/Kg, furthermore, congestion venocentrolobulillar and hepatocellular necrosis in exposed males daily 90 days at 5g/Kg. In the toxicokinetic study in mice C_{max} =2,54 μ g/mL was obtained at the 9h, $AUC_{0-\infty}$ of 22,505 μ g h/mL and later $t_{1/2}$ of 10,46h to the administration o.w. of 5g/Kg. In rabbits C_{max} =3,7 μ g/mL was obtained from CAT to the 5h, $AUC_{0-\infty}$ of 28,9 μ g h/mL and later $t_{1/2}$ of 8,2h to the administration of 1g/Kg.

HIPOTESIS

El desarrollo del perfil toxicológico del extracto de alcaloides totales de la corteza de *Galipea longiflora*, permitirá determinar el grado de toxicidad y calcular regímenes posológicos dentro de márgenes de seguridad para desarrollar estudios en fase clínica.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el perfil toxicológico del extracto de alcaloides totales de la corteza de *Galipea longiflora*, Evanta, (CAT) por vía oral en modelos animales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar el método analítico para la cuali-cuantificación del CAT por espectrofotometría UV-Vis.
- Determinar los parámetros de toxicidad aguda, DL₅₀, NOAEL, MTD, MLD por dosis oral única de CAT en ratones.
- Determinar la mortalidad en el estudio de toxicidad a dosis oral continua por 28 días a 5g/Kg de CAT.
- Determinar la mortalidad en el estudio de toxicidad subcrónica por 90 días a 5g/Kg y cuantificar la concentración acumulada de CAT en el suero de ratón.
- Describir la alteración de los parámetros clínicos en modelo murino durante 16 días posteriores a la administración única de 1,5; 5; 10g/Kg y continua de 5g/Kg de CAT durante 28 días y 90 días (18 semanas).
- Determinar las alteraciones neurológicas en ratones por exposición oral continua a 5g/Kg de CAT durante 28 y 90 días.
- Describir las alteraciones de las características macroscópicas e histopatológicas de riñones, estómago, hígado, cerebro, bazo e intestino en ratones expuestos a dosis oral única (1,5;5 y 10g/Kg) y a dosis oral continua (5g/Kg) por 28 y 90 días.
- Determinar los parámetros toxicocinéticos en modelos murinos y en conejos a 5g/Kg y 1g/Kg de CAT respectivamente.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

En la antigüedad el uso de plantas para el tratamiento de enfermedades no era desconocido, las hierbas y productos naturales de la medicina tradicional han sido usados por el hombre desde la existencia de la humanidad. Sin embargo, sólo recientemente, científicos y profesionales en medicina mostraron mayor interés en este campo al reconocer sus beneficios para la salud, es así que la farmacología y la toxicidad de estas plantas atrae la atención de investigadores para la comprobación de su beneficio farmacológico y su probable riesgo durante su uso. La medicina tradicional en diferentes culturas tiene una larga historia de ancestros creando medicinas primitivas, durante su lucha contra las enfermedades mientras buscaban sus alimentos encontraron en algunas de estas especies propiedades específicas para eliminar ciertos males, mitigar dolencias y mantener una buena salud.

En la actualidad entre las enfermedades de mayor importancia epidemiológica en el mundo se encuentran las parasitosis, una de ellas es la leishmaniasis. Según la Organización Mundial de la Salud, se estima que ocurren cada año 2 millones de casos nuevos en todo el mundo de los cuales 1,5 millones es leishmaniasis cutánea¹. En Bolivia aproximadamente 800.000 individuos se encuentran en alto riesgo de infectarse con parásitos de *Leishmania* en 7 de 9 departamentos. Los tratamientos comúnmente empleados contra la leishmaniasis (cutánea, mucocutánea y visceral) incluyen los derivados pentavalentes de antimonio, glucantime y pentosan, ketoconazol y algunos derivados imidazólicos, anfotericina B, sulfato de aminosidina y pentamidina². Estos medicamentos provocan efectos secundarios considerables y un elevado costo, factores que generan incumplimiento en el tratamiento provocando en algunos casos resistencia, todo esto dificulta el éxito de las estrategias terapéuticas. Sin embargo existe en nuestro entorno alternativas de tratamiento como la especie vegetal *Galipea longiflora* Krause (sinónimo *Angostura longiflora* (Krause) (Kallunki) de la amazonía boliviana, se la encuentra en los bosques tropicales, en bosques húmedos de la llanura y montaña a (350-600) m.s.n.m. en los departamentos de Beni, Ballivián, Misión Fátima; y La Paz, Sud Yungas, Alto Beni, Popo y antes de llegar a la concesión de la cooperativa San José, tiene diversos

nombres comunes pero es conocida ampliamente por el nombre vernacular de Evanta y su nombre mosetene Ji'pamtyae. Es un árbol de hasta 12 metros de altura, presenta hojas trifoliadas alternas o superpuestas sobre la misma rama con un pecíolo frecuentemente alado, sus flores aparecen en forma de racimos o panículos zigomorfos más o menos vistosas. Pertenece al orden Sapindales, a la familia Rutaceae y al género *Galipea*, que cuenta con unas cuarenta especies distribuidas desde Guatemala, Cuba, Costa Rica, Nicaragua³ hasta Bolivia y el sur del Brasil, la especie *longiflora* Krause ha sido seleccionada de entre más de 800 extractos que fueron evaluados por su actividad antiparasitaria *in vitro* en la última década.

1.1 Usos tradicionales y acción farmacológica

Esta especie posee un soporte empírico etnofarmacológico provisto por las etnias Tsimane, Tacana y Mosetene al ser utilizada como antiparasitario⁴, específicamente contra la leishmaniasis cutánea⁵, actividad que fue comprobada científicamente^{6, 7}. Tradicionalmente, para el tratamiento de la leishmaniasis, la corteza fresca o seca es molida y aplicada directamente como cataplasma sobre las úlceras, además de beber infusiones durante tres días⁴. También se la utiliza como antiemético, vermífugo y amebicida, el uso más frecuente es en forma de cocción en el tratamiento de diarreas causadas por parásitos intestinales y como fortificante para niños y adultos⁴.

Desde el año 1985 hasta la fecha, se vienen realizando trabajos de investigación que confirman la actividad antiparasitaria (leishmanicida), de los extractos de la *Galipea longiflora*^{6, 7} de la cual se obtuvieron 12 alcaloides quinolínicos de las hojas, raíces y corteza de tronco, que fueron aislados e identificados^{5, 8, 9}. Algunos de los principios activos aislados de las hojas resultaron ser nuevas estructuras y debido a la eficacia demostrada¹⁰ y la baja toxicidad determinada en modelos *in vivo*^{7, 8, 11}, fueron patentados como Chimaninas A, B, C, D, US4209519/15/04/93.

Actualmente se están desarrollando formulaciones, para lo cual es indispensable el conocimiento de la toxicidad de los alcaloides totales, en fase preclínica, que permitirá clasificar a la sustancia de acuerdo a su toxicidad y establecer el rango de dosis más alto letal en las especies animales en estudio que posteriormente permitirá desarrollar los estudios en fase clínica con cierto rango de seguridad para la administración del compuesto a seres humanos.

Sobre la base de los antecedentes descritos ahora se pretende conocer la toxicidad de los alcaloides totales administrados por vía oral a dos especies, conejos y ratones.

1.2 Extracción de alcaloides totales de la *Galipea longiflora* (CAT)

En los laboratorios del IIFB-UMSA y el Departamento de Biotecnología de la Universidad de Lund en Suecia, los grupos de investigación de Giménez *et al.*, (2005) realizaron mediante cromatografía líquida al vacío (CLV), cromatografía en capa delgada (TLC - MS) y RMN de ^1H y ^{13}C (1 y 2D) el aislamiento y purificación de los alcaloides totales biológicamente activos, donde la 2-fenil-quinolina representa el 51%¹². Para la obtención de los alcaloides totales se realizó el método por extracción continua en equipos soxhlet, tanto de la corteza como de las hojas molidas extraídas con CH_2Cl_2 por 2,5h. Los extractos obtenidos por rotaevaporación fueron secados con bomba de alto vacío, hasta peso constante. La maceración se realizó con el vegetal seco y finamente molido por el lapso de tres días en CH_2Cl_2 en percoladores de acero inoxidable. El extracto fue filtrado, concentrado a 40°C y secado con una bomba de alto vacío hasta peso constante. Finalmente para la obtención de los alcaloides totales, el extracto crudo fue disuelto en CH_2Cl_2 y sometido a lavados sucesivos con HCl 1N, estos lavados ácidos fueron controlados por un espectrofotómetro UV, luego fueron combinados y llevados a precipitación completa con NaOH 2N. El sólido formado fue extraído con CH_2Cl_2 . La solución orgánica fue deshidratada con Na_2SO_4 , filtrada, evaporada al vacío y secada con una bomba de alto vacío hasta peso constante¹².

1.3 Investigación y desarrollo de nuevos fármacos

El proceso de desarrollo de un nuevo fármaco se fundamenta en los principios básicos de una fase preclínica denominada también fase 0¹³, que consiste en la ejecución de ensayos en modelos experimentales, principalmente animales de laboratorio, con el objetivo de obtener información farmacológica y toxicológica suficiente que se rige por normas regulatorias¹⁴ para el paso a la siguiente fase (fase clínica, realizada en seres humanos) con cierto margen de seguridad y sin que los riesgos excedan los beneficios.

Figura 1.1 Desarrollo de un Nuevo Fármaco

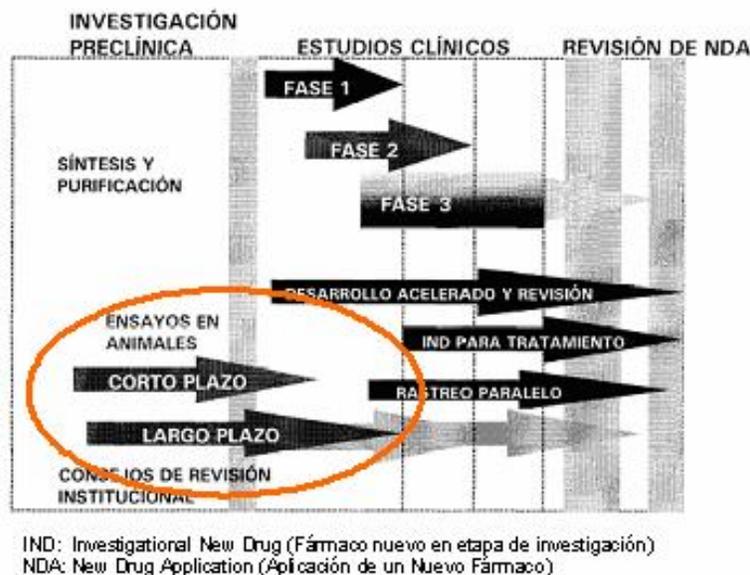


Figura extraída del manual de la FDA.¹⁴

Como lo mencionamos anteriormente, una de estas fases es el estudio de toxicidad que permite determinar la cantidad de fármaco (alcaloides totales) tóxico o letal en los animales sometidos al estudio, cuando son expuestos a la sustancia una sola vez y múltiples veces por vía oral. Por otra parte, el estudio de la toxicocinética permite desarrollar pautas de los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción que sufre el fármaco¹⁴ en el organismo de los animales a los cuales se administre.

El estudio de toxicidad se centra en diferentes puntos entre los que se encuentra la toxicidad aguda, toxicidad subcrónica y toxicocinética¹⁵.

Es importante en estos ensayos la cuantificación de los metabolitos disponer de métodos analíticos cuantitativos convenientemente validados¹⁵, para la obtención de datos confiables y de esta manera alcanzar resultados exactos y precisos con alto grado de seguridad por medio de estudios de laboratorio y disponer de una evidencia documentada del procedimiento analítico aplicado a la cuantificación de los principios activos.

1.4 Validación de los métodos analíticos

Durante el desarrollo de un extracto estandarizado, consistente en una mezcla de sustancias relacionadas, es imprescindible la aplicación de un método analítico fiable que permita cuantificar el/los componentes mayoritarios, en el extracto total para la determinación de los parámetros toxicocinéticos^{16, 17}. En el estudio de los alcaloides, se ha determinado, por métodos espectroscópicos que mas del 90%¹² representa una mezcla de cinco alcaloides quinolínicos, entre los cuales la 2-fenilquinolina representa cerca del 50%¹². Las estructuras que contiene el esqueleto de la quinolina, presentan un excelente cromóforo para su cuantificación por métodos de absorción espectrofotométrica, en la región comprendida entre las longitudes de onda de λ 200 a 400 nm. Y en base a estos datos, se pueden determinar los parámetros de validación entre los que se encuentran, la precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y linealidad, según la categoría 1 para moléculas activas (USP XXVII), además de la robustez¹⁸.

1.4.1 Exactitud

Expresa el grado de proximidad de los resultados obtenidos, por el método, con los verdaderos valores¹⁸. Este parámetro permite cuantificar los errores sistemáticos de las lecturas realizadas, se expresa como porcentaje de recuperación o como diferencia entre el valor medio y el aceptado como verdadero, junto con los intervalos de confianza. Los documentos de la ICH (*International Conference on Harmonization*) recomiendan que la exactitud debe

ser evaluada usando un mínimo de nueve determinaciones sobre, al menos, tres niveles de concentración ^{16, 17}.

1.4.2 Precisión

Otro de los parámetros importantes es *la precisión*, que expresa el grado de concordancia entre los resultados de una prueba individual cuando el método es aplicado repetitivamente a múltiples lecturas de una muestra homogénea¹⁷. La precisión del método analítico es usualmente expresado como la desviación estándar o la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) de una serie de medidas. Esta puede ser una medida en términos de repetibilidad o de precisión intermedia dentro de condiciones normales de operación. La *repetibilidad* expresa la precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo. La *precisión intermedia*, que expresa la variación de las lecturas realizadas dentro del laboratorio, en diferentes días por diferentes analistas o equipos¹⁹.

1.4.3 Linealidad

Este parámetro permite expresar la capacidad del método analítico para dar resultados directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra¹⁸ encontrados mediante espectroscopia UV-Vis. Se determina por transformaciones matemáticas de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras con concentraciones crecientes del analito. Siguiendo la fórmula general de la recta se determina la concentración a partir del cociente entre, la diferencia de la absorbancia del intercepto y la pendiente, donde la pendiente indica la sensibilidad del método expresado en unidades de respuesta sobre unidades de concentración del extracto, cuanto mayor sea la pendiente mayor es la sensibilidad ²⁰, el intercepto se relaciona con la presencia de interferencia o errores sistemáticos y su intervalo de confianza debe incluir al cero para cumplir el requisito de proporcionalidad¹⁹ (como se exige para el cumplimiento de la ley de Lambert-Beer en los métodos espectrofotométricos). Además se determina el

coeficiente de correlación (r), el cual, para que el método se considere lineal, debe ser mayor que 0,999^{19, 20} y r^2 es el coeficiente de determinación que debe ser igual o mayor a 0,997^{19, 20}.

1.4.4 Límite de detección

Este parámetro permite encontrar la concentración más baja en una muestra que puede ser detectada por una única medición, pero no necesariamente cuantificada, dentro de las condiciones experimentales a las que esta expuesto, con un nivel de confianza determinado¹⁸.

1.4.5 Límite de cuantificación

A diferencia del límite de detección este parámetro permite medir la cantidad más pequeña en una muestra que puede ser cuantitativamente determinada con aceptable exactitud y precisión. Es un parámetro de análisis cuantitativo para niveles bajos de compuestos en la muestra¹⁸.

1.4.6 La robustez

Expresa la capacidad del método analítico (espectro-fotometría), para permanecer inalterado por ligeras pero deliberadas variaciones que son introducidas en los parámetros del método. Pone de manifiesto la influencia que tienen pequeñas variaciones experimentales sobre los resultados obtenidos y proporciona una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales¹⁸. Se determina introduciendo variaciones en el procedimiento y observando la respuesta.

1.5 Estudios en animales de experimentación

Para estos ensayos, se debe emplear el menor número posible de animales y asegurar que estos reciban un trato humanitario. Por lo general, en los experimentos se utilizan dos o más especies y existen diferentes vías de administración, entre las cuales se encuentra la administración oral que presenta diferentes ventajas como, una exposición sistémica y absorción gastrointestinal

buena ^{21, 22} y una dosificación más precisa en el tracto gastrointestinal ^{28, 21,22} , por medio de una sonda oral la cual evita los problemas de palatabilidad.

Otro de los aspectos de gran importancia es la determinación del volumen de fármaco a ser administrado, el cual no debe exceder de 100 μL ²² para minimizar la angustia o malestar en el animal y no producir cambios fisiológicos o patológicos que comprometan el experimento²³. Por lo tanto se inocula el menor volumen de adyuvante posible, en algunos protocolos no se toma en cuenta la especie sino una relación directa con el peso del animal, sin embargo ambos son coincidentes, el volumen considerado óptimo por vía oral es de 10 mL/Kg²².

1.6 Toxicidad oral aguda

Se refiere a los efectos nocivos que se manifiestan tras la administración oral de una dosis única de la sustancia o de dosis múltiples dadas a diferentes niveles probando en diferentes modelos y dentro de un periodo de 24 horas, su determinación se realiza de acuerdo a la cantidad de fármaco que representa una dosis letal en el animal de laboratorio. Sin embargo el presente trabajo sigue los métodos propuestos en la guía OECD²³, donde a diferencia de otros métodos que recurren a la muerte de los animales como parámetro éste se basa en la presencia de signos clínicos de toxicidad a un nivel determinado de una serie de dosis fijas, permitiendo de esta manera la utilización de menos animales y causando menos sufrimiento en los mismos ^{23, 24}. Un principio del método anteriormente mencionado es el empleo de dosis moderadamente tóxicas y evitar la administración de cantidades que se prevean letales²³.

El criterio más comúnmente empleado para definir la toxicidad aguda de un agente (fármaco) es la dosis efectiva 50 (DE₅₀) que expresa la cantidad de sustancia que en circunstancias bien precisas, produce efectos en el 50 % de una especie animal, por otro lado si el efecto buscado es la muerte, se habla de dosis letal 50 ó dosis letal media *DL*₅₀, que se refiere a la dosis única, obtenida por estadística, de una sustancia capaz de provocar la muerte de 50% de los animales a los que se haya administrado el agente por vía oral, sin embargo, puede

referirse a efectos, como vómitos, coma ó convulsiones, entre otros²⁵. El valor de la DL₅₀ se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal. Entre los efectos letales están la *muerte inminente*, que se refiere a la fase en la que se prevé que el animal muera o entre en la agonía antes del siguiente momento de observación²³, los signos que indican esta situación son, las convulsiones, posición lateral, posición yacente y temblores. La *muerte previsible*, se refiere a la presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido del futuro antes de la terminación prevista del experimento²⁶. La *muerte retardada*, significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas sino que muere más tarde durante el periodo de observación de 14 días²³. La *agonía*, se presenta cuando el animal está muriendo o es incapaz de sobrevivir aunque reciba tratamiento^{23, 26} y uno de los términos frecuentemente mencionado en este trabajo es la *dosis límite*, que se refiere a la dosis del límite máximo del ensayo (2 o 5g/Kg)²³. Entre los criterios que se toman en cuenta están, el MTD (Maximum Tolerated Dose) o también denominada *dosis tóxica mínima* que se refiere a la dosis más alta a la cual recuperan todos los efectos provocados por el fármaco²⁷ (el extracto de alcaloides de *G. Longiflora*) y los fenómenos de tolerancia y acumulación en los tejidos del animal, el MLD (Mínimum Letal Dose) que indica la dosis mas baja del fármaco que induce la primera muerte en los ratones²⁷, otro criterio importante a determinar es el NOAEL, que indica la dosis de exposición sin efectos adversos observados, es decir, la dosis más alta a la cual no se observa ningún efecto adverso debido al tratamiento²⁸.

1.7 Toxicidad por administración continua durante 28 días y toxicidad subcrónica

En la toxicidad subcrónica el fármaco o fármacos se administran por un periodo de uno a tres meses y aporta información acerca de los peligros que podrían presentarse para la salud a una exposición continua durante un período prolongado, de esta manera en el presente estudio se realizó un ensayo límite tanto en el estudio de toxicidad en 28 días como también en neurotoxicidad y toxicidad subcrónica durante 90 días ambos a 5g/Kg. Entre los términos

comúnmente empleados está la *posología*, que señala, la dosis administrada, su frecuencia y su duración²⁸.

El estudio de toxicidad subcrónica se realiza después de obtener resultados de toxicidad de ensayos más cortos como el de 28 días por administración continua²⁹ (subaguda) que incluye observaciones para detectar la posible neurotoxicidad y proporciona mayor información sobre los efectos neurotóxicos observados en los estudios de toxicidad sistémica por administración continua, este tipo de estudio toma en cuenta aspectos como, signos neurológicos o lesiones neuropatológicas, relación estructural entre la sustancia de estudio y neurotóxicos conocidos.

Antes, la neurotoxicidad se equiparaba a la neuropatía que implicaba lesiones neuropatológicas o disfuncionales neurológicas, como convulsiones, parálisis o temblores. Actualmente la neuropatía es una manifestación importante de la neurotoxicidad, sin embargo se sabe que existen muchos otros signos que indican toxicidad en el sistema nervioso como pérdida de coordinación motora, deficiencias sensoriales y disfunciones del aprendizaje y la memoria que pueden estar ausentes en estudios de neuropatía³⁰. En el método OECD TG 424, por el cual nos regiremos incluye todos estos aspectos.

