UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICO

FARMACOBIOLOGIA

TESIS

"DETERMINACION DE TOXICIDAD AGUDA Y CRÓNICA DE EXTRACTOS DE HOJAS DEL ARBOL FLOR DE MANITA (*Chiranthodendron pentadactylon)*"

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE QUIMICOFARMACOBIOLOGO

PRESENTA:

p.Q.F.B. ERIKA JAZMÍN MARTÍNEZ GONZÁLEZ

DIRECTORA DE TESIS

D.C BERTHA FENTON NAVARRO

Morelia, Michoacán; Mayo 2013

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Glicobiología de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo; bajo la dirección de la D.C. Bertha Fenton Navarro.

COMITÉ TUTORIAL:

- **M.C. Blanca Nateras Marín**
- **D.C. Graciela Letechipia Vallejo**
- **M.C. Manuel López Rodríguez**
- **Q.F.B. Alma Rosa García Ríos**
- **Q.F.B. Ma. De los Dolores López Calvillo**

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco a Dios y a la vida por permitirme llegar hasta donde estoy, por cumplir una de mis metas y poder cerrar un ciclo más dentro de ella.

Les agradezco a mis padres por su apoyo incondicional que siempre están ahí siempre que los necesito, para alentarme y darme ánimo.

De igual manera, gracias a mis hermanos, por no dejar que me rinda y continuar superándome en todos los aspectos de mi vida pero en especial, en lo académico.

Le agradezco especialmente a la DC Bertha Fenton Navarro por aceptarme y otorgarme este proyecto, por la paciencia y por todo el conocimiento que nos otorgó y lo que aprendí.

También les agradezco a la DC Graciela, a la MC Blanquita y a MC Manuel, que con su ayuda se pudieron realizar los experimentos y también aprendí mucho de ellos.

Por último le agradezco a mis amigos: Cecy, Cleo, Ivonne y Juan Carlos por todos los años que llevo de conocerlos y porque siempre recibí su apoyo, y por su verdadera amistad.

INDICE GENERAL **PÁG.**

INDICE DE FIGURAS i
INDICE DE TABLAS ii
LISTA DE ABREVIATURAS iii

I. RESUMEN 1

II. INTRODUCCIÓN 2

1. Plantas medicinales 2
1.1 Historia 2
1.2 Generalidades y usos 2
1.3 La medicina natural como una alternativa actual 3
1.4 La herbolaria en México 5
1.5 Definiciones de la OMS sobre la Medicina Tradicional 6

2. Árbol Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) 8
2.1 Descripción de la planta 8
2.2 Clasificación taxonómica 10
2.3 Historia 11
2.4 Usos en la medicina tradicional 11
2.5 Propiedades farmacológicas 12

3. Pigmentos vegetales 13
3.1 Clorofilas 13
3.2 Carotenoides 14

4. Flavonoides 14
4.1 Propiedades 16
4.2 Estructura y nomenclatura 16
4.3 Tipos y fuentes de flavonoides 17

5. Fitoterapia 19
5.1 Fármaco 20
5.2 Vías de administración 20

6. Lectinas 24
6.1 Especificidad a carbohidratos 24
6.2 Lectinas de plantas 25
6.2.1 Legumbres 26
6.2.2 Cereales 26
6.3 Lectinas microbianas 26
6.4 Lectinas animales 27
6.4.1 Galectinas 27
6.4.2 Lectinas tipo C 28
6.4.3 Lectinas tipo P 28
6.5 Funciones 29
6.6 Aplicaciones 31

7. Determinación de la toxicidad aguda, dosis letal media (DL50) y toxicidad crónica 32
7.1 Definiciones 32
7.2 Método de dosis fijas-Toxicidad oral aguda (OECD No. 420) y Método de dosis repetidas por 28 días. Toxicidad crónica (OECD No. 407) 33
7.3 Principio de la prueba 34
7.4 Descripción del método 35
7.5 Procedimiento 36
7.6 Estudio principal 37
7.6.1 El número de animales y dosis 37
7.7 Observaciones 38
7.8 Patología 39
7.9 Criterio para la clasificación de sustancias tóxicas 40