1.8 Toxicocinética

Es el estudio cuantitativo de la concentración en animales de laboratorio y del perfil temporal de los xenobióticos durante los procesos de absorción, distribución, excreción y biotransformación de dichas sustancias, sus precursores y metabolitos³¹. La toxicocinética juega un papel muy importante en los estudios de toxicidad durante la etapa preclínica del desarrollo de los medicamentos y permite extrapolar los resultados obtenidos en una especie de animales de laboratorio a otro y de ellos a los seres humanos. Además y en combinación con los estudios farmacodinámicos, sirve para evaluar el riesgo del uso de posibles fármacos en humanos. Entre los criterios toxicocinéticos se encuentran, la *constante de absorción (Ka)* que expresa la probabilidad que tiene una molécula de absorberse

en la unidad de tiempo, *semivida de absorción* ($t_{1/2a}$), es el tiempo que tarda en reducirse a la mitad el número de moléculas que quedan por absorberse y es la inversa de la constante de absorción $t_{1/2a} = 0,693/K_a$, la *constante de eliminación* (K_e), indica la probabilidad que presenta una molécula de un determinado fármaco para eliminarse del organismo de una forma global, es decir, incluyendo los distintos mecanismos, como metabolismo, excreción renal o excreción biliar. Otro parámetro es la *semivida de eliminación* ($t_{1/2e}$) definida como el tiempo que tarda en reducirse a la mitad la concentración plasmática de un fármaco y es la inversa de la constante de eliminación $t_{1/2e} = 0,693/K_e$, otro parámetro es el *área bajo la curva* (AUC), área graficada bajo una curva de concentración plasmática de fármaco respecto al tiempo después de una sola dosis o durante un intervalo sencillo de dosificación, importante para calcular la biodisponibilidad de un fármaco administrado por cualquier vía diferente a la intravenosa. Las *concentraciones máxima* y *mínima* (C_{max} y C_{min}), se refieren a la cantidad máxima y mínima de un fármaco, en plasma o sangre. Uno de los fenómenos importantes dentro de la cinética es el *efecto de primer paso*, que se refiere a la eliminación del fármaco producida después de su administración, pero antes que alcance la circulación general.

Los fármacos presentan diferentes tipos de cinética como la cinética de *primer orden o lineal*, característica, cuando las velocidades de absorción, distribución y eliminación cambian en forma proporcional a las variaciones de las dosis que faltan por absorberse o las concentraciones plasmáticas. En cuanto a los tipos de absorción es característica la *absorción de orden 1*, cuando la velocidad de absorción disminuye con la cantidad de fármaco que queda por absorberse y, por lo tanto, el número de moléculas que se absorbe en la unidad de tiempo disminuye con el tiempo de forma exponencial. Dicha curva exponencial puede representarse como una recta si se representan las concentraciones en una escala semilogarítmica, siendo la constante de absorción la pendiente de dicha recta. La *eliminación de orden 1*, presenta la velocidad de eliminación (o disminución de la concentración plasmática por unidad de tiempo) y es mayor cuando las concentraciones plasmáticas son altas que cuando son bajas. Dado

que las moléculas del fármaco que se encuentran en el organismo están en solución (y, por lo tanto, disponibles para la eliminación). En esta cinética, el descenso de las concentraciones plasmáticas es exponencial en una representación numérica y rectilínea en una representación semilogarítmica, siendo la constante de eliminación la pendiente de dicha recta, en la *cinética de orden cero* la eliminación de un fármaco desde el recipiente hipotético puede a veces implicar un proceso activo, tal como un proceso enzimático. Si la dosis de un fármaco genera concentraciones plasmáticas altas, el número disponible de sitios de unión dentro del sistema enzimático puede estar sobrepasado o saturado. En la absorción de orden 0, el número de moléculas que se absorbe en la unidad de tiempo permanece constante durante todo o la mayor parte del proceso de absorción y el número de moléculas disponibles no disminuye con el tiempo, debido a que las moléculas absorbidas son repuestas desde el depósito. En la eliminación de orden 0 el número de moléculas que se elimina por unidad de tiempo permanece constante. Esta cinética se observa cuando el mecanismo de eliminación, sea por metabolismo o por excreción renal, es saturable y las concentraciones plasmáticas alcanzan valores que saturan estos mecanismos. En esta cinética, el descenso de los niveles plasmáticos es lineal en una representación numérica y se mantiene hasta que la concentración plasmática del fármaco descienda por debajo de la de saturación, en cuyo momento pasará a ser de orden 1.

Otro aspecto importante es el tipo de distribución, cuando éste es rápido y uniforme por todo el organismo, es decir, cuando el organismo se comporta como un único compartimento central se denomina *distribución monocompartimental*. Si la distribución de los fármacos administrados por vía intravenosa difunden con rapidez al compartimento central y con mayor lentitud al compartimento periférico la *distribución es bicompartimental*. En cambio si los fármacos se fijan fuertemente a determinados tejidos en los que se acumulan y de los que se liberan con lentitud la *distribución es tricompartmental*.³²

CAPITULO II

METODOLOGIA

2.1 Validación del método cuali-cuantitativo de CAT

Se prepararon, por cuadruplicado, 12 diluciones 1:2 a partir de una solución madre de 5mg de CAT en 10 mL de HCl 1N (solvente que será utilizado con las muestras de suero) mezclados durante 1 minuto en vortex, dichas soluciones se valoraron por espectrofotometría UV-Vis (Espectrofotómetro Cintra 5), de cada solución se realizó un barrido espectral entre 200 y 400 nm de longitud de onda, tomando como punto de referencia el máximo valor encontrado entre 330 a 335nm, con las absorbancias a las distintas concentraciones se construyó una curva de calibración (Absorbancia vs concentración).

En el cálculo de *linealidad*, se eligieron las lecturas de las diluciones 7,8,9,10,11 y 12. **Tabla 2.1**

Tabla 2.1 Diluciones de CAT en HCl 1 N a partir de la solución madre

Dilución	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)
6	15,600
7	7,810
8	3,910
9	1,950
10	0,977
11	0,488
12	0,244

Sobre las mismas se aplicó el análisis de regresión por mínimos cuadrados en los promedios de los seis puntos y se construyó la ecuación de la recta (3) de acuerdo a las ecuaciones (1) y (2):

$$y = a + bx \quad (3)$$

Donde y es la absorbancia, a es el intercepto, b es la pendiente y x la concentración

Para la determinación de la *pendiente*(b) se aplicó :

$$b = \frac{N\sum xy - \sum x \sum y}{N\sum x^2 - (\sum x)^2} \quad (1)$$

donde N es el número de datos observados, y el valor de las absorbancias obtenidas y x la concentración teórica.

En la determinación del *Intercepto*(a) se aplicó:

$$a = \frac{\sum y - b \sum x}{N} \quad (2)$$

para el coeficiente de correlación (r) se aplicó:

$$r = \frac{N\sum xy - \sum x \sum y}{\sqrt{[N\sum x^2 - (\sum x)^2] [N\sum y^2 - (\sum y)^2]}} \quad (4)$$

y para la determinación del coeficiente de determinación (r^2) se aplicó la ecuación (4):

$$r^2 = (r)^2 \quad (5)$$

Para comprobar la linealidad del método analítico se realizó el cálculo del análisis de varianza de la regresión lineal.

En el cálculo de la *exactitud* se eligió las concentraciones experimentales obtenidas las diluciones 7,8 y 9, **Tabla 2.1**, y se determinó los errores relativos (ER), aplicando la siguiente ecuación³³:

$$ER(\%) = \frac{100 \times (\text{Concentración promedio} - \text{Concentración nominal})}{\text{Concentración nominal}} \quad (6)$$

En la determinación de la *precisión* se consideró dos niveles, precisión intermedia y repetibilidad. Para el cálculo de la *precisión intermedia* se tomaron, por cuadruplicado, tres diluciones 7,8 y 9, **Tabla 2.1**, a partir de una solución madre al 0,05% p/v en HCl 1N a condiciones normales de trabajo realizadas por diferentes analistas, en días distintos pero con la misma muestra.

Para *repetibilidad* también se analizó tres diluciones 7,8 y 9 con las mismas características excepto que fueron analizadas por un mismo analista, en el mismo equipo, bajo las mismas condiciones de operación y en un intervalo corto de tiempo (en un mismo día).

En ambos niveles se calculó el coeficiente de variación (C.V.) y la desviación estándar (D.S.), aplicando las siguientes ecuaciones:

$$D.S. = \sqrt{(x - \bar{x})^2 / N - 2} \quad (7)$$

donde N es el número de datos, x los valores de concentración obtenidos y \bar{x} la media de los mismos valores.

Para el cálculo del coeficiente de variación se aplica la siguiente fórmula:

$$CV = \frac{D.S.}{\bar{x}} \quad (8)$$

Entre las concentraciones obtenidas se realizó anova y t de Student.

Las medidas de los *Límites de detección y de cuantificación* se determinaron en las diluciones 7,8,9,10,11 y 12, **Tabla 2.1**, a las cuales aplicó la ecuación de la recta obtenida en la regresión lineal para hallar la concentración experimental, **Tabla 3.15**.

Para obtener la concentración experimental con la que se calcula los dos límites se aplicó las siguientes fórmulas³⁴(7):

Límite de Detección: (*LD*)

$$LD = \frac{3 \times D.S.}{b} \quad (9)$$

3= factor

D.S.= desviación estándar

b= pendiente

Límite de cuantificación: (*LC*)

$$LC = \frac{10 \times D.S.}{b} \quad (10)$$

10= factor

D.S.= desviación estándar

b= pendiente

La *robustez* se determinó a seis niveles de concentración (diluciones 7,8,9,10,11 y 12), **Tabla 2.1** y se sometieron a tres variables: 1) *Temperatura*. Las soluciones fueron sometidas a diferentes temperaturas (T° ambiente, 50°C, 80°C y 100°C) durante 15 minutos, 2) *pH*, los alcaloides fueron disueltos en soluciones a diferente concentración de HCl (0,1;0,5;1 y 1,5 N) 3) *Luz UV*, las soluciones fueron sometidos a luz UV 254 durante diferentes tiempos (0,10,60,30,40,50 y 60min). Se analizaron las gráficas de barrido de 200 a 400nm de longitud de onda por ANOVA.

2.2 Preparación de (CAT)

El CAT suministrado por el área de fitoquímica del IIFB, por ser insoluble en agua fue preparado en forma de suspensión, en combinación con diferentes agentes apropiados para la administración v.o. que facilitan su manipulación. La misma fue almacenada bajo refrigeración a 4°C y utilizada dentro del período de dos semanas considerado satisfactorio para el mantenimiento de su estabilidad y calidad³⁵.

2.3. Formulación de la suspensión de CAT

CAT (1000 mg); polisorbato 20 (0,06mL); jarabe simple (0,36mL); glicerina bidestilada (0,45mL); aceite de maíz (0,63mL), estas proporciones fueron calculadas para 66,7%p/v .

Una vez pesado el CAT según la dosis requerida (1,5;5 y 10g/Kg) se suspendió en la mezcla de excipientes³⁶, toda esta preparación fue calentada a 50 °C en baño maría bajo agitación enérgica y continua.

Para los grupos control solo se preparó el vehículo sin el CAT

2.4. Posología

En el ensayo de toxicidad aguda a dosis fijas se prepararon diferentes concentraciones siendo estas de 20; 66,7 y 133,3 % p/v, de manera que se tuvieron dosis fijas de 1,5; 5 y 10 g/Kg p.c.. Para los ensayos de toxicidad subaguda a 28 días, neurotoxicidad, toxicidad subcrónica y toxicocinética en ratones se preparó a 66,7%, para conejos se preparó a 60%. El volumen de administración fue de 0,75 mL/100g p.c.²² El tiempo de tratamiento se sometió al tipo de estudio.

2.5 Preparación de la especie animal

El estudio de toxicidad se realizó en ratones de la línea Swis albinos adultos jóvenes y sanos de ambos sexos 121 hembras nulíparas y 41 machos, con 8 semanas de edad y 22 +/- 4,4g de peso corporal. El estudio toxicocinético se realizó en 70 ratones hembras, las cuales presentaron las mismas características anteriormente mencionadas y 3 conejas hembras Californianas de 6 meses con un peso promedio de 3 +/- 0,6Kg. Todos los animales fueron provistos por el bioterio del IIFB de la Facultad de Cs. Farmacéuticas y Bioquímicas de la UMSA.

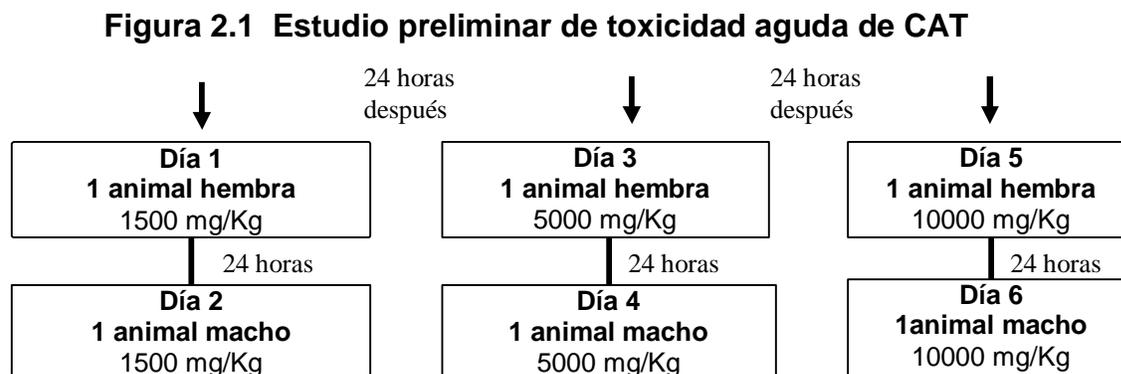
2.6. Condiciones del ambiente y alimentación

Los ratones fueron aclimatados a 22 +/- 3°C de temperatura, con iluminación artificial en una secuencia de 12 horas luz y 12 horas oscuridad. Se dio una dieta alimentaria corriente para animales de laboratorio y agua potable *ad libitum*²³. Los mismos fueron agrupados en jaulas por dosis en un número no mayor a 5 por jaula, 5 días previos al inicio de la administración para que se habitúen a las condiciones de estudio, cada animal fue marcado con ácido pícrico, en el estudio de toxicidad los animales fueron privados de alimentos pero no de agua entre 1 hora previa hasta 1 hora posterior a la administración²².

Los conejos fueron aclimatados a 20 +/- 3°C de temperatura, se aplicó iluminación artificial con una alternancia de 12 horas luz y 12 horas oscuridad, los animales fueron colocados en jaulas individuales³⁷. En cuanto a la alimentación no se proveyeron de alimentos 8 horas antes y 1 hora posterior a la administración del extracto y se dio agua potable *ad libitum*²².

2.7 Toxicidad oral aguda

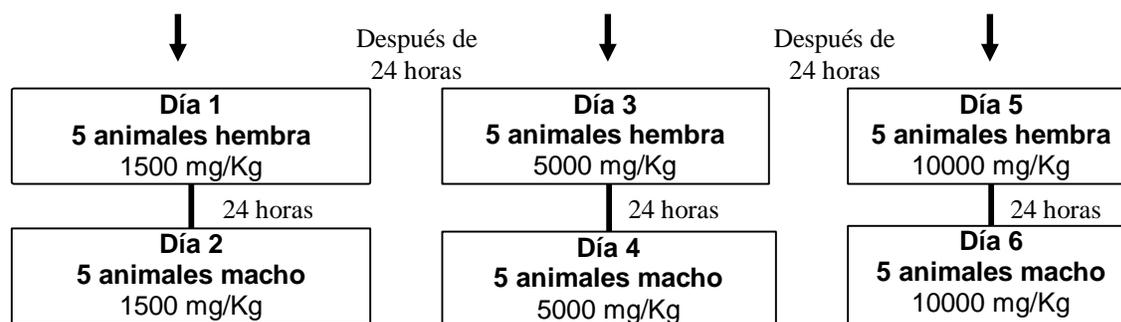
El estudio preliminar se diseñó siguiendo el esquema de la **Figura 2.1** en base a la propuesta por la OECD²³. Se administró una dosis a tres niveles (1,5; 5 y 10g/Kg), a un ratón hembra y un ratón macho, se observó cuidadosamente, durante 24 horas entre administraciones, los signos clínicos y alteraciones del comportamiento de los mismos.



2.7.1 Estudio principal

Se inoculó por vía oral de manera gradual a grupos de cinco animales por sexo (5 hembras y 5 machos), tres niveles de dosis (1,5;5 y 10 g/Kg p.c.) y 6 animales (3 hembras y 3 machos) para el grupo control, como se observa en la **Figura 2.2** manteniendo de esta manera los niveles de dosis del estudio preliminar, encontrados adecuados para su aplicación al estudio principal, así también la dosis inicial la cual previno la aparición de ciertos signos de toxicidad o efectos tóxicos graves^{26, 38, 39, 40, 41}. Después de transcurridos 16 días posteriores a la administración los animales fueron sacrificados^{42, 43}, se realizó la autopsia y los órganos fueron diseccionados y fijados en formol al 10% para el estudio histopatológico.

Figura 2.2 Estudio principal de toxicidad aguda de CAT



En la autopsia, se tomaron en cuenta las características macroscópicas generales, como aspecto, peso húmedo, color y tamaño del hígado, riñones, estómago, cerebro y bazo.

2.8 Toxicidad oral a dosis continua durante 28 días

Para la toxicidad a dosis continua, el estudio fue conducido de acuerdo al método de la OECD 407 durante 28 días²⁹. Se realizó un ensayo límite a 5g/Kg p.c. por día v.o. considerado adecuado para este ensayo⁴⁴.

Se emplearon ambos sexos de animales, agrupados en jaulas de cinco individuos cada una, se controlaron los signos clínicos cinco días antes de iniciar el estudio y se administró la formulación con cánulas vía oral, 28 días, cinco días a la semana, diariamente a la misma hora, durante cuatro semanas, las observaciones se realizaron de forma individual para cada animal se registró el estado de salud de los mismos y el peso fue monitoreado semanalmente.

Una vez transcurridos los 28 días de administración se diseccionaron los órganos de todos los animales, entre los cuales se seleccionó, el hígado, riñones, estómago, cerebro y bazo, inmediatamente fueron enjuagados y separados de tejidos adheridos con suero fisiológico, se observaron las características generales como tamaño, aspecto, color y se midió el peso húmedo, posteriormente todos los órganos fueron fijados en formol al 10% para el examen histopatológico.

2.9 Toxicidad oral subcrónica a dosis continua durante 90 días

Para el desarrollo del ensayo de toxicidad oral subcrónica a dosis continua durante 90 días tipo “ensayo límite”²⁸, se emplearon un total de 13 ratones hembras y 13 ratones machos expuestos al extracto de alcaloides de los cuales 3 hembras y 3 machos fueron los grupos satélite y como grupo control 5 ratones hembras y 5 ratones machos, para ambos grupos los animales fueron seleccionados al azar y separados en jaulas de máximo cinco individuos. Se administró diariamente, por 90 días, 100 mg de CAT v.o. con cánulas y 0,15 mL de vehículo al grupo control, cinco días por semana, durante 18 semanas. Se realizaron las observaciones clínicas antes de la primera exposición y una vez por semana durante las 18 semanas del ensayo, todas las pruebas funcionales se monitorearon de acuerdo a la evaluación hipocrática^{26, 40, 41}. Los signos clínicos que consistieron en probar la reactividad sensorial frente a diferentes estímulos⁴⁵⁴⁶ fue evaluada antes de la primera inoculación y una vez cada semana después de la novena semana de exposición²⁸, incluido el peso corporal y las pruebas de evaluación neurotoxicológica descritas mas adelante, todas estas observaciones

fueron registradas en una ficha individual para cada animal (**ANEXO I.1**), al término de las 18 semanas los animales fueron sacrificados ^{42, 43} .

En la autopsia se observaron los aspectos macroscópicos del animal y de los órganos, estómago, hígado, bazo, riñones y cerebro e inmediatamente diseccionados fueron lavados y separados de tejidos adheridos con suero fisiológico, posteriormente se midió el peso húmedo de los órganos y se los fijo en formol al 10% para los estudios histopatológicos.

Simultáneamente a la disección se extrajo aproximadamente 1mL de sangre por punción cardiaca con heparina y se determinó la concentración estacionaria del CAT en el suero, para tal efecto se aplicó una extracción alcalina⁴⁷ como se detalla en el método de toxicocinética.

2.10 Evaluación de la neurotoxicidad

Para la evaluación neurotóxica se siguió el método OCDE TG 424 y se realizaron tres pruebas indicadas para la evaluación de funciones motoras como el ensayo de caída del alambre (hanging wire), prueba de la chimenea (chimney test) y la evaluación para las emociones como la prueba del campo abierto con agujeros (hole board) ^{48, 49, 50} fue realizada dos veces a la semana y el peso corporal fue monitoreado semanalmente.

2.10.1 Prueba del alambre “hanging wire test”

El instrumento utilizado consiste en un alambre de 30cm de largo, sujeto a dos palos de madera paralelos, a 27cm de altura, unidos por un tablón de madera de 50cm de largo.

Una vez inoculados los ratones con el vehículo (0,15 mL) o con 100mg de CAT /día y luego de 30 minutos, cada animal fue colocado en el centro a lo largo del alambre y se registró el tiempo en el cual llegaron a uno de los extremos. El monitoreo se realizó dos días a la semana, una semana previa a la administración y durante las 4 semanas posteriores u 8 últimas semanas (tox. 90 días). Esta

prueba evalúa la fuerza muscular y la habilidad prensil de los animales ⁴⁸.
(ANEXO I.2)

2.10.2 Prueba del tubo “Chimney test”

El instrumento utilizado consiste en un tubo de vidrio de 30cm de largo, con un diámetro de 3cm, con los dos extremos abiertos.

Una vez inoculados los ratones con el vehículo o el extracto y, luego de 30 minutos, cada animal fue colocado en un extremo del tubo cogido por la base de la cola y liberado para que atravesase a lo largo del tubo orientado de forma horizontal, hasta asomar el hocico al extremo contrario, inmediatamente el tubo fue inclinado de forma vertical y, se registró el tiempo durante el cual los ratones subieron en retroceso por el tubo apoyando la espalda. Esta prueba evalúa el equilibrio, fuerza muscular, tono y coordinación de movimientos⁵¹. El monitoreo se realizó en el mismo tiempo que la anterior prueba. **(ANEXO I.3)**.

2.10.3 Ensayo de campo abierto con agujeros “Hole board test”

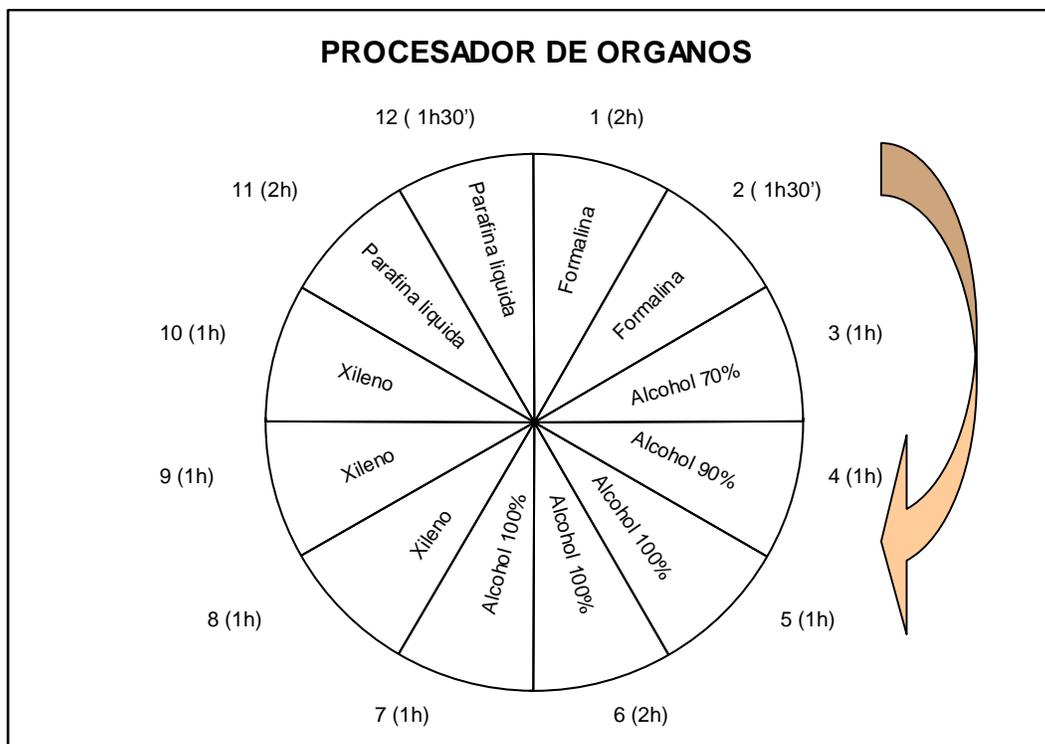
El instrumento utilizado consiste en una caja de madera de 33 x 37cm, con paredes de 8cm de alto, cuyo superficie presenta 12 orificios equidistantes de 2cm de diámetro.

Una vez inoculados los ratones con el vehículo o el extracto y, luego de 30 minutos, cada uno de ellos fue colocado en el centro de la superficie de la caja. Se evaluó durante 3 minutos, el comportamiento exploratorio y se registraron el número de veces que introdujeron la cabeza en los agujeros ⁴⁸. El monitoreo se lo realizó una semana antes y cuatro semanas posteriores a la administración del CAT. **(ANEXO I.4)**

2.11 Histopatología

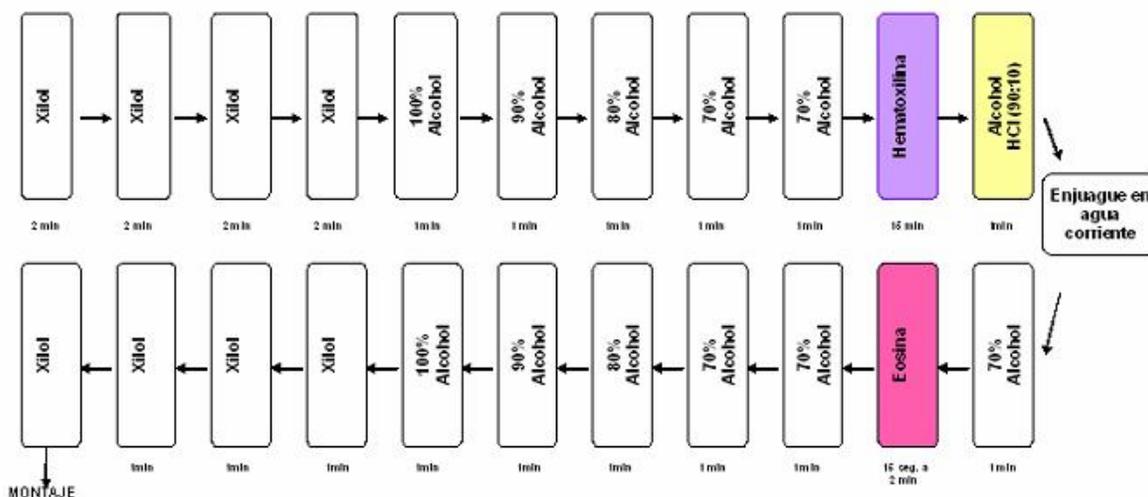
Para la ejecución del estudio histopatológico se contó con la colaboración del Instituto Gastroenterológico Boliviano Japonés. Los órganos fijados en formol al 10%⁵² fueron inicialmente fotografiados y codificados. Para la observación microscópica se precisó de placas histológicas para lo cual, se realizó cortes transversales en los tejidos en piezas con un espesor de 4mm, las cuales fueron colocadas en cajas tipo red plásticas para sumergirlas en una solución de formol al 10% ligeramente caliente, durante 15 minutos, luego fueron enfriadas a chorro de agua durante 10 minutos y sometidas al procesador de órganos (AUTOTECNICON "SHANDOM" citadel de Shandom 2000) y su paso a través de diferentes reactivos químicos para la fijación, deshidratación y aclaración, durante 16 horas, como se observa en la **Figura 2.3**.

Figura 2.3 Proceso de fijación, deshidratación y aclaramiento de los tejidos



Posteriormente los cortes fueron incluidos en parafina fundida hasta su solidificación, dando lugar a la formación de bloques de parafina sólida a los cuales se adhirieron los tacos de madera. Luego se realizó cortes por microtomía (Microtomo, LEICA Mod RM 2135) de 3 a 4 μm de espesor, estos cortes fueron extendidos en baño maría a una temperatura $<50^{\circ}\text{C}$ y colocados en las placas de vidrio calentados en estufa de 56 a 60°C por 10 min, para luego proceder a la tinción de los cortes, previamente las mismas, fueron colocadas en soportes para ser sumergidas en una batería de tinción⁵², según el orden detallado en la **Figura 2.4**.

Figura 2.4 Tinción de los tejidos



Los cortes se someten a xilol, luego a etanol a diferentes concentraciones, a hematoxilina, ácido clorhídrico, agua, etanol, luego a eosina, nuevamente a diferentes concentraciones de alcohol y finalmente a xilol.

Una vez evaporado el xilol los cubreobjetos fueron asegurados con aceite de ricino y se realizó el análisis microscópico (Microscopio NIKON OPTIPHOT) de los tejidos.

2.12 Toxicocinética

En este estudio se emplearon 30 ratones Swis albinos, hembras nulíparas con un peso de $20 \pm 4,4$ g y 8 a 9 semanas de edad, se administró a cada animal 100mg de CAT, y se sacrificó 5 ratones a diferentes tiempos (1,3,5,7,9,11 horas) de los que se extrajo aproximadamente 1 mL de sangre por punción cardiaca y se realizó la extracción en medio alcalino.

De 1mL de sangre extraída y centrifugada en tubos de hemólisis (2500 rpm; 5min) (Centrifugadora Jouan AFAQ CR31), se separó el suero 200uL, se añadió KOH 1N 50uL, se agitó en vortex (1min), posteriormente se adicionó la mezcla de n-hexano/isopropanol (98:2) 1,3 mL, se mezcló en vortex (1min) y centrifugó a (3000 rpm;10 minutos), al mismo tubo se añadió n-hexano/isopropanol (98:2)1,2 mL y mezcló en vortex durante un minuto e inmediatamente se centrifugó (3000rpm;10min) y se congeló a -50°C (24h), la porción líquida fue vaciada a tubos de vidrio nuevos para la evaporación de la solución de extracción en estufa (FAETA) a 50°C , tras la evaporación los tubos fueron enjuagados con HCl 1N 1mL y agitados en vortex (30seg) antes de la lectura por espectrofotometría UV-Vis (200 a 400nm) (Espectrofotómetro Cintra 5). De las lecturas obtenidas se calculó los promedios y se determinó los parámetros toxicocinéticos.

Se determinó la concentración de alcaloides acumulados en el suero de 45 ratones (40 tratados; 5 controles) expuestos a 100mg de CAT/día v.o. y 0,15 mL de la mezcla de excipientes durante 14 días de administración continua

También se determinó la concentración por administración única de 100mg de CAT v.o. a 15 ratones, los cuales fueron sacrificados cada 24 horas

Para el estudio realizado en los conejos se administró, por sonda orogástrica, 3g de CAT en 5mL de la mezcla de excipientes descritos anteriormente, a conejos con un peso aproximado de 3Kg, transcurridas las 0,1,3,5,7,9,11 y 24h posteriores a la administración se obtuvo muestras de 3mL de sangre, las cuales se centrifugaron (2500rpm ;5min), se separó el suero 500uL de cada una de ellas y se aplicó el método de extracción alcalina⁴⁷.

2.13 Análisis estadístico

Los parámetros estudiados estuvieron sujetos a análisis estadístico por t de Student, Análisis de varianza y Regresión múltiple así también para la obtención de los parámetros toxicocinéticos se aplicaron los programas Excel, SPSS 11.5 para Windows y Statistic.

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSIONES

3.1 Validación del método analítico cuali-cuantitativo de CAT por espectrofotometría UV-vis

Se han tomado en cuenta mediciones de las absorbancias de Luz de Ultravioleta entre 330-335nm de CAT a las diferentes concentraciones especificadas en cada prueba.

Los resultados del cálculo de *linealidad* se reflejan en la **Tabla 3.1** donde se obtuvo un coeficiente de correlación múltiple igual a 0,999 y un coeficiente de determinación de 0,997 los cuales indican una relación lineal entre la absorbancia y la concentración, puesto que a mayores concentraciones los coeficientes de correlación múltiple y de determinación se alejan de la unidad además de acuerdo a los valores del intercepto y la variable X 1 se construye la recta que se aplicará para el cálculo de las concentraciones **Figura 3.1**, esta aseveración se confirma con los resultados obtenidos del Análisis de varianza de la regresión lineal donde el valor F obtenido es mucho mayor al valor crítico (**ANEXO II.1**).

Tabla 3.1 Regresión lineal del método espectrofotométrico para la determinación de CAT

Estadísticas de la regresión	
Coeficiente de correlación múltiple	0,999
Coeficiente de determinación r^2	0,997
r^2 ajustado	0,997
Error típico	0,0299
Observaciones	6

Parámetros	Coefficientes
Intercepción	0,0459
Variable X 1	0,174

Linealidad (Abs vs concentración)

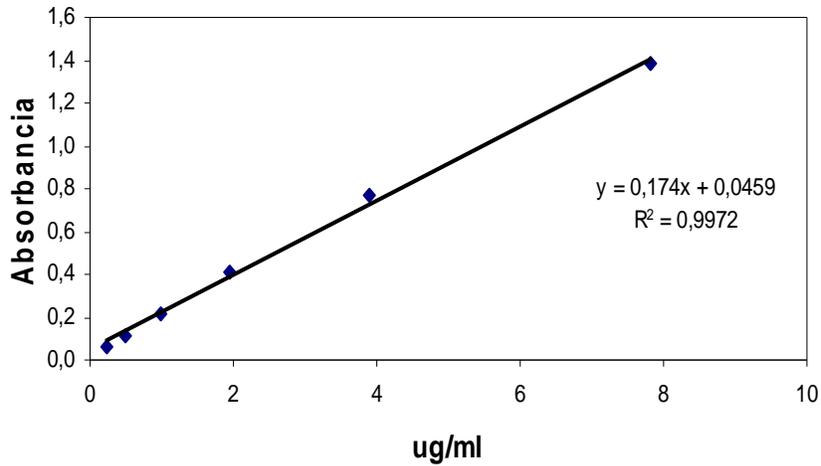


Figura 3.1. Relación lineal entre la absorbancia y la concentración de CAT

Como se observa en la **Tabla 3.2**, para la determinación de la *exactitud* a 3 niveles de concentración (1,95; 3,91 y 7,81 μ g/mL) por cuadruplicado, se puede advertir desviaciones estándar de las concentraciones inferiores al 1%, errores relativos superiores a mayores concentraciones e inferiores a $\pm 2\%$ a 1,953 μ g/mL considerado óptimo²⁰ para métodos analíticos, además de porcentajes de recuperación cercanos a 100%. **(ANEXOII.2)**

Tabla 3.2. Exactitud del método de espectrofotometría UV para la determinación de CAT

	Concentración μ g/mL		
	1,953	3,906	7,812
Promedio \pm D.S.	1,950 \pm 0,212	3,810 \pm 0,401	7,13 \pm 0,659
E.R.(%)	-0,15	-2,46	-8,7
Recuperación(%)	99,8	97,5	91,3

D.S., desviación estándar, E.R., error relativo.

La *precisión intermedia* reflejada en la **Tabla 3.3** fue establecida al comparar los resultados de 4 mediciones obtenidas en diferentes tiempos

(diferente día) a tres niveles de concentración de CAT, donde no se observa diferencias significativas entre las cuatro mediciones (t de Student, anova), además se obtuvieron coeficientes de variación inferiores al 5%. **(ANEXOII.3)**

Tabla 3.3 Precisión intermedia del método espectrofotométrico para la determinación de CAT

	Concentración (µg/mL)		
	1,953	3,906	7,812
Día 1° promedio	2,066	4,130	7,675
Día 2° promedio	1,993	4,012	7,436
F exp	1,199	1,180	2,504
P(F<=f)	0,315	0,319	0,165
Valor crítico para F	5,987	5,987	5,987
Observaciones	4	4	4
Desviación estándar	0,096	0,156	0,235
Coefficiente de variación (%)	4,747*	3,834*	3,109*
Estadístico t	2,353	1,086	1,583
P(T<=t) dos colas	0,354	0,357	0,212
Valor crítico de t (dos colas)	3,182	3,182	3,182

(*)Los valores de los coeficientes de variación obtenidos son inferiores a 5%.

La *repetibilidad* reflejada en la **Tabla 3.4** fue establecida al comparar los resultados de 4 mediciones obtenidas en diferentes tiempos (mismo día) a tres niveles de concentración de CAT, donde no se observa diferencias significativas entre las cuatro mediciones (t de Student y anova) y sus coeficientes de variación son inferiores a 5%. **(ANEXO II.4)**

Tabla 3.4 Repetibilidad del método espectrofotométrico para la determinación de CAT.

	Concentración (µg/mL)		
	1,953	3,906	7,812
Tiempo 1°	2,087	4,097	7,631
Tiempo 2°	2,027	3,912	7,575
F exp	0,872	5,825	0,197
P(F<=f)	0,387	0,052	0,673
Valor crítico para F	5,987	5,987	5,987
Observaciones	4	4	4
Desviación estándar	0,091	0,141	0,167
Coefficiente de variación (%)	4,430*	3,519*	2,200*
Estadístico t	0,934	2,413	0,443
P(T<=t) dos colas	0,403	0,073	0,688
Valor crítico de t (dos colas)	2,776	2,776	3,182

(*)Los valores de los coeficientes de variación obtenidos son inferiores a 5%

En cuanto al límite de detección y cuantificación se obtuvo valores iguales a 0,516 μ g/mL y 1,72 μ g/mL respectivamente, por lo tanto el límite confiable con precisión y exactitud aceptable al cual se cuantifica CAT es >1,72 μ g/mL y se detecta CAT a >0,516 μ g/mL, en cuanto a los valores superiores se pudo observar que no existe variación de la relación lineal entre la absorbancia y concentración de CAT hasta 7,81 μ g/mL. **(ANEXO II.5)**

En cuanto a la robustez, las lecturas realizadas a diferentes concentraciones de ácido y a diferentes concentraciones de CAT como se observa en la **Figura 3.2**, presentan significancia ($p < 0,05$; anova), excepto en las lecturas a concentraciones menores, 0,244 μ g/mL, por lo tanto la variación del pH provoca variaciones en la absorbancia de CAT por otra parte es recomendable realizar las determinaciones con HCl 1N, puesto que a esta concentración de ácido existe menor variación. **(ANEXO II.6)**

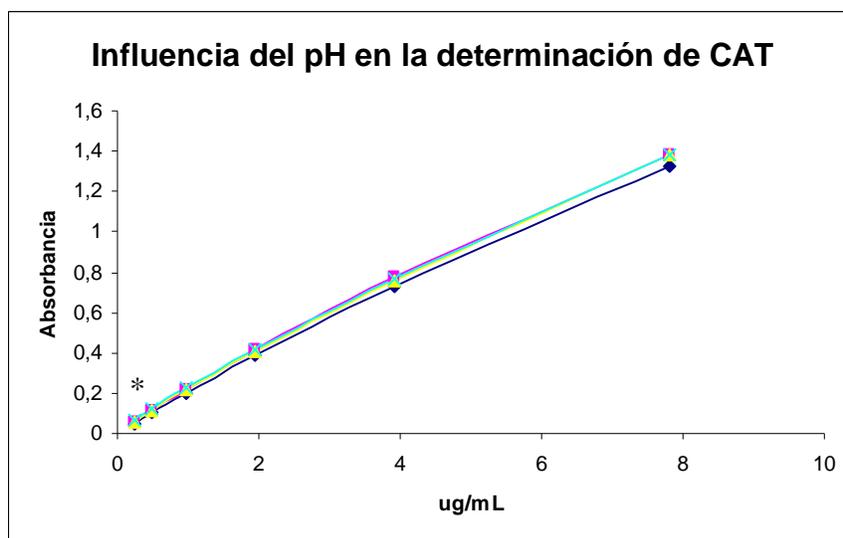


Figura 3.2 Influencia del pH en las absorbancias de las soluciones [(—) 0,1N, (—) 0,5N, (—)1N y (—)1,5N;n=3]. Todos los niveles de concentración presentan diferencias significativas ($p < 0,05$;anova) excepto (*).

En cuanto a los resultados de la variación de la concentración por fotólisis **Figura 3.3** y por termólisis **Figura 3.4**, no se observaron diferencias significativas,

excepto en fotólisis a 0,244 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concentración por lo tanto probablemente la radiación de luz UV provoca variaciones en la absorbancia a menores concentraciones. **(ANEXOS II.7 y II.8)**

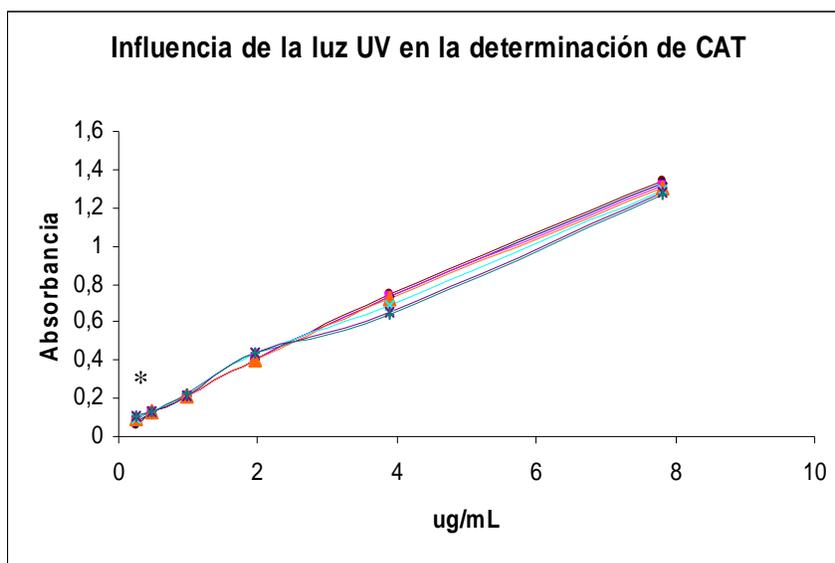


Figura 3.3 Influencia de la luz UV en las absorbancias de las soluciones [(\square)0 min, (\square)10 min, (\square)20 min, (\square)30 min, (\square)40 min, (\square)50 min y (\square) 60 min; n=4]. (*) Presenta diferencia significativa ($p < 0,05$; anova).

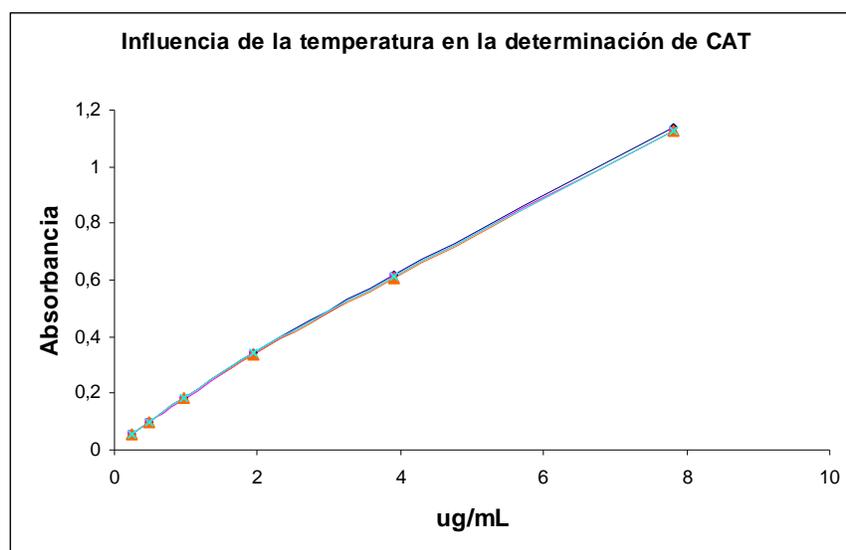


Figura 3.4 Influencia de la temperatura en las absorbancias de las soluciones [(\square)T° amb, (\square)50°C, (\square)80°C, (\square)ebullición; n=3].