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 42

IV. HIPÓTESIS 43

V. OBJETIVO GENERAL 43

VI. OBJETIVOS PARTICULARES 43

VII. MATERIAL 44

VIII. MÉTODOS 44

Obtención del Extracto crudo y de la Fracción sin pigmentos 44

Remoción de lípidos 45

Cuantificación de proteínas 45

Ensayo de hemaglutinación 46

Diálisis 47

Liofilización 47

Métodos para la determinación de la toxicidad aguda y crónica 47

Método histológico para el análisis celular microscópico 50

Análisis estadístico 53

IX. RESULTADOS 54

X. DISCUSIÓN 82

XI. CONCLUSIONES 89

XII. PERSPECTIVAS 90

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 91

INDICE DE FIGURAS **PÁG.**

1) Árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) 9
2) Flor de manita 9
3) Hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) 10
4) Estructura básica de los flavonoides 15
5) Clasificación de los flavonoides de acuerdo a su grupo funcional 17
6) Representación esquemática del reconocimiento y de la especificidad de glicoproteinas 25
7) Actividad hemaglutinante del Extracto crudo 57
8) Actividad hemaglutinante del Extracto crudo F1 58
9) Actividad hemaglutinante del Extracto crudo F2 60
10) Actividad hemaglutinante de la Fracción sin pigmentos 61
11) Actividad hemaglutinante de la Fracción sin pigmentos F1 63
12) Actividad hemaglutinante de la Fracción sin pigmentos F2 64
13) Administración de la solución salina 66
14) Registro de pesos en toxicidad aguda 68
15) Registro de temperatura en toxicidad aguda 70
16) Registro de pesos en toxicidad crónica 72
17) Realización de necropsia 74
18) Extracción de tráquea, pulmones y corazón 74
19) Observación de pulmones y tráquea 75
20) Observación de hígado y bazo 75
21) Observación de riñones 76
22) Observación de varios órganos del grupo control 77
23) Observación de hígado e intestino 78
24) Observación de pulmones e hígado 78
25) Conservación de las muestras 79
26) Micrografías del análisis celular de riñón en ratas 80
27) Micrografías del análisis celular de riñón en el estudio de toxicidad crónica 81

INDICE DE TABLAS **PÁG.**

1) Funciones de algunas lectinas 30
2) Categorías de riesgo y estimación de toxicidad aguda por vía oral 40
3) Categorías y rangos para la clasificación de la toxicidad aguda por vía oral 41
4) Dosis empleadas en el ensayo de toxicidad aguda 48
5) Dosis empleadas para el ensayo de toxicidad crónica 48
6) Remoción de pigmentos de las hojas de Flor de manita 54
7) Cuantificación de proteínas de las diferentes fracciones del EC y FSP 55
8) Actividad hemaglutinante del EC de las hojas de Flor de manita 56
9) Actividad hemaglutinante del EC F1 de las hojas de Flor de manita 58
10) Actividad hemaglutinante del EC F2 de las hojas de Flor de manita 59
11) Actividad hemaglutinante de la FSP de las hojas de Flor de manita 61
12) Actividad hemaglutinante de la FSP F1 de las hojas de Flor de manita 62
13) Actividad hemaglutinante de la FSP F2 de las hojas de Flor de manita 64
14) Registro de pesos en el ensayo de toxicidad aguda 68
15) Registro de temperatura en el ensayo de toxicidad aguda 70
16) Registro de pesos en toxicidad crónica 72