3.2 Toxicidad aguda

El CAT se caracterizó por baja toxicidad cuando se administró por vía oral, puesto que en ninguna de las dosis ensayadas (1,5;5 y 10 g/Kg) hubo mortalidad de los animales.

En función del buen perfil de seguridad obtenido por CAT en el estudio preliminar, se procedió al estudio principal, donde los resultados obtenidos reflejados en la **Tabla 3.5**, muestran 100% de sobrevivencia a dos niveles de dosis oral única (1,5 y 5 g/Kg), como especifican los métodos de la OECD y un nivel adicional de 10 g/Kg, no se encontró toxicidad manifiesta ni muerte. Por lo tanto, de acuerdo a la clasificación SAM (*Sistema Armonizado Mundial*) el CAT se considera como una sustancia “no clasificada” con arreglo al SAM por los altos niveles de dosis tolerados, por lo tanto el CAT no presenta amenaza de toxicidad. Según nuestros resultados, por vía oral tiene un DL₅₀ superior a 10g/Kg^{53, 12}.

Tabla 3.5. Efecto letal de la dosis única de CAT a diferentes niveles de dosis administrados v.o. en ratones

Sexo	Dosis de CAT (g/kg)	Número de animales tratados	Número de animales muertos	Porcentaje de sobrevivencia
Hembras	0	3	0	100%
Hembras	1,5	5	0	100%
Hembras	5	5	0	100%
Hembras	10	5	0	100%
Machos	0	3	0	100%
Machos	1,5	5	0	100%
Machos	5	5	0	100%
Machos	10	5	0	100%

CAT, Extracto de alcaloides totales de corteza de *Galipea longiflora*

Por otro lado las observaciones clínicas según el test hipocratico^{38,40,41} descartan alteraciones a nivel de ojos y oídos, sin embargo existió piloerección tanto en el cuello y en todo el cuerpo como lo refleja la **Tabla 3.6**, con mayores porcentajes el día de la administración y los primeros cuatro días posteriores, que fueron disminuyendo paulatinamente, con apariciones intermitentes y en bajo porcentaje.

Tabla 3.6. Piloerección en el cuello y en todo el cuerpo en ratones expuestos a dosis única de CAT a diferentes niveles administrados por v.o. en ratones

Sexo	Dosis de CAT (g/Kg)	Tiempo (días, porcentaje de respuesta)									
		1		2		3		4		5	
		+	++	+	++	+	++	+	++	+	++
Hembras	0	33	-	33	-	-	-	-	-	-	-
Hembras	1,5	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hembras	5	60	20	20	-	20	-	20	-	-	-
Hembras	10	100	-	40	-	20	-	20	-	-	-
Machos	0	33	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Machos	1,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Machos	5	60	-	60	-	40	-	40	-	-	-
Machos	10	80	20	80	20	20	20	-	-	-	-

(++), piloerección definitiva en la región del cuello; (+), piloerección de todo el pelo del animal.

Como se observa en la **Figura 3.5** se encontró mayores porcentajes de individuos con piloerección en todo el cuerpo (60, 80 y 100%) el primer día del ensayo, a dosis de 5 y 10g/Kg en hembras y machos disminuyendo paulatinamente a 0% a partir del 12^{do} día hasta finalizado el ensayo. Se tornó bruscamente imperceptible en machos y hembras al 4^{to} y 8^{vo} día a 10g/Kg y a 5g/Kg al 8^{vo} y 12^{do} días respectivamente. Sin embargo 33% de los controles, de ambos sexos presentaron piloerección el primer día con descenso hasta 0% al 4^{to} día.

Existe significancia estadística ($p < 0,05$; regresión múltiple) en función al día de observación indistintamente de las dosis, lo cual sugiere la existencia de estimulación neurovegetativa²⁸ el día de administración de CAT, no obstante como lo mencionamos anteriormente 33% de ratones de los grupos control presentaron piloerección, para descartar estimulación debida al CAT se compararon los grupos controles con los grupos de ratones inoculados a los tres niveles de dosis el mismo día de la administración, sin embargo los resultados no permiten aseverar diferencias entre los controles y los animales tratados. Es posible atribuir este efecto al malestar general²⁶ provocado por la presencia física del CAT que altera su dieta habitual, o al estrés producido durante la administración el 1^{er} día del ensayo³⁵.

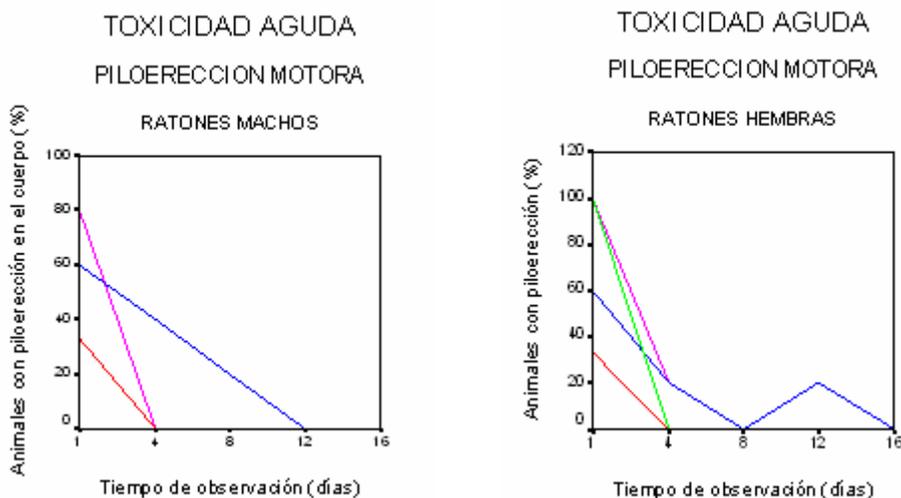


Figura 3.5 Porcentaje de ratones machos (izquierda) y hembras (derecha) con piloerección inoculados con CAT [(—) 1,5g/Kg, (—) 5g/Kg, (—) 10g/Kg; n=5]; en comparación con los controles [(—) 0g/Kg; n=3] y su monitorización durante los 16 días posteriores a la administración única v.o.

Entre otros parámetros fue notoria la presencia de orina de color amarilla intensa y turbia con olor fétido que según la literatura caracteriza la presencia de nefrosis o caquexia⁵⁴, para descartar daño a nivel renal se realizó el estudio histopatológico de los tejidos el cual será detallado más adelante.

Entre los signos clínicos adicionales a los del test hipocrático, también se observa distensión abdominal, como lo refleja la **Figura 3.6**, donde 80% de individuos hembras y machos inoculados v.o. con 10g/Kg de CAT presentaron distensión abdominal disminuyendo paulatinamente a 20% el 12^{do} a 16^{to} día en machos y a 0% el 8^{vo} día en hembras, además 60% de hembras expuestas a 1,5g/Kg y 5g/Kg de CAT también presentaron distensión disminuyendo paulatinamente días posteriores a la administración. Según el análisis estadístico, la diferencia en el porcentaje de animales con distensión abdominal fue significativamente mayor ($p < 0,05$; anova) en los que recibieron las distintas dosis de CAT frente a los controles. Sin embargo, únicamente el día de la inoculación, la diferencia entre estos dos grupos (tratados y controles) fue significativa ($p < 0,05$; t de student) en hembras a 1,5g/Kg y en machos a 5g/Kg y no así a todos los niveles de dosis, comprobando de esta manera, la ausencia de una relación proporcional entre la distensión abdominal y la dosis, lo cual nos permite descartar

un efecto tóxico causado por el CAT. Por otro lado, la diferencia en el porcentaje de animales con distensión es significativamente mayor ($p < 0,05$; regresión múltiple) el día de la administración disminuyendo en el transcurso del ensayo, lo cual nos permite atribuir a la retención de gases por el efecto mecánico producido por la consistencia de la preparación oleosa y la alteración de su dieta habitual por adición de CAT.

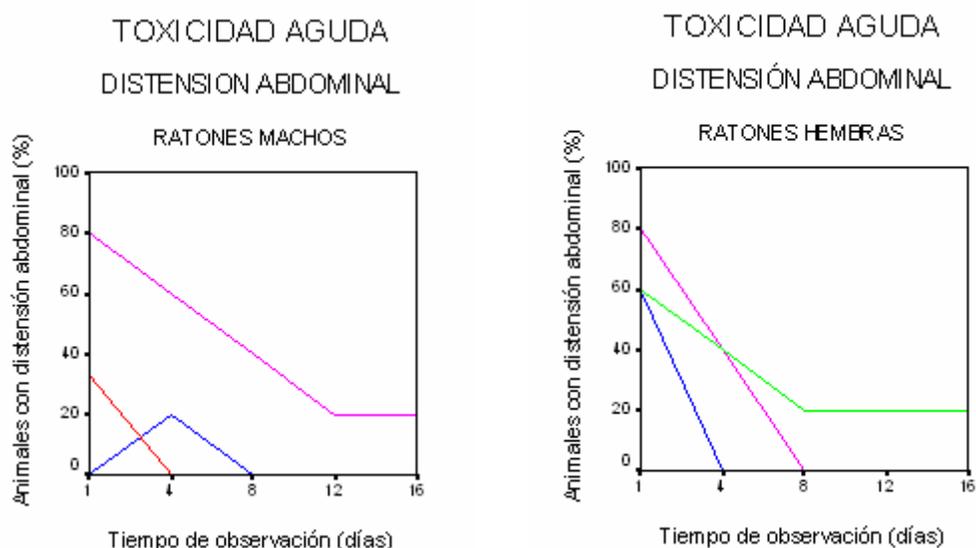


Figura 3.6. Porcentaje de ratones machos (izquierda) y hembras (derecha) con distensión abdominal, inoculados con CAT [(-)1,5g/Kg, (-) 5g/Kg, (-) 10g/Kg; n=5]; en comparación con los controles [(-) 0g/Kg; n=3] y su monitorización durante los 16 días posteriores a la administración única v.o.

Así mismo por vía oral la dosis sin efectos adversos observados (NOAEL)⁵⁵ fue de 10g/Kg de CAT, la dosis máxima tolerada (MTD), fue de 10g/Kg y la dosis letal mínima (MLD)²⁷, se asume se encontraría por encima de la máxima dosis estudiada en el presente trabajo (>10g/Kg).

3.3 Toxicidad a dosis continua durante 28 días

Los resultados reflejados en la **Tabla 3.7** demuestran que no hubo mortalidad en ratones inoculados diariamente v.o. con 5g/Kg de CAT durante 28 días. Por lo tanto se descarta efecto letal a esta dosis en el presente estudio.

Tabla 3.7 Efecto letal en ratones expuestos a 5g/Kg de CAT por 28 días.

Sexo	Dosis de CAT (g/kg/día)	Número de animales tratados	Número de animales muertos	Porcentaje de sobrevivencia
HEMBRAS	5	5	0	100%
HEMBRAS	0	5	0	100%
MACHOS	5	5	0	100%
MACHOS	0	5	0	100%

3.4 Toxicidad oral subcrónica a dosis continua durante 90 días

Los animales de ambos sexos expuestos durante 90 días a una dosis diaria de 5g/Kg p.c. de CAT presentaron 92% de sobrevivencia, **Tabla 3.8**. A diferencia del resto de los animales que fueron sacrificados al término del ensayo en los cuales no se observaron cambios significativos en los parámetros clínicos excepto presencia de neumatosis gastrointestinal, los animales que murieron antes de finalizado el estudio (9^{na} y 17^{ma} semanas) presentaron orejas pálidas, caquexia, día antes orina de color amarilla intensa, heces oscuras y debilidad capilar. Algunos ratones que recibieron esta misma dosis, 5g/kg, manifestaron síntomas menores de toxicidad que comprenden diarrea intermitente e hipoactividad parcial²⁷. En cuanto a la piloerección y la distensión abdominal, estas se presentaron los primeros días de administración en bajos porcentajes de la población. No obstante ambos grupos tratados como controles aparentaron estar saludables durante y al final del estudio. De acuerdo a los alentadores resultados obtenidos por administración de dosis altas de CAT nos animaríamos a advertir un amplio margen terapéutico en relación al IC₅₀ obtenido en trabajos anteriores, sin embargo esta aseveración probablemente es prematura tomando en cuenta que estos valores fueron obtenidos *in vitro*⁶.

Tabla 3.8 Efecto letal en ratones expuestos a 5g/Kg de CAT por 90 días

	Dosis CAT (g/kg/día)	Número de animales tratados	Número de animales muertos	Porcentaje de sobrevivencia
HEMBRAS	5	13	1 ^a	92%
HEMBRAS	0	5	0	100%
MACHOS	5	13	1 ^b	92%
MACHOS	0	5	0	100%

^a Cantidad total administrada 4,2g de CAT (9^{na} semana); ^b cantidad total administrada 8,5g de CAT (17^{ma} semana).

3.5. Efectos de la toxicidad subcrónica

Consumo de alimentos

Los animales expuestos a dosis diarias v.o. de 5g/Kg de CAT por 90 días, presentaron una disminución significativa ($p < 0,05$; anova) en el consumo de alimentos durante el desarrollo del ensayo. Sin embargo esta disminución también se presentó en el grupo de ratones control, comparando ambos grupos y según el análisis estadístico no existe diferencia significativa (t de Student). Probablemente esta disminución sea resultado de una sensación de plenitud provocada por presencia de la preparación oleosa y no así por efecto único del CAT. **Figura 3.7.** La diferencia fue significativa ($p < 0,05$; anova) en general entre hembras y machos, siendo estos últimos los que consumen aproximadamente 5g más en comparación con las hembras indistintamente de la exposición a CAT.

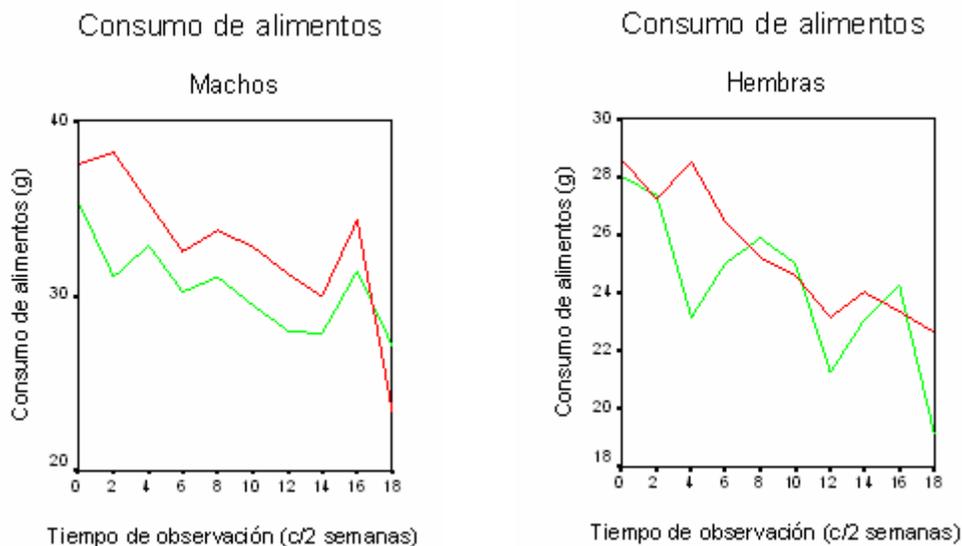


Figura 3.7 Media del consumo de alimentos en ratones hembra (izquierda) y macho (derecha) expuestos a CAT [(—) 5g/kg; n=13] en comparación con los grupos control [(—) 0g/Kg; n=5 (0,15 mL del vehículo) durante 18 semanas.

Consumo de agua

En cuanto al consumo de agua al inicio del estudio es evidente un incremento en el volumen las primeras semanas y una disminución significativa ($p < 0,05$; regresión múltiple) y paulatina días posteriores. Por otro lado el volumen de agua consumido por los ratones inoculados v.o. con 5g/Kg de CAT por 90 días, fue menor, la aparente disminución del consumo de agua por ratones inoculados a esta dosis en comparación con controles no es estadísticamente significativa. Por lo cual esta ligera variación en la ingesta de agua durante el desarrollo del ensayo nos permite sugerir descartar una influencia importante del CAT en el consumo de agua. **Figura 3.8**

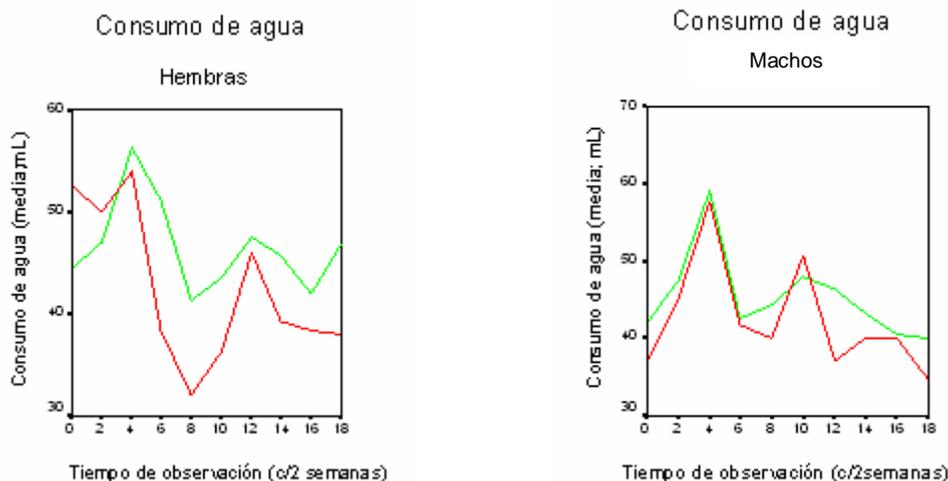


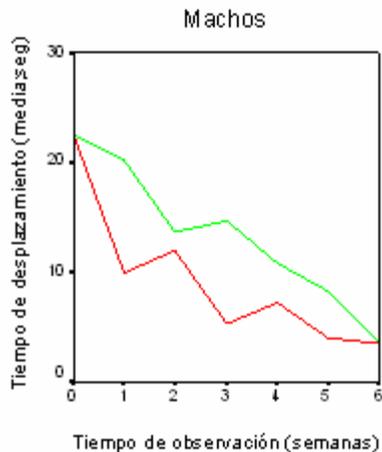
Figura 3.8 Media del consumo de agua en ratones hembra (izquierda) y macho (derecha) expuestos a CAT [(+) 5g/kg; n=13] en comparación con los grupos control [(+) 0g/Kg; n=5 (0,15 mL del vehículo) durante 18 semanas.

3.6 Neurotoxicidad

Prueba de caída del alambre

En cuanto a las pruebas de neurotoxicidad, los resultados de la “prueba de caída del alambre” muestran una diferencia significativa ($p < 0,05$; anova) del tiempo de desplazamiento por el alambre en animales expuestos v.o. a 5g/Kg de CAT, principalmente en machos frente a los controles (0g/Kg) los primeros días de observación, no obstante disminuye lentamente conforme transcurren los 28 días del estudio formando picos intermitentes, es por tanto una respuesta significativa ($p < 0,05$; regresión múltiple) en función al día de exposición y la disminución de agilidad podría ser atribuida a la presencia de CAT, por otra parte no se podría aseverar disminución de la fuerza muscular o habilidad prensil debido a la ausencia de caídas durante el desarrollo del ensayo. **Figura 3.9**

Prueba de caída del alambre (28 días)



Prueba de caída del alambre (28 días)

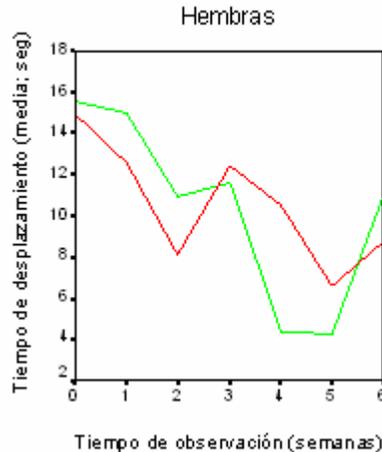
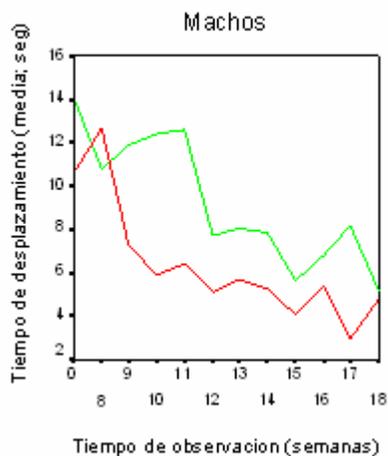


Figura 3.9 Media del tiempo de desplazamiento por el alambre en ratones hembras (izquierda) y machos (derecha) expuestos a CAT [(+) 5g/Kg; n=13] en comparación con los grupos control [(-) 0 g/Kg; n=5 (0,15 mL del vehículo) por 28 días.