Lista de abreviaturas

°C	Grados centígrados
µg	Microgramos
A.C.	Antes de Cristo
AE	Actividad específica
BSA	Albúmina de suero bovino
C	Concentración
Ca	Calcio
cm	Centímetro
CRD	Dominio de reconocimiento de carbohidratos
DE	Desviación estándar
DL50	Dosis letal media
EC	Extracto crudo
EE	Error estándar
FDA	Administración de Alimentos y Fármacos, por su siglas en inglés
FSP	Fracción sin pigmentos
Fuc	Fucosa
gr	Gramos
Gal	Galactosa
GalNAc	N-acetil galactosamina
GHS	Sistema Globalmente Aceptado, por sus siglas en inglés
HE	Hematoxilina-Eosina
kDa	kilodalton
kg	kilogramo
Log	Logaritmo
m	Metro
M	Molar

MAC´s	Medicina Alternativa Complementaria
Man-6-P	Manosa 6 fosfato
MBP	Proteína de unión a manosa
mg	Miligramo
Mg	Magnesio
mL	Mililitro
mm	Milímetro
msnm	Metro sobre el nivel del mar
nm	Nanómetro
OECD	Organización para la cooperación y desarrollo económicos
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Buffer Fosfato Salino
PG	Prostaglandinas
PHA	Fitohemaglutinina
RHL	Receptor de asialoglicoproteína hepática de conejo
rpm	Revoluciones por minuto
SBA	Aglutinina de soja
UHA	Unidades de hemaglutinación
UV	Ultravioleta
V:V	Volumen: Volumen
WGA	Aglutinina de germen de trigo

I. RESUMEN

El árbol de flor de manita es originario de México y utilizada como planta medicinal para tratar enfermedades gastrointestinales, afecciones cardiacas, para controlar la hipertensión y como tranquilizante del sistema nervioso. La farmacodinamia define y clasifica a los fármacos de acuerdo a su afinidad, potencia, eficacia y efectos relativos, uno de los índices es la determinación de la toxicidad aguda y crónica, así es posible determinar la bioseguridad de un producto y su eficacia. En el caso de los extractos de hojas de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), no se han realizado estudios respecto a la toxicidad, ni de la actividad hemaglutinante, que podría contribuir a la toxicidad de la planta, por lo que en éste trabajo se planteó estudiar éstos parámetros. Los extractos de las hojas de flor de manita presentan actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos humanos (A_1, A_2, B, O). El EC presentó mayor actividad con el grupo B, el EC F1 la presentó para los grupos B y O; el EC F2 la presentó para el grupo A_2. De igual manera la FSP mostró actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos, siendo con el grupo A_1 por el cual mostró mayor actividad; la FSP F1 lo hizo con el grupo A_2 y finalmente la FSP F2 mostró mayor actividad con los grupos B y O. Lo que demuestra que las hojas del árbol flor de manita contienen una variedad de lectinas.
En base a los parámetros de la OECD No. 420, se analizó la toxicidad aguda utilizando dosis fijas de: 19.95, 199.5, 2000, 6300, 19952 mg/kg de peso corporal; y en el ensayo de toxicidad crónica (OECD No. 407) una dosis repetida por 21 días de 200 mg/kg de peso corporal. Los resultados mostraron que el extracto crudo no es tóxico en ambas pruebas ya que no se observaron cambios conductuales, alteraciones físicas o pérdida de peso, ni variaciones de temperatura. El análisis macroscópico de corazón, pulmones, ganglios, hígado, riñón, intestino, no mostraron cambios o alteraciones en las estructuras. El análisis microscópico de riñón e hígado arrojó que los tejidos no tienen alteraciones en las dosis analizadas. El extracto crudo de las hojas del árbol flor de manita es inocuo y se determina como “no clasificado” de acuerdo a la clasificación de las sustancias según la DL50 vía oral. La presente investigación constituye el primer reporte a nivel mundial.

Palabras clave: Flor de manita, *Chiranthodendron pentadactylon,* Toxicidad aguda, Toxicidad crónica, Lectinas.