Prueba de caída del alambre (90 días)



Prueba de caída del alambre (90 días)

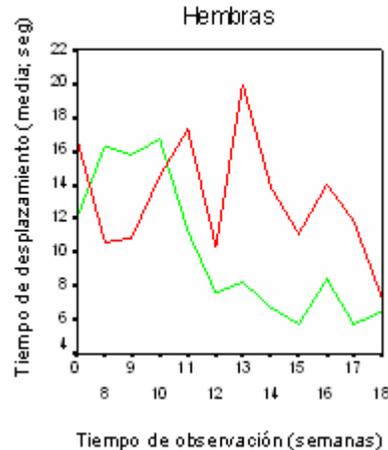


Figura 3.10 Media del tiempo de desplazamiento por el alambre de ratones hembras (izquierda) y machos (derecha) expuestos a CAT [(+) 5g/Kg; n=13] en comparación con los grupos control [(-) 0 g/Kg; n=5 (0,15 mL del vehículo) durante las últimas 11 semanas del estudio.

De la misma manera los ratones machos expuestos v.o. a 5g/Kg de CAT por 90 días, sometidos a esta prueba presentan tiempo de desplazamiento significativamente mayor frente a los controles ($p < 0,05$; anova) y las hembras presentan valores variables en relación a los machos, con una disminución durante las últimas semanas que no es significativa frente a los controles, en

general la diferencia en el tiempo de desplazamiento es significativa en función al día de exposición al CAT ($p < 0,05$; regresión múltiple), siendo mayor los primeros días del ensayo y menor al finalizar el mismo. **Figura 3.10.**

Con los resultados obtenidos de los dos estudios a diferentes tiempos se observa un aumento de la velocidad de desplazamiento, es decir mayor agilidad, por otro lado se confirma ausencia de deterioros motores, disminución de la fuerza muscular o habilidad prensil, debida a la presencia de 5g/Kg de CAT durante y después del estudio de toxicidad subcrónica (90 días) y a 28 días. Por lo tanto debe tomarse en cuenta que los ratones son renuentes a caer del alambre y que esto se asume como latencia de caída que refleja el déficit en la fuerza de asimiento o equilibrio, pero también una reactividad por el miedo puede suprimir la resistencia a caer y aumentar la velocidad de reacción y, de esta manera los ratones tratados con el CAT exhibir una disminución en el tiempo de desplazamiento⁵⁶. Probablemente estos datos descarten la presencia de deterioros motores o estimulantes y los efectos modestos o inconstantes de la fuerza motora de sujetos expuestos al CAT no únicamente reflejen medidas de coordinación motora y fuerza sino de factores emocionales como resultado de la perturbación inevitable de su tranquilidad cotidiana por el procedimiento mismo que se confirma al observar similar comportamiento en los controles, los cuales también presentan aunque menos marcado, un aumento en la velocidad de desplazamiento (menor tiempo) los últimos días del ensayo.

Prueba de la chimenea "Chimney test"

La **Figura 3.11.** muestra variación en el tiempo de "ascenso en retroceso" en ratones hembra y macho expuestos v.o. a 5g/Kg de CAT y a 0,15 mL de vehículo (control) durante 28 días, siendo éste menor en machos expuestos al CAT en comparación con los controles en cambio en hembras existió una elevación la 4^{ta} semana de observación. Pero no se detectaron diferencias significativas para las variables sexo y tratamiento vs controles entre las semanas 1^{era} a 6^{ta} y sólo se encontró mayor tiempo referido a ascenso en retroceso, en ratones expuestos diariamente a 5g/Kg de CAT por 90 días, la 10^{ma} y 11^{era}

semana de estudio con una brusca caída la semana siguiente a la elevación, (12^{da} en machos y 11^{era} en hembras) en comparación con los controles una diferencia significativa ($p < 0,05$; regresión múltiple) en el tiempo de “ascenso en retroceso” en función al tiempo de monitorización, siendo mayor las primeras semanas del estudio. **Figura 3.12.**

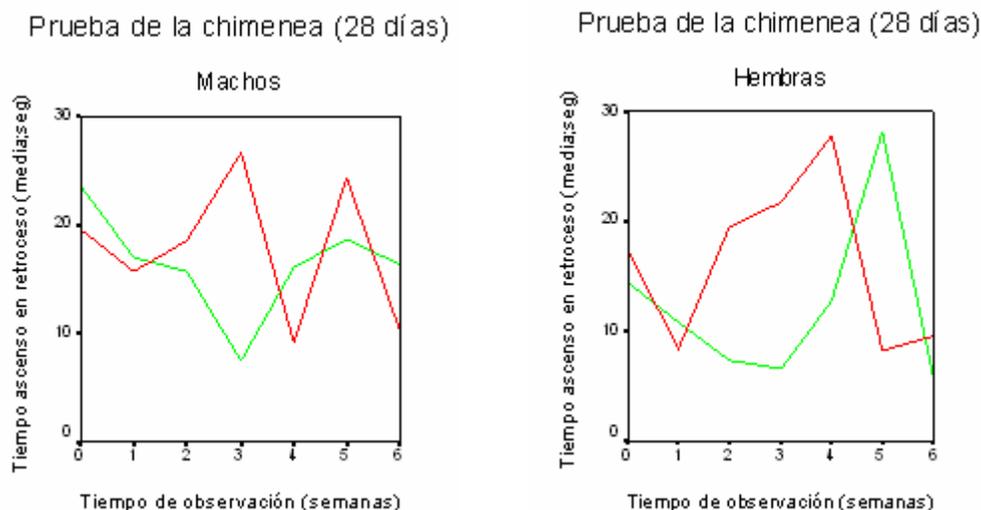


Figura 3.11 Media del tiempo de “ascenso en retroceso” de ratones hembra (izquierda) y macho (derecha) expuestos a CAT [(—) 5g/kg; n=13] en comparación con los grupos control [(—) 0 g/Kg; n=5 (0,15 mL del vehículo) durante 28 días.

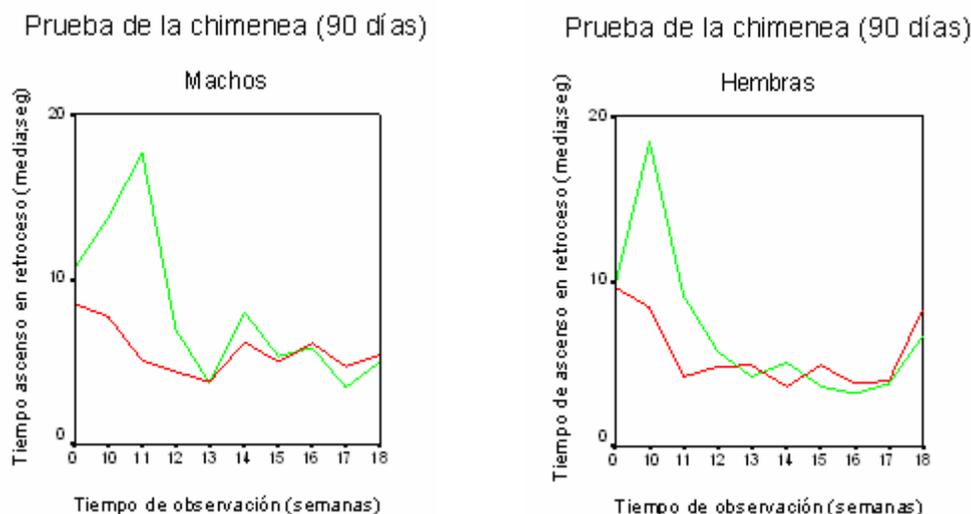


Figura 3.12 Media del tiempo de “ascenso en retroceso” de ratones hembra (izquierda) y macho (derecha) expuestos a CAT [(—) 5g/kg; n=13] en comparación con los grupos control [(—) 0g/Kg; n=5 (0,15 mL del vehículo) durante 18 semanas divididas en 9 etapas del estudio.

Este aumento en el tiempo de “ascenso en retroceso” supondría una disminución de la fuerza muscular, tono y coordinación de movimientos, en animales inoculados con CAT, sin embargo los resultados de la 10^{ma} y 11^{era} semanas de observación no aseveran detrimento de los parámetros antes mencionados por el contrario su conducta fue similar a la de los animales control durante el resto del ensayo.

Probablemente la presencia de elevación en el tiempo de superación de la prueba por ratones hembra se presente por factores ajenos a la exposición al CAT.

Prueba de campo abierto con agujeros “Hole board test”

Los ratones expuestos a 5g/Kg del CAT presentan una diferencia significativa ($p < 0,05$; t de Student), en el número de “head dips” los cuales son inferiores en comparación con los ratones control que ascienden, en el transcurso del ensayo, esta diferencia es significativa ($p < 0,05$; anova) al igual que la diferencia ($p < 0,05$; regresión múltiple) existente en función al tiempo de exposición, manteniendo similar número de “head dips” al final como al principio del ensayo contrariamente a lo observado en los controles. Por lo tanto la exposición al extracto de CAT podría provocar un comportamiento exploratorio pasivo frente a situaciones que estimularían a ratones no tratados sometidos a un ambiente novedoso, por lo que podría existir un efecto sedativo en ratones. **Figura 3.13**

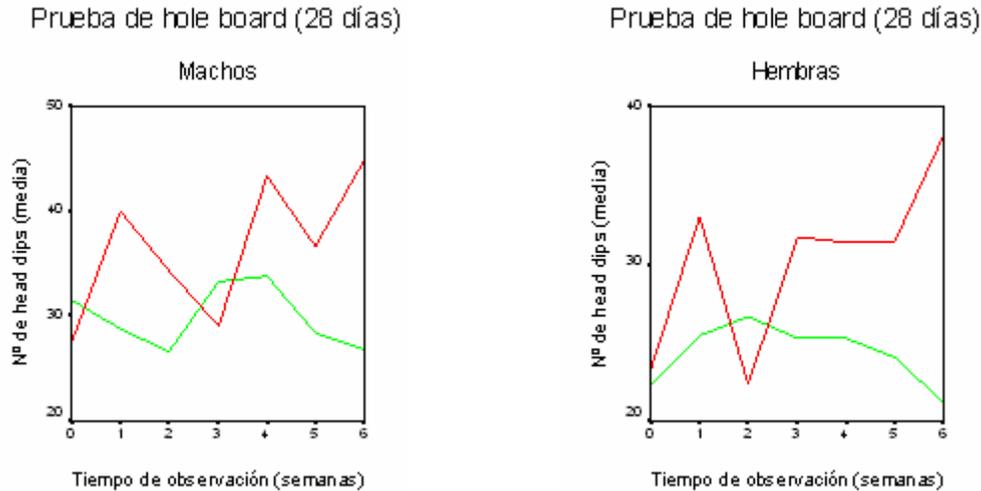


Figura 3.13 Número de head dips de ratones hembra (izquierda) y macho (derecha) expuestos a CAT [(-) 5g/kg; n=13] en comparación con los grupos control [(-) 0g/Kg; n=5 (0,15 mL del vehículo)] durante 28 días divididos en 7 etapas del estudio.

3.7 *Peso corporal*

En cuanto al peso corporal total, los ratones expuestos a dosis únicas de CAT (1,5;5 y 10g/Kg) muestran un aumento progresivo principalmente en machos, sin embargo entre los animales tratados y los controles no existe diferencia significativa (t de Student). Por lo tanto la ganancia de peso en los ratones no se vio alterada en individuos inoculados con dosis únicas de CAT (1,5; 5 y 10g/Kg).

Figura 3.14 y 3.15

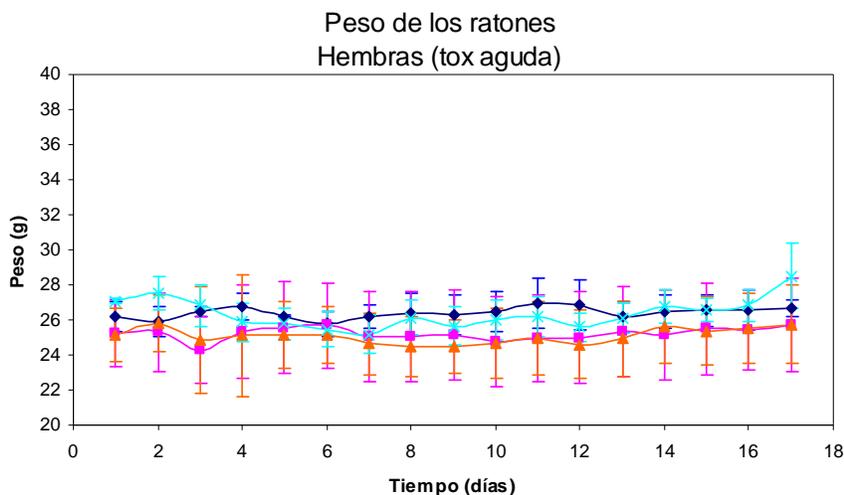


Figura 3.14 Media del peso corporal de los grupos de ratonas hembras inoculadas v.o. a dosis únicas de CAT [(—) 1,5; (—)5 y (—)10g/Kg; n=5] en comparación con los controles [(—)0g/Kg; n=3], monitoreados durante 17 días posteriores. Toxicidad aguda.

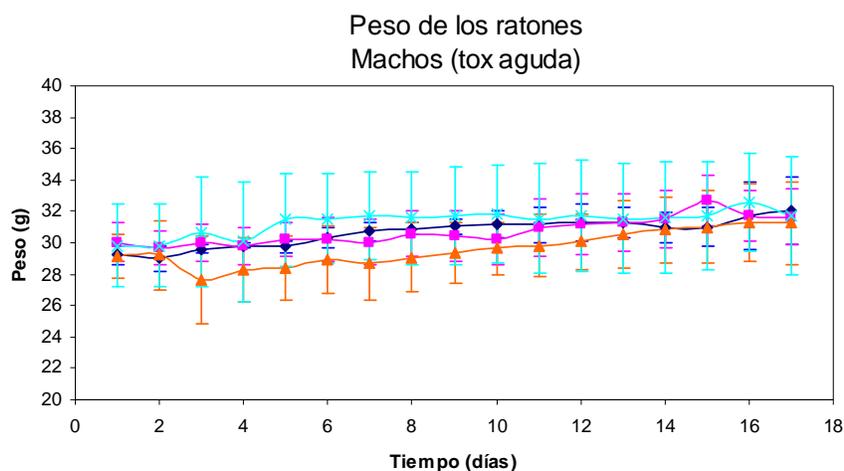


Figura 3.15 Media del peso corporal de los grupos de ratones machos inoculados v.o. a dosis única de CAT [(—) 1,5; (—)5 y (—)10g/Kg; n=5] en comparación con los controles [(—)0g/Kg; n=3], monitoreados durante 17 días posteriores. Toxicidad aguda.

El grupo de ratones expuestos 28 días v.o. a 5g/Kg de CAT frente al grupo control, no presentó diferencia significativa (t de Student) en hembras ni en machos, lo que permite sugerir descartar efectos tóxicos por ser usado este parámetro como indicador de efectos adversos de drogas y químicos^{57, 58, 59}.

Figura 3.16 y 3.17

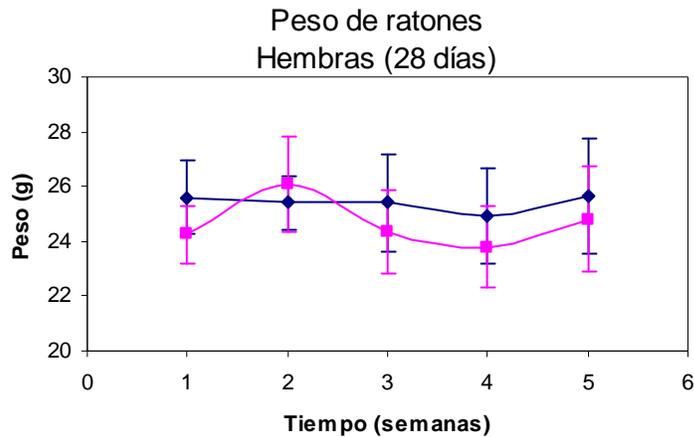


Figura 3.16 Media del peso corporal de los grupos de ratones hembras expuestas a dosis diarias v.o. de CAT [(–) 5g/Kg; n=5], frente a los controles [(–) 0g/Kg; n=5], durante 28 días.

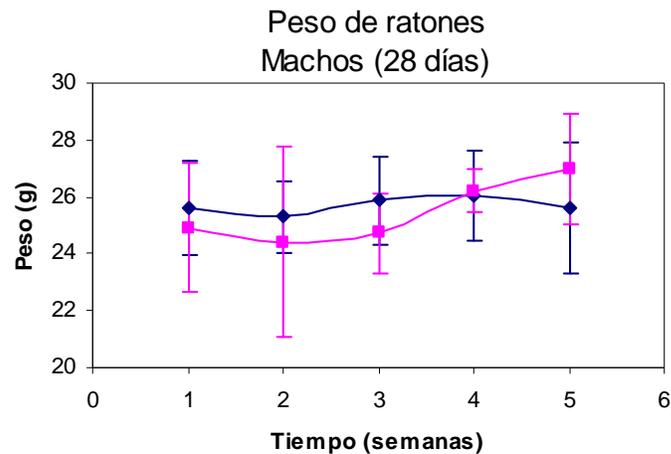


Figura 3.17 Media del peso corporal de los grupos de ratones machos expuestos a dosis diarias v.o. de CAT [(–) 5g/Kg/día; n=5], frente a los controles [(–) 0g/Kg/día; n=5], durante 28 días.

En los animales expuestos 90 días v.o. a 5g/Kg de CAT durante 18 semanas se observa un aumento significativo ($p < 0,05$; t de student) del peso corporal frente al grupo control las ultimas 6 semanas del ensayo en ratones machos por el contrario en ratones hembras muestran un incremento que no es

estadísticamente significativo con relación a sus controles (t de Student). **Figura 3.18 y 3.19**

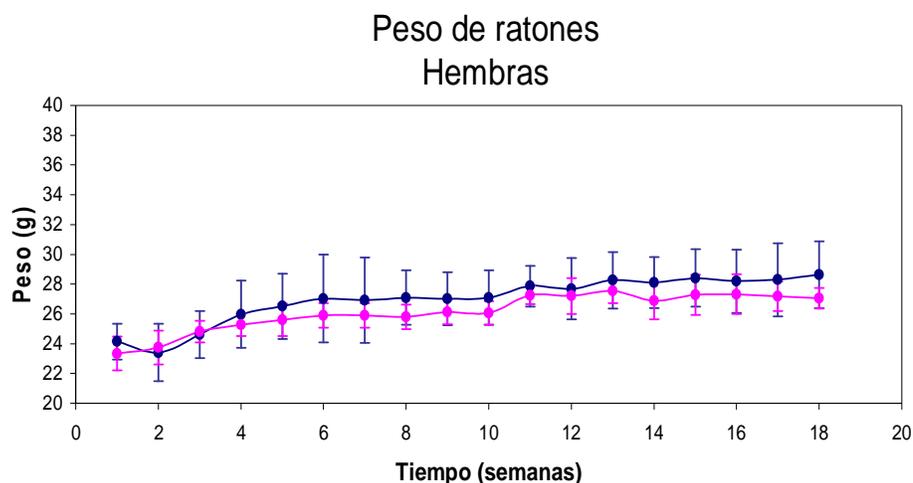


Figura 3.18 Media del peso corporal de los grupos de ratonas hembras inoculadas v.o. con dosis diarias [(—)control = 0g/Kg/día n = 5; (—)CAT = 5g/Kg/día; n=13] durante 18 semanas. Toxicidad subcrónica.

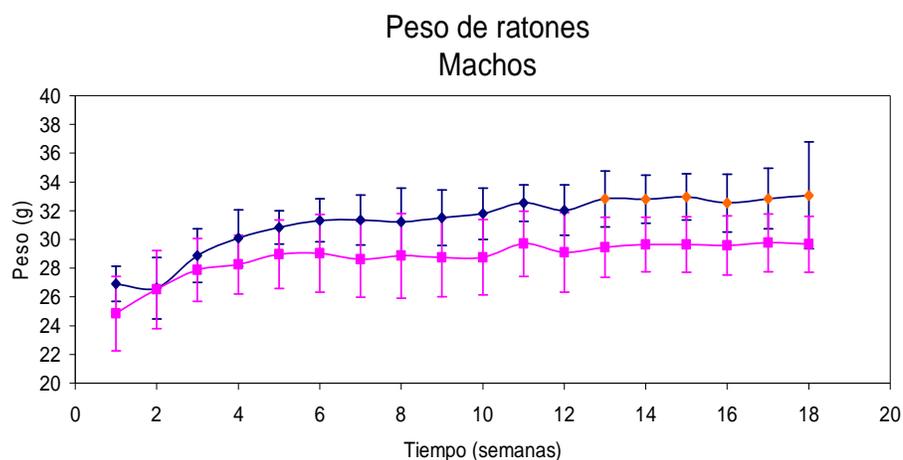


Figura 3.19 Media del peso corporal de los grupos de ratones machos inoculados v.o. con dosis diarias [(—)control = 0g/Kg/día n = 5; (—)CAT = 5g/Kg/día; n=13] durante 18 semanas. Toxicidad subcrónica. (•) La diferencia es estadísticamente significativa frente al control ($p < 0,05$; test de t de Student).

La disminución de la ganancia de peso en la segunda semana del estudio podría deberse a la sensación de saciedad o plenitud causada por la presencia de

la preparación del CAT provocando pérdida del apetito⁶⁰. Sin embargo es más notorio el aumento significativo del peso en machos las últimas semanas del estudio tomando en cuenta los resultados del consumo de alimentos que por el contrario disminuyen las últimas semanas, probablemente este resultado se presente por un posible efecto metabólico.

3.8 Estudio de órganos

La autopsia de los ratones expuestos a una dosis de 10g/Kg v.o. reveló presencia de neumatosis gastrointestinal y vasos mesentéricos dilatados, según el examen macroscópico los órganos no presentaron alteraciones morfológicas de los ratones sometidos a diferentes dosis de CAT en comparación con los controles.

En cuanto a la variación de peso de los órganos de ratones expuestos a dosis únicas de 1,5; 5 y 10g/Kg de CAT se observa diferencia significativa ($p < 0,05$; t de student) en riñones de machos expuestos a 5g/kg comparados con los controles 0g/Kg, siendo mayor el peso de los riñones de ratones tratados en 16% aproximadamente. **Figura 3.20, 3.21 y 3.22.**

Por otro lado los órganos de los ratones expuestos durante 28 días v.o. a 5g/Kg de CAT frente a los grupos control tampoco presentaron alteraciones macroscópicas morfológicas ni diferencia significativa en el peso de los órganos, excepto en riñones de machos ($p < 0,05$; t de Student), cuyo promedio de peso fue superior en 8% en comparación con los controles. **Figura 3.23, 3.24 y 3.25.**

En el estudio de toxicidad subcrónica el peso de los órganos de ratones expuestos 90 días v.o. a 5g/Kg de CAT no presentó diferencias significativas ($p < 0,05$; t de Student), excepto en intestinos de machos con un peso superior en 15% frente a los controles. **Figura 3.26 y 3.27.** En la autopsia no se encontraron alteraciones macroscópicas, no obstante en los animales que murieron antes de finalizado el estudio (9^{na} y 17^{ma} semanas) se encontró bazo de color rojo claro a diferencia de los controles cuya coloración es rojo vino, además de vasos mesentéricos dilatados.

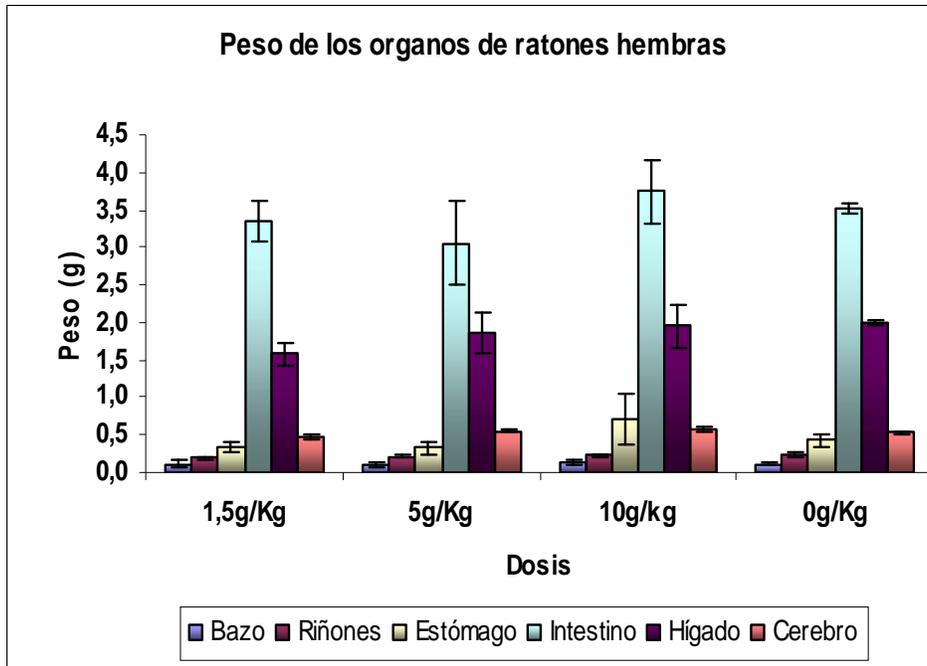


Figura 3.20 Media del peso de los órganos de ratones hembras inoculadas con CAT (1,5; 5 y 10 g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=3), monitoreados durante los 16 días posteriores. Toxicidad aguda.

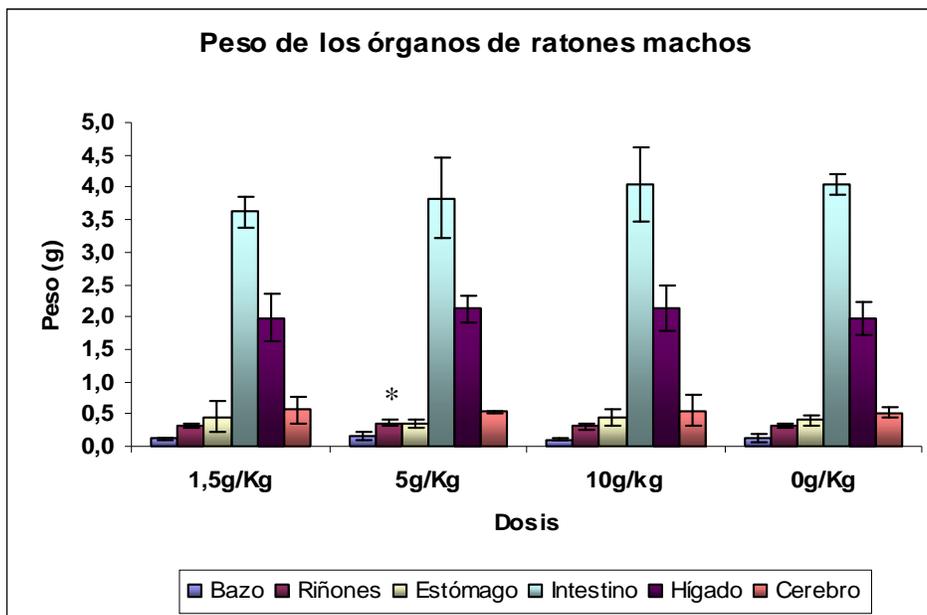


Figura 3.21 Media del peso de los órganos de ratones machos inoculados con CAT (1,5; 5 y 10 g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=3), monitoreados durante los 16 días posteriores. Toxicidad aguda. (*) La diferencia es estadísticamente significativa frente al control ($p < 0,05$; test de t de Student).

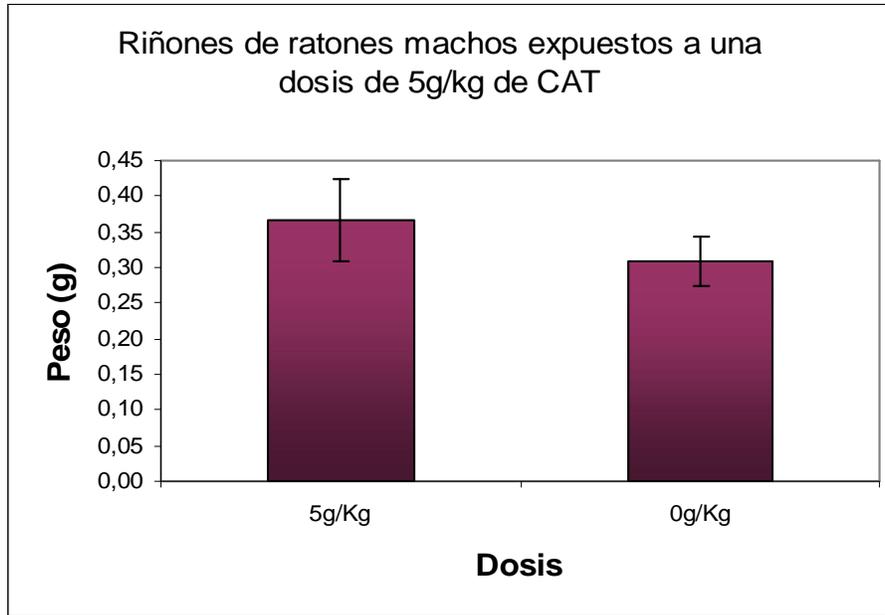


Figura 3.22 Media del peso de los riñones de ratones machos inoculados con CAT (5g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=3), monitoreados durante los 16 días posteriores. Toxicidad aguda.

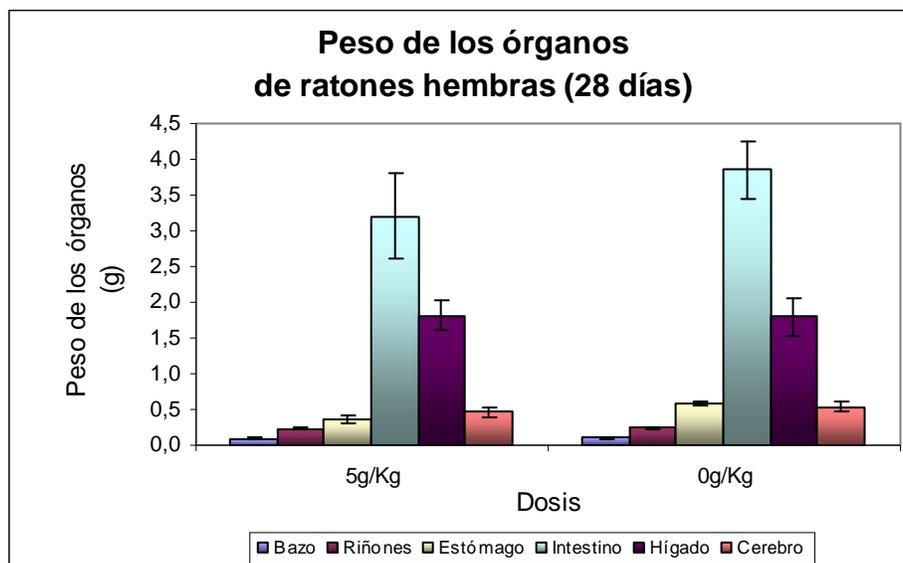


Figura 3.23 Media del peso de los órganos de ratones hembras inoculadas con CAT (5g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=5), durante 28 días.

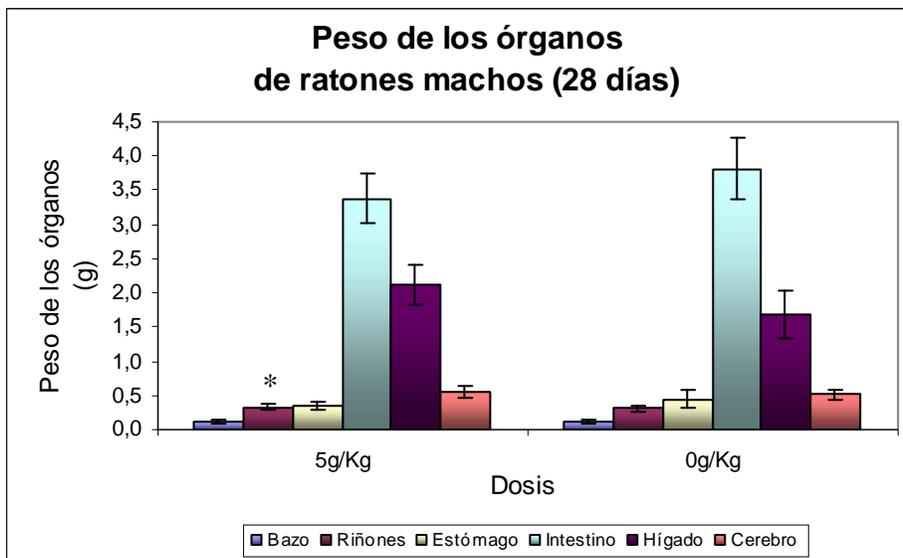


Figura 3.24 Media del peso de los órganos de ratones machos inoculados con CAT (5g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=5), durante 28 días. (*) La diferencia es estadísticamente significativa frente al control ($p < 0,05$; test de t de Student).

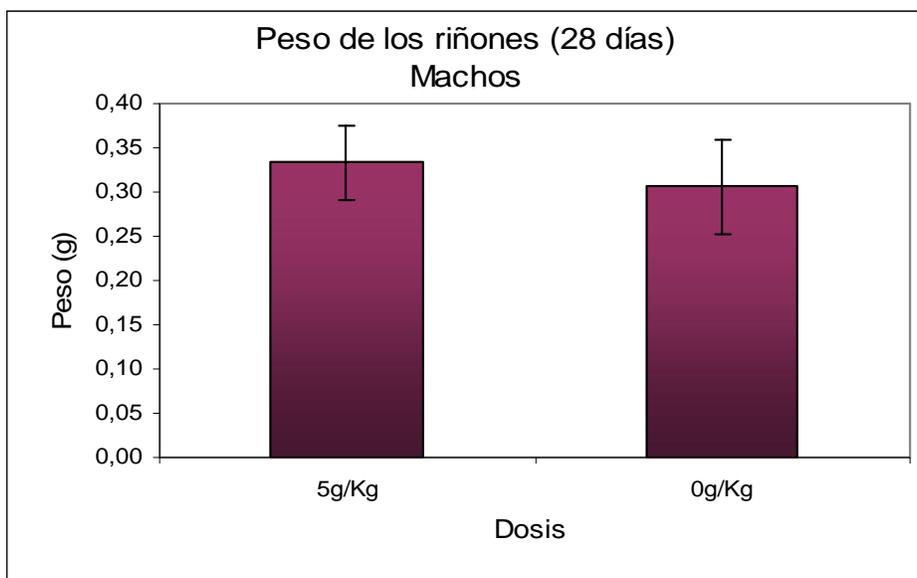


Figura 3.25 Media del peso de los riñones de ratones machos inoculados con CAT (5g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=5), durante 28 días. (*) Existe una diferencia estadísticamente significativa frente al control ($p < 0,05$; test de t de Student).

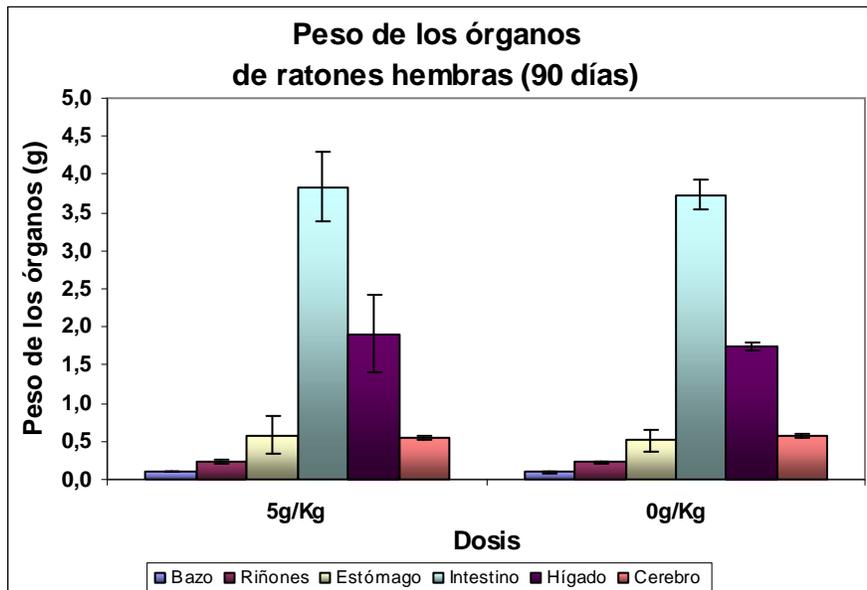


Figura 3.26 Media del peso de los órganos de ratones hembra inoculadas con CAT (5g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=5), 90 días. Toxicidad subcrónica.

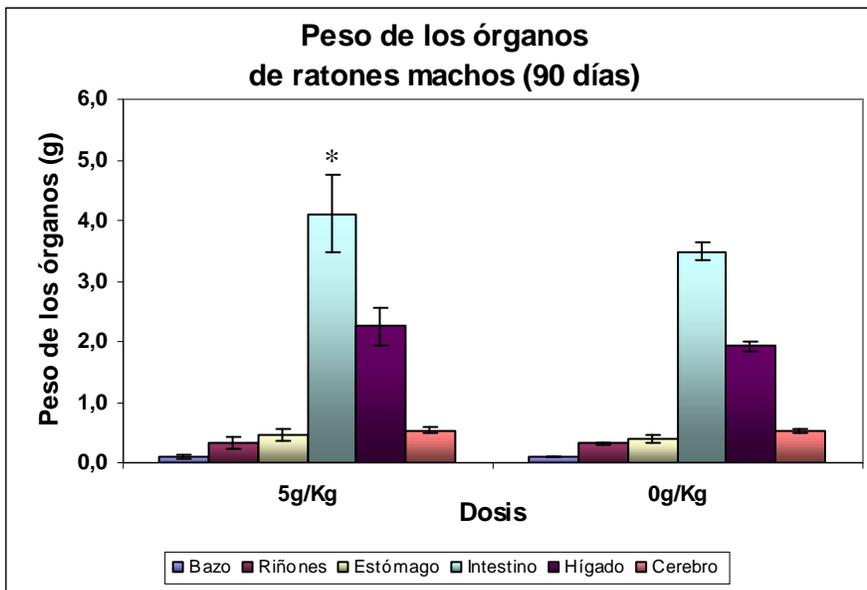


Figura 3.27 Media del peso de los órganos de ratones machos inoculados con CAT (5g/Kg; n=5) frente a los controles (0g/Kg; n=5), 90 días. Toxicidad subcrónica. (*) La diferencia es estadísticamente significativa frente al control ($p < 0,05$; test de t de Student).

3.9 Histopatología

Según los análisis histopatológicos en el estudio de toxicidad aguda al nivel de dosis más alto 10g/Kg, v.o. de CAT, **Tabla 3.9**, se observa en riñones, congestión marcada a nivel glomerular y hemorragia renal, **Figura 3.28B**. Los demás tejidos se mantuvieron normales en relación a los tejidos de los órganos control. En el estudio de toxicidad por administración continua v.o. de 5g/Kg durante 28 días también se observó congestión glomerular de gran magnitud y edema renal, **Figura 3.28C**, en los demás órganos estudiados no se observó diferencia estructural en comparación con los ratones control. Sin embargo en el estudio de toxicidad subcrónica por administración continua de 5g/Kg de CAT/día, 90 días, se observó congestión glomerular marcada y degeneración vacuolar renal detectado en machos pero no en hembras, **Tabla 3.9**, **Figura 3.28D** y **Figura 3.29B**, además a nivel de hígado se observó congestión venocentrolobulillar marcada, foco de necrosis hepatocelular con infiltrado de mononucleares y linfocitos intrasinusoidales, **Figura 3.30**. Por lo tanto se presume exista daño a nivel de riñones de ratones debida a una o múltiples exposiciones a niveles altos de CAT y probablemente también exista daño a nivel de hígado por exposición crónica a dosis altas (5g/Kg).

Tabla 3.9 Estudio histopatológico de los órganos de ratones expuestos a CAT.

Estudio	Dosis diaria	Cantidad total administrada	Hígado	Estomago	Cerebro	Bazo	Riñón
Toxicidad aguda (dosis única) machos y hembras	10g/Kg/p.c.	0,2g	N	N	N	N	Congestión a nivel glomerular
Toxicidad a dosis continua 28 días machos y hembras	5g/Kg/p.c.	2,8g.	N	N	N	N	Congestión a nivel glomerular
Toxicidad a dosis continua 60 días machos y hembras	5g/Kg/p.c.	6g	N	N	N	N	N
Toxicidad a dosis continua 90 días hembras	5g/Kg/p.c.	9g	N	N	N	N	N
Toxicidad a dosis continua 90 días machos	5g/Kg/p.c.	9g	Congestión venocentrolobulillar marcado Necrosis hepatocelular con infiltrado de mononucleares, linfocitos intrasinusoidales	N	N	N	Congestión glomerular marcada Degeneración vacuolar

N = Normal con relación a los controles

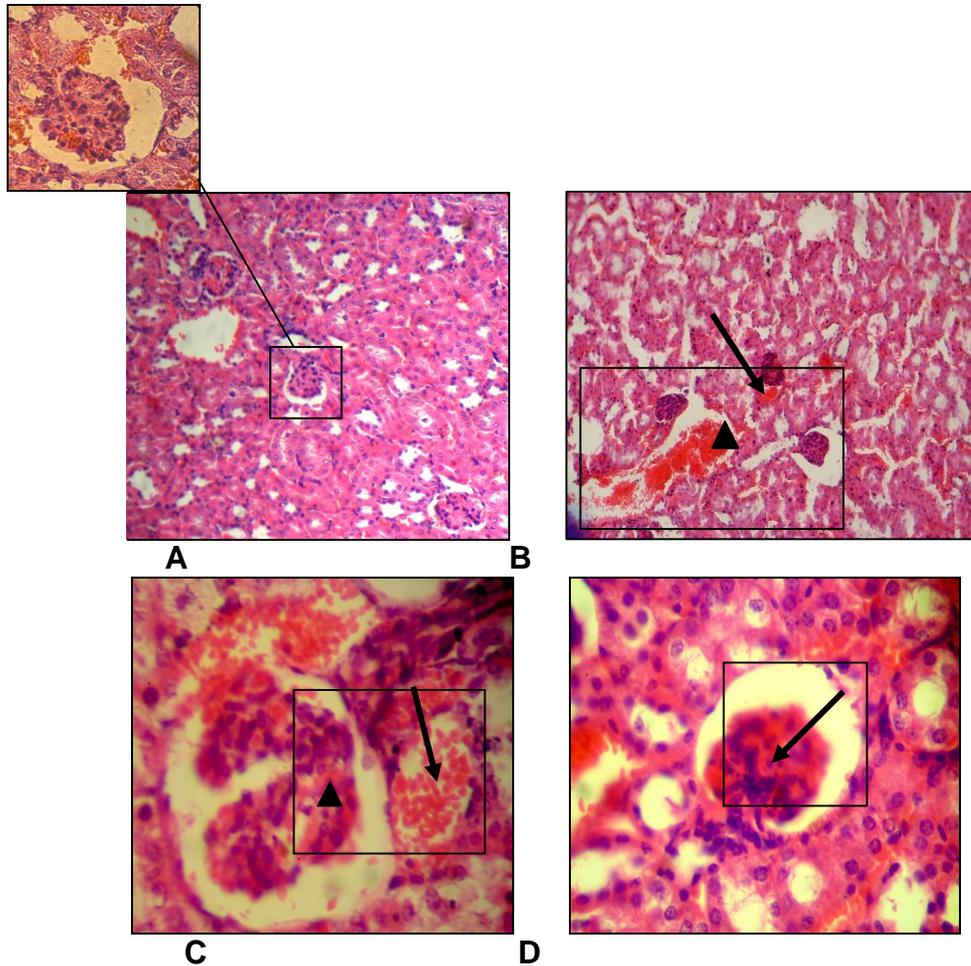


Figura 3.28. A) Riñón de ratón control. B) Riñón de ratón expuesto a una dosis de 10 g/Kg de CAT, sacrificado el 17^{mo} día de observación. El corte histopatológico presenta congestión, conductos con glóbulos rojos (triángulo) y glomerulos con glóbulos rojos en túbulos vecinos (flecha). C) Riñón de ratón expuesto a una dosis de 5g/Kg de CAT durante 28 días, sacrificado tras la 28^{va} dosis. El corte histopatológico presenta congestión glomerular (triángulo) con hemorragia en la parte periférica en los túbulos (flecha). D) Riñón de ratón macho expuesto a dosis diaria de 5g/Kg de CAT por 90 días, sacrificado la 18^{va} semana del ensayo. El corte histopatológico presenta congestión glomerular grave.