II. INTRODUCCION

1.- Plantas Medicinales

1.1 Historia

El uso de las plantas con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia. Sin los recursos que le ofreció la naturaleza, el hombre no hubiera sobrevivido. Tres mil años antes de Cristo se escribió el libro más antiguo de plantas medicinales en China; los sumerios, 2500 años A.C. usaban las plantas con fines curativos, los asirios conocían poco más de 250 hierbas medicinales, en la Grecia antigua se usaban, entre otras, la canela, el ruibarbo, la genciana y la mostaza (Hernández y col., 1981; Fonegra y col., 2007).

Gradualmente el hombre, al dominar a la naturaleza, ha roto muchos de los lazos que lo unen a ella. Hoy la medicina se vale de drogas sintéticas para aliviar todas las enfermedades. Muchas de estas drogas son benéficas, pero también muchas, por mal uso o abuso, han perdido su eficacia y en incontables casos han provocado efectos secundarios nocivos. Por fortuna en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza y por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no solo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar nuestras afecciones (Hernández y col., 1981).

1.2 Generalidades y usos

Se estima que el número de plantas superiores (angiospermas y gimnospermas) en este planeta es de 250,000, con un nivel inferior de 215,000 y un nivel superior de 500,000. De esta cantidad, solamente alrededor de 6% se le ha investigado alguna actividad biológica, y solo el 15% ha sido evaluado

fitoquimicamente. Estas estimaciones adquieren importancia cuando se considera el amplio potencial de principios activos contenidos en la naturaleza que aún no han sido identificados y mucho menos, evaluados dentro de un contexto médico (Mendoza, 2008).

La utilización de plantas como agentes terapéuticos persigue los siguientes objetivos:

1) Aislar compuestos con actividad biológica y desarrollarlos como nuevos medicamentos.
2) Sintetizar compuestos de estructuras conocidas para producir entidades patentables con mejor eficacia y menor toxicidad.
3) Utilizar fármacos derivados de plantas como herramientas farmacológicas.
4) Utilizar la planta entera o parte de ella como remedio medicinal o como fitofármaco (Mendoza, 2008).

1.3 La medicina natural como una alternativa actual

El número de personas que busca en las plantas una terapia alterna para mejorar su estado de salud, crece exponencialmente. La medicina basada en plantas, representa la síntesis de experiencias terapéuticas acumuladas por cientos de generaciones de practicantes de sistemas medicinales indígenas. Este conocimiento etnobotánico, ha llevado a grandes desarrollos en la asistencia sanitaria primaria de los pueblos. Sin embargo, con la industrialización rápida del planeta y la pérdida de culturas étnicas y costumbres, una parte de esta información ha desaparecido, y aún, la información etnomédica encontrada en la literatura científica sobre utilización de plantas “curativas”, no ha sido recopilada adecuadamente para difundir su aprovechamiento (Mendoza, 2008).

Numerosos factores contribuyen a incrementar el empleo de plantas como agentes terapéuticos, entre ellos resalta la desconfianza creciente hacia productos sintetizados con tecnología avanzada, cuya elaboración requiere de compuestos químicos que, en mayor o menor proporción, contaminan el ambiente. Este hecho

refleja que el ser humano, probablemente de manera instintiva y por formar parte de la naturaleza, busca en su entorno productos menos agresivos, y reconoce que, tanto la tecnología, como la naturaleza, deben ser combinadas sabiamente (Mendoza, 2008).

Desde hace varias décadas, los investigadores en el campo de las ciencias naturales, han tratado de aislar los componentes “activos” de las plantas medicinales, y en consecuencia, al obtenerlos, para un cierto número de plantas se ha logrado esclarecer el mecanismo de acción que explica su utilidad terapéutica. Con la capacidad de estandarizar productos elaborados de plantas con principios activos identificados, es decir, la capacidad de medir exactamente el porcentaje de los componentes activos, una gama nueva de medicina herbolaria llamada fitomedicina está ahora disponible para el público. Muchos practicantes de la medicina se sienten más confiados al recomendar un producto si conocen la cantidad exacta del principio activo, y el número de miligramos que se deberían prescribir a diario. Esta visión reduccionista de la medicina alópata, ha limitado estudios clínicos con formulaciones elaboradas con la planta completa o parte de ella y contrasta con la realidad, donde la mayoría de los consumidores utilizan las planta completa, lo cual significa que consumen cientos de compuestos que pueden antagonizarse o sinergizarse para originar múltiples efectos, algunos de ellos, informados en la literatura científica. Por esta razón, a la par de la búsqueda de nuevos fármacos a partir de plantas medicinales, deben diseñarse pruebas clínicas que consideren a las plantas como productos completos, donde su totalidad es mayor que la suma de sus partes (Mendoza, 2008; Pérez, 2011).

De todas las MACs (Medicina Alternativa Complementaria), la basada en el empleo de plantas superiores en su forma natural, es decir no procesada, ha tenido un crecimiento impresionante en el mercado mundial. Actualmente, el consumo de agentes terapéuticos “herbolarios” alcanza ventas de 60 mil millones de dólares, con un ritmo de crecimiento anual de entre 5 y 15%, que en los Estados Unidos, la producción de “hierbas medicinales”, es una de las diez industrias con más rápido crecimiento. El empleo de plantas con propósitos

medicinales, forma parte de la medicina tradicional que durante siglos ha estado presente en la asistencia sanitaria de muchos países. Los registros fósiles sobre la utilización humana de plantas con propósitos medicinales, sitúan esta práctica, por lo menos durante el Paleolítico (hace 60,000 años), a partir del cual ha crecido tanto su uso, que según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se calcula que alrededor de 65% de la población del mundo, ha incorporado a las plantas como una modalidad primaria de asistencia médica (Mendoza, 2008).

El éxito en la venta de “hierbas medicinales”, se explica por la mercadotecnia, por el reconocimiento popular del valor de sistemas médicos tradicionales, especialmente el de origen asiático, y lamentablemente, por los altos costos y la incidencia de reacciones adversas presentadas con la terapéutica medicamentosa “oficial”. Además, el consumo de productos elaborados con plantas medicinales, conlleva al concepto de desarrollo “natural”, lo cual implica la creencia que son mejores (moderada eficacia y así menor toxicidad) en comparación de medicamentos producidos “químicamente o de manera sintética”. Aunado a esta creencia, está la fácil disponibilidad de estos productos, ya que a menudo, las plantas son comercializadas como formulaciones denominadas complementos alimenticios, y en el peor de los casos, sin ningún sistema regulador que asegure la eficacia e inocuidad anunciada por las cosas comerciales (Mendoza, 2008).

1.4 La herbolaria en México

En México ha sido ampliamente documentado el empleo de plantas como remedios para el cuidado de la salud. En la población mexicana, las plantas forman parte de su historia y de su “cultura médica tradicional”, que se ha preservado a través de generaciones. Hoy en día, para algunos grupos étnicos de nuestro país, las plantas continúan siendo el único recurso para el tratamiento de enfermedades. Ante esta realidad, la Secretaría de Salud creó un marco de regulación para el control de plantas medicinales como recursos terapéuticos. A partir de 1998, la Secretaría de Salud, a través de su Reglamento de Insumos para la Salud, reconoció al “remedio herbolario” y al “medicamento herbolario” como medicina oficial. Se considera “remedio herbolario” al preparado de plantas

medicinales o sus partes individuales o combinadas y sus derivados, presentado en forma farmacéutica, al cual se atribuye por el conocimiento popular o tradicional, el alivio de algunos síntomas participantes o aislados de una enfermedad (Mendoza, 2008; Vásquez, 2002).

1.5 Definiciones de la OMS sobre la Medicina Tradicional

Los siguientes términos se han extraído de las Pautas Generales para las Metodologías de Investigación y Evaluación de la Medicina Tradicional de la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2013).