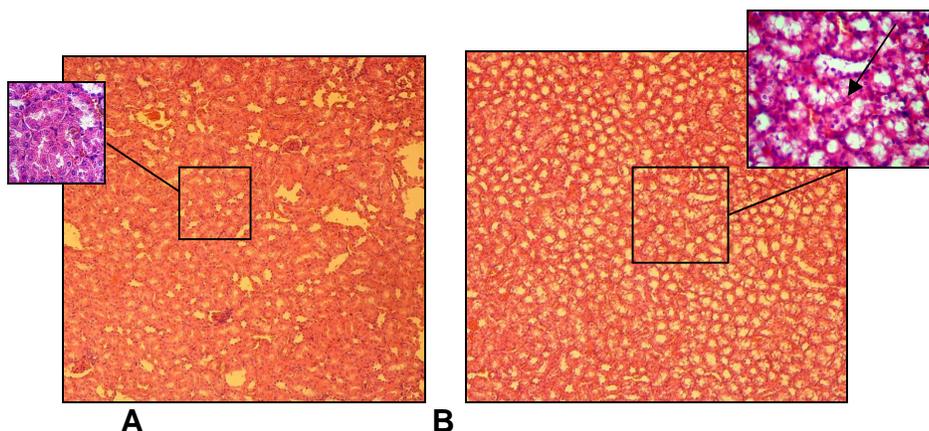


Figura 3.29. A) tejido de riñón normal de ratón control B) riñón de ratón macho expuesto a una dosis de 5g/Kg de CAT durante 90 días, sacrificado a la 18^{va} semana del ensayo. (Cuadro pequeño, derecha) el corte histopatológico presenta, zona de degeneración vacuolar o hidrópica en los túbulos urinarios (flecha).

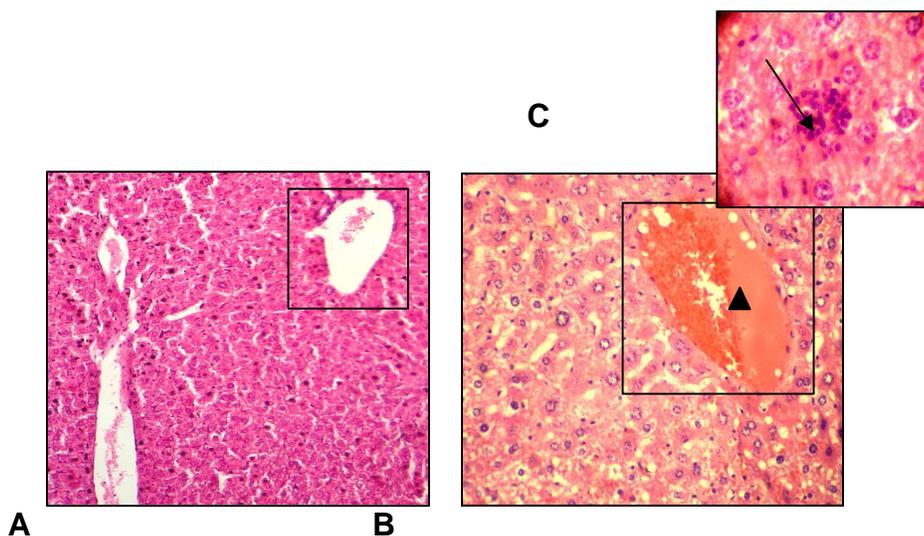


Figura 3.30. A) hígado de ratón control B) hígado de ratón macho expuesto a dosis de 5g/Kg de CAT por 90 días, sacrificado el 18^{va} semana del estudio. El corte histopatológico presenta hígado con congestión venosa centrilobulillar grave (triangulo). C) (Cuadro pequeño), el corte histopatológico presenta foco de necrosis hepatocelular con infiltrado inflamatorio de linfocitos y macrófagos (flecha).

Después de administrar v.o. 5g/Kg de CAT 90 días con una cantidad total de 9g de CAT a ratones de 20g de peso promedio, se obtuvo una concentración

de 1,276 ug/mL en plasma a 24h posteriores a la última administración que se mantuvo constante los once días siguientes, **Tabla 3.10**, por lo cual se presume exista una retención de CAT, que podría ser un tejido de almacenamiento o unión a proteínas que permitan lecturas constantes por la liberación paulatina de CAT hacia la sangre aún después de 11 días sin exposición al fármaco.

Tabla 3.10 Concentración de alcaloides a diferentes días después de la administración de CAT por 90 días.

Tiempo (días)	Concentración acumulada (µg/mL)
1	1,276
9	1,256
10	1,306
11	1,182

Toxicocinética

Como lo demuestra la **Tabla 3.11**, se han determinado los parámetros cinéticos los modelos murinos y se observó una absorción que se mantuvo casi constante desde la primera a la séptima hora después de la administración con una concentración máxima a las 9h a 2,54µg/mL, AUC_{0-∞} de 22,505µg h/mL y una vida media de 10,46 h. **Figura 3.31**.

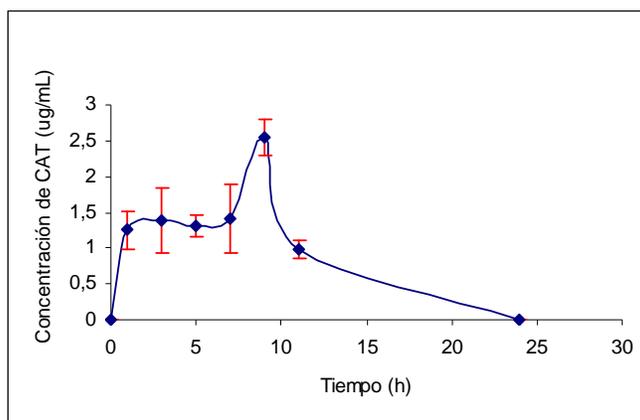


Figura 3.31 Media de la concentración en plasma vs tiempo posterior a la administración v.o. de 5g/Kg (equivalente a 100mg de CAT). Cada punto representa la media y la desviación estándar de cuatro ratones.

Tabla 3.11. Parámetros toxicocinéticos en ratones inoculados con 5g/Kg (100mg) de CAT.

Parámetros cinéticos	(media, \pm D.S)
C_{max} (ug/ml)	2,543 \pm 0,25
t_{max} (h)	9 \pm 0
K_e (h^{-1})	0,480 \pm 0,0609
AUC _{0-t} (ug h/ml)	22,505 \pm 0,995
AUC _{0-∞} (ug h/ml)	22,505 \pm 0,995
$t_{1/2e}$ (h)	10,462 \pm 0,185

En el modelo conejo se obtuvo, una absorción atípica debido a bruscas disminuciones de la concentración a la tercera y séptima hora, por lo cual se presume que la absorción de CAT v.o. en modelos conejos, presenta una cinética de orden 0, donde existe tejidos de almacenamiento que podrían liberar las moléculas a la sangre de forma irregular, con una concentración máxima (C_{max}) a las 5h de 3,7 μ g/mL de CAT, AUC_{0- ∞} de 28,901 μ g h/mL y una vida media de 8,2h. Por otro lado probablemente, la variación de las concentraciones se presente a consecuencia de la absorción y eliminación a través de diferentes tejidos y consecuentemente a diferentes tiempos debida a la aparente variedad de moléculas presentes en el extracto. También se puede observar un metabolismo más rápido del extracto de CAT, aspecto reflejado en su menor $t_{1/2}$. **Figura 3.32.**

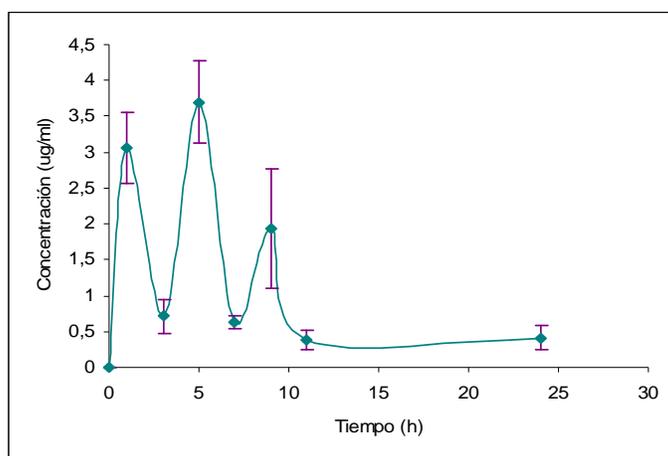


Figura 3.32 Media de la concentración en plasma vs tiempo, posterior a la administración v.o. de 1g/Kg (equivalente a 3g de CAT). Cada punto representa la media y la desviación estándar de tres conejos.

Tabla 3.12. Parámetros toxicocinéticos en conejos inoculados con 1g/Kg (3g) de CAT.

Parámetros cinéticos	(media, D.S.)
C _{max} (µg/mL)	3,700
T _{max} (h)	5
K _e (h ⁻¹)	0,0843
AUC _{0-t} (µg h/mL)	24,0840
AUC _{0-∞} (µg h/mL)	28,901
t _{1/2e} (h)	8,225

CONCLUSIONES

Se ha validado el método analítico para la determinación cuali-cuantitativa de CAT por espectrofotometría UV-Vis, la cual presenta una relación lineal entre 0,244 y 7,81µg/mL con límites de detección entre 0,516-7,81µg/mL y de cuantificación con precisión y exactitud confiable entre 1,72-7,81µg/mL que presentaron variaciones en la absorbancia influenciadas por pH a las diferentes concentraciones estudiadas y por la luz UV a 0,244µg/mL.

El estudio de toxicidad aguda por dosis oral única a diferentes niveles (1,5;5 y 10 g/Kg) de CAT en ratones, ha demostrado un favorable perfil toxicológico con un DL₅₀ por encima de 10g/Kg, el NOAEL fue de 10g/Kg, el MTD de 10g/Kg y MLD se encontraría por encima de 10g/Kg y según las observaciones clínicas durante los 16 días posteriores a la administración se observó piloerección y distensión abdominal por la consistencia de la preparación oleosa.

El estudio de toxicidad a dosis oral continua por 28 días a 5g/Kg del CAT en ratones, ha demostrado 0% de mortalidad.

El estudio de toxicidad oral subcrónica a 5g/Kg de dosis continua por 90 días de CAT en ratones, ha demostrado 92% de sobrevivencia y 8 % de mortalidad, el consumo de agua y alimentos disminuyó en función al tiempo de exposición. La concentración acumulada de CAT en suero de ratón fue de 1,276; 1,256; 1,306 y 1,182 µg/mL a 1, 9, 10 y 11 días posteriores al último día de administración.

El peso corporal no presentó variaciones en ratones expuestos a dosis oral única a diferentes niveles (1,5;5 y 10g/Kg) durante los 16 días posteriores a la inoculación, los ratones expuestos a dosis oral continua a 5g/Kg de CAT durante 28 días no presentaron variaciones frente a los controles y los expuestos a dosis oral continua durante 90 días tampoco presentaron variaciones excepto las últimas seis semanas durante las cuales los ratones machos presentaron una elevación significativa en comparación con los controles.

Según las pruebas de neurotoxicidad existió comportamiento pasivo pero se descarta alteración de la fuerza muscular, tono, coordinación de movimientos, habilidad prensil y equilibrio por exposición oral continua a 5g/Kg de CAT durante 28 y 90 días .

El estudio de órganos ha demostrado aumento de peso en los riñones de ratones machos expuestos a dosis única y dosis continua durante 28 días a 5g/Kg de CAT además se observó aumento significativo en el peso de intestinos de ratones machos expuestos a 5g/Kg por 90 días. Las características macroscópicas no se vieron afectadas.

En el estudio histopatológico se observó congestión glomerular a dosis única de 10g/Kg de CAT y a dosis continua durante 28 días a 5g/Kg, también se observó congestión venocentrolobulillar marcada y necrosis hepatocelular en ratones machos expuestos durante 90 días a la misma dosis, los demás órganos estudiados no presentaron alteraciones histológicas en comparación con los controles.

El estudio de toxicocinética realizado en ratones tras su administración oral de 5g/Kg reveló una concentración máxima de 2,54µg/mL a las 9h, AUC_{0-∞} de 22,505µg h/mL y t_{1/2} de 10,46h sin embargo las concentraciones de CAT en sangre no se encuentran dentro de los límites de cuantificación por el método de cuantificación espectrofotométrica UV-Vis, por lo cual no podemos aseverar la fiabilidad de estos parámetros.

Los valores de los parámetros obtenidos en el estudio de toxicocinética realizado en conejos por administración oral de 1g/Kg, no son concluyentes debido

a la cantidad de muestra requerida para el análisis por espectrofotometría y a las dificultades presentes en el ensayo.

RECOMENDACIONES

Es necesario realizar análisis histopatológicos más detallados y con mayor número de muestra principalmente en riñones e hígado de ratones sometidos a dosis altas de CAT además de un análisis hematológico de urea, creatinina, proteínas totales y enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (ALT, AST, fosfatasa alcalina y gamma-glutamil transpeptidasa) en ratones sometidos a dosis altas de CAT, además si fuera posible leer las concentraciones de CAT en la misma orina.

Sería necesario revisar los componentes de los excipientes, sus proporciones y reformular la suspensión para mejorar la biodisponibilidad del mismo.

Para los estudios toxicocinéticos es necesario disponer de metodologías analíticas más sensibles como la de HPLC para la cuantificación con adecuada exactitud y precisión a concentraciones menores.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ OPS-OMS. Leishmaniasis: Actualización 2007. [sede web] ; 2007 [1]. [www.ops-oms.org/spanish/ad/dpc/cd/leishmaniasis.htm].
- ² Dedet JP. "Les leishmaniosis". Paris-Francia. University Francophones.1999: 213-226
- ³ Kallunki , Jacquelyn A. A new species of Galipea (Rutaceae) from Nicaragua and Costa Rica. Brittonia. 2006;40(3): 241-244.
- ⁴ Quenevo C - CIPTA, Bourdy G - IRD, Gimenez A – UMSA. Tacana, Mayo 1999.
- ⁵ Fournet A, Hochquemiller R, Roblot F, Cavé A, Richomme P, Bruneton J. Les chimanines, nouvelles quinoleines substituées en 2 isolées d'une plante bolivienne antiparasitaire: *Galipea longiflora*. Journal of natural products.1993; 56(9): 1547-1552.
- ⁶ Salamanca E. Evaluación de la actividad biológica in Vitro sobre formas parasitarias de *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* de *Angostura longiflora* Krause Kallunki [tesina para licenciatura]. La Paz-Bolivia: Universidad Mayor de San Andrés;2005.
- ⁷ Fournet A, Angelo A, Muñoz V, Hocquemiller R, Roblot F, Cavé A, et al. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. Phytotherapy research. 1994;8:174-178.
- ⁸ Fournet A, Vangneur B, Richomme P, Bruneton J. Aryl-2 et alkyl-2 quinoleines nouvelles isolées d'une Rutace bolivienne: *Galipea longiflora*. Canadian.Journal of chemistry. 1989;67:2116-2118.
- ⁹ Fournet A, Gantier JC, Gautheret A, Leysalles L, Munos MH, Mayrargue J, et al. The activity of 2- substituted quinoline alkaloids in BALB/c mice infected with *Leishmania donovani*. Journal of antimicrobial chemotherapy.1996; 40(11):2447-2451.
- ¹⁰ Fournet A, Angelo A, Muñoz V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of bolivian medicinal plants. Journal of ethnopharmacology. 1994; 41 (19-37)
- ¹¹ Gantier JC, Fournet A, Muñoz MH, Hocquemiller. The effect of some 2-substituted quinolines isolated from *Galipea longiflora* on *Plasmodium vinckei petteri*, infected mice. Planta médica. 1996, (62)3:285-286.
- ¹² Giménez A, Avila JA, Ruiz G, Paz M, Udaeta E, Ticona JC, et al. Estudios químicos, biológicos y farmacológicos de *Galipea longiflora* Krause. Revista Boliviana de Química. 2005;22(1): 94-107.
- ¹³ Pivetta O. El nacimiento de una nueva molécula. Instituto de genética médica. Argentina. 2001
- ¹⁴ Dan Luckabaugh JE. Manual del centro para la evaluación e investigación de fármacos (CDER). Food and drug administration. 1998:1-90.
- ¹⁵ ICH, Note for guidance on toxicokinetics: The assessment of systemic exposure in toxicity studies S3A. Japan and USA. 1994.
- ¹⁶ Validation of analytical procedures part I. Definitions and methodology ICH. Harmonised Tripartite Guideline.1995.(2-6)
- ¹⁷ Validation of analytical procedures part II. Methodology, ICH. Harmonised Tripartite Guideline.1995.(8-15)

-
- ¹⁸ United States Pharmacopeial convention, INC. Validation of compendial methods. The United States Pharmacopeia 27. Rockville: National publishing, Philadelphia, PA; 2004. 2622-2625.
- ¹⁹ Castillo B, González R. Protocolo de validación de métodos analíticos para la cuantificación de fármacos. Revista Cubana de Farmacia.1996;30(1): 1-7.
- ²⁰ Guía de validación para métodos analíticos. [sede web]; 1998. [1-17]. [www.ministeriodesalud.go.cr/ protocolos/guía validaciónmetodos analiticos .pdf].
- ²¹ Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewban RK, Godfrey C, Holgale B, et al. Refinando los procedimientos para la administración de sustancias. Laboratory Animals. 2001;35 :1-41
- ²² Diehl KH, Hull R, Morton D, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood including routes and volumes. Journal of Applied Toxicology. 2001; 21:15-23
- ²³ OECD, Metodo B.1 BIS. Toxicidad oral aguda. Método de dosis fijas OECD TG 420. 2001
- ²⁴ Lipnick RL, Cotruvo JA, Hill RN, Bruece RD, Stitzel KA, Wlaker AP, et al. Comparison of the up-and-down, conventional LD₅₀ and fixed-dose acute toxicity procedure. Food and Chemical Toxicology.1995;33(3):223-231
- ²⁵ Gisbert C, Medicina legal y toxicología.6^{ta} ed. Barcelona: Maisson; 2004.
- ²⁶ OECD. Guidance document on the recognition, assessment and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation. Environmental health and safety monograph series on testing and assesment N19. 2000.
- ²⁷ Mukinda JT, Syce JA. Acute and chronica toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. Journal of Ethnopharmacology. 2007; 112, 138-144
- ²⁸ OECD. Toxicidad oral por administración continuada (90 días) en roedores, OCDE TG 408.1998
- ²⁹ Toxicidad por administración continuada (28 días) por vía oral OECD 407
- ³⁰ OECD. B43. Estudio de neurotoxicidad en roedores. Método de ensayo de la OECD TG 424.1997
- ³¹ Labaune JP. Manual de farmacocinética.1^a Ed. Barcelona: Masson; 1991
- ³² Florez J. Farmacología humana. 3^a Ed.Barcelona: Masson;1998
- ³³ Jing Q, Shen Y , Ren F, Chen J, Jiang Z , Peng B , LengY , Dong J. HPLC determination of anethole trithione and its application to pharmacokinetics in rabbits. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2006; 42: 613–617.
- ³⁴ Quino I, Choque R, Cáceres LF. Validación de una nueva determinación espectrofotométrica para dipirona en fármacos. Revista Boliviana de Química. 2005;22(1):64-70.
- ³⁵ Rodríguez BA. Estudio de preformulación en una forma farmacéutica semisólida de uso tópico para el extracto orgánico y concentrado de alcaloides totales de la especie *Galipea longiflora* Krause Kallunki “Evanta” [Tesis para maestría]. La Paz-Bolivia. Universidad Mayor de San Andrés.
- ³⁶ A Wade, PJ Weller. Handbook of pharmaceutical excipients. 6^{ta} Ed. Londres-Inglaterra. 1994.204-206, 375-378.
- ³⁷ Olivares GA, Manual para el manejo de animales de laboratorio, Villahermosa, Tabasco, 1996, Capítulos I,II,VI

-
- ³⁸ OECD Guidance document on the recognition, assessment, and use of clinical signs as humane endpoints for experimental animals used in safety evaluation
- ³⁹ M.H. Malone. Pharmacological approaches to natural product screening and evaluation. 1977.
- ⁴⁰ Sendberg F. Screening farmacológico de las plantas medicinales. Universidad de Uppsala, Suecia.
- ⁴¹ Turner, Robert A, Screening methods in pharmacology. 1Ed. New York- London. Academic Press. 1965.
- ⁴² Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte I, Laboratory Animals. 1986.
- ⁴³ Close B, Banister K., Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J. Recomendaciones para la eutanasia de los animales de experimentación: parte II. Laboratory Animals. 1986
- ⁴⁴ Avila JA. Estudios de toxicidad y toxicocinética del extracto crudo de *Galipea longiflora* Krause Kallunki en animales. [Tesis para maestría]. Sucre-Bolivia. UASB
- ⁴⁵ Moser VC, McDaniel KL, Phillips PM. Rat strain and stock comparisons using a functional observational battery: Baseline values and effects of amitraz . Toxicology and Applied Pharmacology. 1991;108:267-283
- ⁴⁶ IPCS. Principles and methods for the assessment of neurotoxicity associated with exposure to chemicals. Environmental health criteria document . 1986; 60.
- ⁴⁷ Lal J, Mehrotra N, Gupta RC. Analysis and pharmacokinetics of bulaquine and its major metabolite primaquine in rabbits using an LC-UV method-a pilot study. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2003; 32:141-150.
- ⁴⁸ Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiqter LW, Tilson HA, MacPhail RC. Interlaboratory comparison of motor activity experiments: Implications for neurotoxicological assessments. Neurotoxicology and Teratology. 1991;13:599-609.
- ⁴⁹ Marques JM. Refinement of mouse husbandry for improved animal welfare and research quality [Tesis para doctorado]. Uppsala-Suecia. Swedish University of Agricultural Sciences.
- ⁵⁰ Karl T, Pabst R, and Von Hörsten S. Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research. Experimental and Toxicologic Pathology. 2003;55: 69–83.
- ⁵¹ Daugé V, Sebret A, Beslot F, Matsui MDT, and Roques BP. Behavioral profile of CCK2 receptor deficient mice. Neuropsychopharmacology. 2001;(5)5:690-698.
- ⁵² Luna Lee G. Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology. Centro de gastroenterología (Proyecto JICA). 3rdEd. Mc Graw-Hill. 1968
- ⁵³ OECD (1998). Harmonized integrated hazard classification for human health and environmental effects of chemical substances as endorsed by the 28th joint meeting of the chemicals committee and the working party on chemicals in november 1998. [<http://webnet1.oecd.org/pages/home/displaygeneral/0,3380,EN-documents-521-14-no-24-no-0,FF,html>]. (11)

-
- ⁵⁴ Surós J y Surós A. *Semiología médica y técnica exploratoria*. 7^a Ed. JGH editores. 1997.
- ⁵⁵ Hilaly EJ, Israili ZH, Lyoussi B. Acute and chronic toxicological studies of *Ajuga iva* in experimental animals. *Journal of Ethnopharmacology*. 2004 ;91, 43-50
- ⁵⁶ Grossman HC, Hale G, Light K, Kolata S, Townsend DA, Goldfarb Y et al. Pharmacological modulation of stress reactivity dissociates general learning ability from the propensity for exploration. *Behavioral Neuroscience*. 2007;121(5):949–964
- ⁵⁷ Tofovic SP, Jackson EK. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. *Journal et Cardiovascular Pharmacology*. 1999 ;33, 360-366.
- ⁵⁸ Raza M, Al-Shabanah OA, El-Hadiyah TM, Al-Majed AA, Effect of prolonged vigabatrin treatment on haematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Pharmaceutica*. 2002; 70, 135–145.
- ⁵⁹ Teo S, Stirling D, Thomas S, Hoberman A, Kiorpes A, Khetani V. A 90-day oral gavage toxicity study of D-methylphenidate and D,L-methylphenidate in Sprague–Dawley rats. *Toxicology*. 2002;179:183–196.
- ⁶⁰ Rebecca MA, Ishii Iwamoto EL, Grespan R, Nakamura CRK, Caparroz-Assef SM, Palazzo de Mello JC. Toxicological studies on *Stryphnodendron adstringes*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2002; 83:101-104

ANEXO I

1. Ficha de observación para cada animal

FICHA DE OBSERVACIONES		DOSIS															
CODIGO		ESPECIE															
FECHA DE INICIO DEL ENSAYO		SEXO															
Tiempo		1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°	12°	13°	14°	15°	16°
S.N.C.																	
1	Actividad motora																
2	Ataxia																
3	Pérdida del ref. de enderezamiento																
4	Analgnesia																
5	Pérdida del reflejo pineal																
6	Parálisis patas anteriores																
7	Parálisis patas traseras																
8	Parálisis de la cabeza																
9	Actividad prensil																
10	Temblores finos del cuerpo																
11	Temblores fuertes del cuerpo																
12	Convulsiones clónicas																
13	Convulsiones tónicas																
14	Convulsiones mixtas																
OJOS																	
15	Ptois parpebral																
16	Tamaño de la pupila																
OREJA																	
17	Palidez																
18	Cianosis																
EFFECTOS GENERALES																	
19	Salivación																
20	Erección de la cola																
21	Erección pilomotora																
22	Micción																
23	Diarrea																
24	Signo de Robichaud																
25	Movimiento circular																
26	Temperatura rectal																
EFFECTOS SUBJETIVOS																	
27	Agresivo																
28	Pasivo																
29	Temeroso																
OTRAS OBSERVACIONES																	
30	Abdomen hinchado																
31	Caquexia																
32	Constipación																
33	Tos/estornudo																
34	Acicalamiento y falta del mismo																
35	Postura de Huncled/Stiff																
36	Ictericia																
37	Peso																

2. Prueba de caída del alambre en ratones



3. Prueba de la chimenea en ratones



4. Ensayo de campo abierto con agujeros en ratones "Hole board"



ANEXOS II

1. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de CAT aplicadas al cálculo de la linealidad.

Concentración (µg/mL)	Abs
0,244	0,058
0,244	0,058
0,244	0,064
0,244	0,067
0,488	0,111
0,488	0,115
0,488	0,122
0,488	0,117
0,977	0,208
0,977	0,221
0,977	0,223
0,977	0,223
1,953	0,402
1,953	0,406
1,953	0,412
1,953	0,417
3,906	0,751
3,906	0,770
3,906	0,763
3,906	0,774
7,813	1,366
7,813	1,382
7,813	1,397
7,813	1,381

Análisis de varianza de la regresión lineal

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F	Valor crítico de F
Regresión	1	1,26983534	1,26983534	1419,51161	2,96372E-06
Residuos	4	0,003578232	0,000894558		
Total	5	1,273413572			

Análisis de residuales

Observación	Pronóstico para Y	Residuos	Residuos estándares
1	0,08836602	-0,02651602	-0,991195
2	0,13085167	-0,01492667	-0,55797374
3	0,2158228	0,0030272	0,11315963
4	0,38576524	0,02335976	0,87321096
5	0,72564994	0,03902506	1,45879544
6	1,40541933	-0,02396933	-0,8959973

2. Valores de absorbancia de distintas concentraciones de CAT

Absorbancia			Concentración ($\mu\text{g/mL}$)		
1,953	3,906	7,812	1,953	3,906	7,812
0,431	0,786	1,397	2,212	4,250	7,762
0,427	0,774	1,389	2,190	4,186	7,716
0,417	0,770	1,382	2,132	4,162	7,675
0,412	0,764	1,381	2,102	4,127	7,674
0,406	0,763	1,379	2,068	4,121	7,661
0,402	0,751	1,366	2,047	4,053	7,588
0,383	0,716	1,300	1,938	3,851	7,208
0,380	0,711	1,292	1,921	3,821	7,160
0,359	0,632	1,144	1,799	3,366	6,312
0,340	0,621	1,144	1,692	3,305	6,311
0,332	0,617	1,133	1,645	3,282	6,244
0,329	0,610	1,130	1,629	3,240	6,229

3. Valores de concentración de CAT a partir de los datos de absorbancias para el cálculo de precisión

Absorbancias					
1,953$\mu\text{g/mL}$		3,906$\mu\text{g/mL}$		7,812$\mu\text{g/mL}$	
Día 1°	Día 2°	Día 1°	Día 2°	Día 1°	Día 2°
0,402	0,380	0,751	0,716	1,366	1,300
0,406	0,383	0,770	0,711	1,381	1,292
0,412	0,380	0,763	0,785	1,397	1,379
0,402	0,427	0,774	0,764	1,381	1,389

Concentración ($\mu\text{g/mL}$)					
Día 1°	Día 2°	Día 1°	Día 2°	Día 1°	Día 2°
2,047	1,921	4,053	3,851	7,588	7,208
2,068	1,938	4,162	3,821	7,675	7,160
2,102	1,921	4,121	4,250	7,762	7,661
2,047	2,190	4,186	4,127	7,674	7,716

4. Valores de concentración de CAT a partir de los datos de absorbancias para el cálculo de repetibilidad

Absorbancias					
1,953µg/mL		3,906µg/mL		7,812µg/mL	
T - 1°	T - 2°	T - 1°	T - 2°	T - 1°	T - 2°
0,402	0,380	0,751	0,716	1,366	1,300
0,406	0,383	0,770	0,711	1,381	1,389
0,412	0,404	0,763	0,716	1,366	1,379
0,417	0,427	0,751	0,764	1,381	1,389

Concentración (µg/mL)					
T - 1°	T - 2°	T - 1°	T - 2°	T - 1°	T - 2°
2,047	1,921	4,053	3,851	7,588	7,208
2,068	1,938	4,162	3,821	7,675	7,716
2,102	2,057	4,121	3,851	7,588	7,661
2,132	2,190	4,053	4,127	7,674	7,716

5. Límites de cuantificación y detección a diferentes concentraciones de CAT en HCl 1N

µg/mL	Y _i	Ŷ _i	Y _i - Ŷ _i	(Y - Ŷ) ²
0,244	0,0619	0,0884	-0,0265	0,000704
0,488	0,116	0,131	-0,0150	0,000223
0,977	0,219	0,216	0,00301	9,0522E-06
1,953	0,409	0,386	0,0233	0,000545
3,906	0,765	0,726	0,0390	0,001522
7,812	1,381	1,405	-0,0240	0,000575
			Σ =	0,00358
			SB =	0,0299
			LOD =	0,516
			LOQ =	1,72

6. Absorbancias de distintas diluciones de CAT a distintas concentraciones de HCl 1N.

Concentración de HCl				
0,244µg/mL	0.1 N	0.5 N	1 N	1.5 N
1°	0,052	0,061	0,058	0,063
2°	0,060	0,056	0,058	0,063
3°	0,042	0,059	0,064	0,066
0,488µg/mL	0.1 N	0.5 N	1 N	1.5 N
1°	0,104	0,115	0,111	0,127
2°	0,112	0,120	0,115	0,118
3°	0,094	0,113	0,122	0,123
0,977µg/mL	0.1 N	0.5 N	1 N	1.5 N
1°	0,200	0,224	0,208	0,218
2°	0,207	0,213	0,221	0,223
3°	0,193	0,215	0,223	0,228
1,953µg/mL	0.1 N	0.5 N	1 N	1.5 N
1°	0,385	0,425	0,402	0,403
2°	0,401	0,404	0,406	0,419
3°	0,384	0,411	0,412	0,425
3,906µg/mL	0.1 N	0.5 N	1 N	1.5 N
1°	0,721	0,800	0,751	0,747
2°	0,742	0,760	0,770	0,782
3°	0,728	0,769	0,763	0,782
7,812µg/mL	0.1 N	0.5 N	1 N	1.5 N
1°	1,311	1,398	1,366	1,353
2°	1,325	1,379	1,382	1,393
3°	1,326	1,367	1,397	1,401

Análisis de varianza de las diferentes concentraciones influenciado por pH

µg/mL	F	Probabilidad	Valor crítico para F
0,244	3,608	0,065 ^a	4,066
0,488	5,119	0,029	4,066
0, 977	6,798	0,014	4,066
1,953	4,579	0,038	4,066
3,906	4,830	0,033	4,066
7,812	9,309	0,005	4,066

Los valores calculados de F presentan diferencia significativa con un $p < 0.05$, excepto en a.

7. Absorbancias de distintas diluciones de CAT en HCL 1N expuestos a diferentes tiempos de exposición

Diluciones	Tiempo de exposición a luz UV						
0,244µg/mL	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1°	0,074	0,088	0,088	0,101	0,102	0,105	0,113
2°	0,070	0,078	0,080	0,090	0,103	0,102	0,108
3°	0,055	0,065	0,077	0,083	0,090	0,099	0,108
4°	0,058	0,065	0,085	0,097	0,102	0,109	0,109
0,488µg/mL	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1°	0,139	0,146	0,149	0,149	0,154	0,153	0,162
2°	0,126	0,127	0,130	0,134	0,138	0,133	0,137
3°	0,106	0,107	0,109	0,111	0,119	0,121	0,124
4°	0,109	0,109	0,114	0,116	0,123	0,120	0,120
0,977µg/mL	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1°	0,234	0,233	0,236	0,231	0,232	0,230	0,237
2°	0,236	0,236	0,234	0,234	0,236	0,229	0,230
3°	0,201	0,202	0,200	0,198	0,198	0,197	0,198
4°	0,204	0,204	0,204	0,208	0,207	0,213	0,213
1,953µg/mL	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1°	0,431	0,433	0,431	0,428	0,424	0,752	0,578
2°	0,427	0,422	0,421	0,415	0,411	0,410	0,411
3°	0,380	0,381	0,376	0,373	0,370	0,368	0,369
4°	0,383	0,381	0,382	0,380	0,533	0,530	0,530
3,906µg/mL	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1°	0,786	0,778	0,771	0,763	0,761	0,626	0,627
2°	0,764	0,755	0,751	0,745	0,732	0,726	0,719
3°	0,716	0,708	0,700	0,692	0,687	0,678	0,675
4°	0,711	0,708	0,702	0,695	0,547	0,559	0,559
7,812µg/mL	0 min	10 min	20 min	30 min	40 min	50 min	60 min
1°	1,379	1,377	1,365	1,357	1,337	1,329	1,310
2°	1,389	1,372	1,365	1,353	1,339	1,326	1,320
3°	1,300	1,284	1,273	1,262	1,248	1,236	1,222
4°	1,293	1,276	1,268	1,258	1,241	1,230	1,230

Análisis de varianza de las absorbancias a diferentes concentraciones influenciados por la luz UV

µg/mL	F	Probabilidad	Valor crítico para F
0,244	21,269	6,506E-08 ^a	2,573
0,488	0,488	0,810	2,573
0,977	0,064	0,999	2,573
1,953	1,176	0,356	2,573
3,906	2,136	0,092	2,573
7,812	0,911	0,506	2,573

^aLos valores calculados de F presentan diferencia significativa con un $p < 0.05$

8. Absorbancias de distintas diluciones de CAT en HCl 1N expuestos a diferentes temperaturas

Dilución	Temperaturas a las cuales fueron sometidas las diluciones			
0,244µg/mL	T° amb	50 °C	80 °C	T° de eb
1°	0,052	0,052	0,053	0,056
2°	0,053	0,050	0,055	0,053
3°	0,052	0,050	0,048	0,062
4°	0,059	0,057	0,059	0,061
0,488ug/mL	T° amb	50 °C	80 °C	T° de eb
1°	0,096	0,094	0,097	0,100
2°	0,093	0,090	0,093	0,095
3°	0,096	0,092	0,092	0,093
4°	0,107	0,106	0,106	0,109
0,977ug/mL	T° amb	50 °C	80 °C	T° de eb
1°	0,175	0,175	0,183	0,189
2°	0,177	0,175	0,180	0,177
3°	0,177	0,174	0,174	0,173
4°	0,196	0,194	0,191	0,202
1,953ug/mL	T° amb	50 °C	80 °C	T° de eb
1°	0,340	0,335	0,338	0,342
2°	0,332	0,330	0,330	0,331
3°	0,329	0,324	0,324	0,326
4°	0,359	0,356	0,355	0,363
3,906ug/mL	T° amb	50 °C	80 °C	T° de eb
1°	0,632	0,621	0,623	0,623
2°	0,621	0,611	0,610	0,618
3°	0,617	0,609	0,609	0,609
4°	0,610	0,597	0,593	0,603
7,813ug/mL	T° amb	50 °C	80 °C	T° de eb
1°	1,144	1,125	1,134	1,140
2°	1,144	1,132	1,132	1,142
3°	1,133	1,121	1,119	1,118
4°	1,130	1,117	1,116	1,118

Análisis de varianza de las diferentes concentraciones influenciado por la temperatura

µg/mL	F	Probabilidad	Valor crítico para F
0,244	1,363	0,301	3,490
0,488	0,243	0,865	3,490
0,977	0,234	0,871	3,490
1,953	0,099	0,959	3,490
3,906	1,006	0,424	3,490
7,812	1,742	0,212	3,490

ANEXO III

1. Pesos de los órganos dosis única a tres niveles de CAT

ORGANOS	Peso de los órganos a diferentes dosis (g; promedio \pm D.E.)			
	1,5g/Kg	5g/Kg	10g/kg	0g/Kg
Hembras				
Bazo	0,118 \pm 0,037	0,096 \pm 0,031	0,129 \pm 0,028	0,117 \pm 0,008
Riñones	0,207 \pm 0,013	0,218 \pm 0,019	0,236 \pm 0,017	0,231 \pm 0,036
Estomago	0,331 \pm 0,071	0,326 \pm 0,073	0,721 \pm 0,344	0,431 \pm 0,087
Intestino	3,350 \pm 0,274	3,058 \pm 0,561	3,740 \pm 0,433	3,512 \pm 0,070
Hígado	1,805 \pm 0,188	1,857 \pm 0,264	1,958 \pm 0,284	1,998 \pm 0,037
Cerebro	0,494 \pm 0,031	0,548 \pm 0,021	0,567 \pm 0,028	0,527 \pm 0,026
Machos				
Bazo	0,116 \pm 0,013	0,151 \pm 0,070	0,110 \pm 0,028	0,125 \pm 0,053
Riñones	0,314 \pm 0,035	0,366 \pm 0,058 ^a	0,312 \pm 0,051	0,309 \pm 0,034
Estomago	0,459 \pm 0,230	0,352 \pm 0,052	0,454 \pm 0,134	0,406 \pm 0,080
Intestino	3,841 \pm 0,191	3,830 \pm 0,620	4,039 \pm 0,578	4,047 \pm 0,170
Hígado	1,986 \pm 0,371	2,132 \pm 0,207	2,143 \pm 0,351	1,971 \pm 0,263
Cerebro	0,562 \pm 0,206	0,528 \pm 0,028	0,552 \pm 0,248	0,520 \pm 0,071

^a La diferencia es estadísticamente significativa frente al control (test-t $p < 0,05$)



2. Peso de ratones expuestos 28 días a dosis repetida v.o. 5g/Kg de CAT

	Peso corporal (expresado en media \pm D.S., n=5)				
	Tiempo (semanas)				
	1°	2°	3°	4°	5°
Hembras control	25,60 \pm 1,358	25,40 \pm 0,986	25,40 \pm 1,776	24,95 \pm 1,738	25,667 \pm 2,099
Hembras evanta	24,25 \pm 1,047	26,09 \pm 1,732	24,35 \pm 1,495	23,80 \pm 1,490	24,817 \pm 1,927
Machos control	25,61 \pm 1,628	25,29 \pm 1,256	25,87 \pm 1,566	26,03 \pm 1,588	25,627 \pm 2,316
Machos evanta	24,92 \pm 2,247	24,40 \pm 3,335	24,72 \pm 1,383	26,22 \pm 0,736	26,953 \pm 1,949

3. Peso de los órganos de los animales en el estudio de dosis continuada durante 28 días

Pesos de los órganos (g, promedio±D.E.)		
ORGANOS	5g/Kg	0g/Kg
Hembras		
Bazo	0,096± 0,023	0,098±0,016
Riñones	0,225± 0,016	0,242±0,019
Estomago	0,362±0,046	0,590±0,035
Intestino	3,207±0,591	3,849±0,408
Hígado	1,816±0,209	1,792±0,256
Cerebro	0,464±0,075	0,541±0,076
Machos		
Bazo	0,111±0,023	0,123±0,037
Riñones	0,333±0,041 ^a	0,306±0,054
Estomago	0,350±0,051	0,450±0,141
Intestino	3,377±0,356	3,813±0,448
Hígado	2,117±0,294	1,691±0,353
Cerebro	0,541±0,091	0,513±0,071

^a La diferencia es estadísticamente significativa frente al control (test-t $p < 0,05$)

4. Peso de los órganos de hembras y machos en el estudio durante 90 días

Peso de los órganos (g; promedio ± D.E.)		
ORGANOS	5g/Kg	0g/Kg
Hembras		
Bazo	0,104 ± 0,0127	0,102 ± 0,0127
Riñones	0,230 ± 0,0344	0,229 ± 0,0129
Estomago	0,582 ± 0,248	0,52 ± 0,144
Intestino	3,838 ± 0,461	3,726 ± 0,196
Hígado	1,905 ± 0,506	1,74 ± 0,0563
Cerebro	0,554 ± 0,0310	0,574 ± 0,0183
Machos		
Bazo	0,104 ± 0,0318	0,101± 0,00985
Riñones	0,331 ± 0,0984	0,316 ± 0,0145
Estomago	0,468 ± 0,0989	0,393 ± 0,0608
Intestinos	4,114 ± 0,649 ^a	3,49 ± 0,145
Hígado	2,248 ± 0,31	1,919 ± 0,0712
Cerebro	0,534 ± 0,0475	0,529 ± 0,0232

^a La diferencia es estadísticamente significativa frente al control (test-t $p < 0,05$)

ANEXO IV

1. Valores de las absorbancias de las muestras de suero de ratones expuestos v.o. a 5g/Kg de CAT para el cálculo de los parámetros toxicocinéticos.

Absorbancias, N° de ratón				
Horas	Ratón 1	Ratón 2	Ratón 3	Ratón 4
0	0,000	0,000	0,000	0,000
1	0,024	0,016	0,027	0,020
3	0,017	0,031	0,031	0,018
5	0,020	0,023	0,022	0,026
7	0,037	0,019	0,021	0,021
9	0,040	0,045	0,042	0,050
11	0,014	0,019	0,018	0,017
24	0,000	0,000	0,000	0,000

2. Valores de las absorbancias de las muestras de suero de conejos expuestos v.o. a 1g/Kg de CAT para el cálculo de los parámetros toxicocinéticos.

Absorbancias, N° de conejo			
Horas	1	2	3
0	0,0574	0	0
1	0,2358	0,361	0,2001
3	0,0736	0,0646	0,1419
5	0,0885	0,3956	0,2235
7	0,0705	0,0947	0,0978
9	0,0715	0,0876	0,3327
11	0,0555	0,0964	0,0596
24	0,0654	0,1068	0