- **Medicina tradicional.** La medicina tradicional es todo el conjunto de conocimientos, aptitudes y prácticas basados en teorías, creencias y experiencias indígenas de las diferentes culturas, sean o no explicables, usados para el mantenimiento de la salud, así como para la prevención, el diagnóstico, la mejora o el tratamiento de enfermedades físicas o mentales.
- **Medicina complementaria/alternativa.** Los términos "medicina complementaria" y "medicina alternativa", utilizados indistintamente junto con "medicina tradicional" en algunos países, hacen referencia a un conjunto amplio de prácticas de atención de salud que no forman parte de la propia tradición del país y no están integradas en el sistema sanitario principal.
- **Medicamentos herbarios.** El concepto de medicamentos herbarios abarca hierbas, material herbario, preparaciones herbarias y productos herbarios acabados, que contienen como principios activos partes de plantas, u otros materiales vegetales, o combinaciones de esos elementos.
- **Hierbas:** Comprenden materiales vegetales brutos, tales como hojas, flores, frutos, semillas, tallos, madera, corteza, raíces, rizomas y otras partes de plantas, enteros, fragmentados o pulverizados.
- **Materiales herbarios.** Comprenden, además de hierbas, jugos frescos, gomas, aceites fijos, aceites esenciales, resinas y polvos secos de hierbas. En algunos países esos productos se pueden elaborar mediante diversos

procedimientos locales, como el tratamiento con vapor, el tostado o el rehogado con miel, bebidas alcohólicas u otros materiales.

- **Preparaciones herbarias.** Son la base de los productos herbarios acabados y pueden componerse de materiales herbarios triturados o pulverizados, o extractos, tinturas y aceites grasos de materiales herbarios. Se producen por extracción, fraccionamiento, purificación, concentración y otros procesos biológicos o físicos. También comprenden preparaciones obtenidas macerando o calentando materiales herbarios en bebidas alcohólicas o miel o en otros materiales.
- **Productos herbarios acabados.** Se componen de preparaciones herbarias hechas a partir de una o más hierbas. Si se utiliza más de una hierba, se puede utilizar también la expresión «mezcla de productos herbarios». Los productos herbarios acabados y las mezclas de productos herbarios pueden contener excipientes, además de los principios activos. Sin embargo, no se consideran herbarios los productos acabados o en forma de mezcla a los que se hayan añadido sustancias activas químicamente definidas, incluidos compuestos sintéticos o constituyentes aislados de materiales herbarios.
- **Uso tradicional de medicamentos herbarios.** Por uso tradicional de medicamentos herbarios se entiende un empleo prolongado a lo largo de la historia. Su uso está bien establecido y ampliamente reconocido como inocuo y eficaz y puede ser aceptado por las autoridades nacionales.
- **Actividad terapéutica.** La actividad terapéutica se refiere a la prevención, el diagnóstico y el tratamiento satisfactorios de enfermedades físicas y mentales, el alivio de los síntomas de las enfermedades y la modificación o regulación beneficiosa del estado físico y mental del organismo.
- **Principio activo.** Los principios activos son los ingredientes de los medicamentos herbarios que tienen actividad terapéutica. En el caso de los medicamentos herbarios cuyos principios activos hayan sido identificados, se debe normalizar su preparación, si se dispone de métodos analíticos adecuados, para que contengan una cantidad determinada de ellos. Si no

se logra identificar los principios activos, se puede considerar que todo el medicamento herbario es un solo principio activo (OMS, 2013).

La Organización Mundial de la Salud apoya el uso adecuado de medicamentos a base de plantas y promueve el uso de los recursos que se han demostrado ser seguros y eficaces. Algunas plantas medicinales han resistido la prueba científica, pero otros simplemente son utilizados por razones tradicionales para proteger, restaurar o mejorar la salud. La mayoría de las plantas medicinales todavía necesitan ser estudiadas científicamente; a pesar de la experiencia obtenida de su uso tradicional en los últimos años no debe ser ignorada (Rojas, 2009).

2. Árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

2.1 Descripción de la planta.

La palabra griega *Chiranthodendron* hace referencia a “árbol flor de mano”, mientras que *pentadactylon* se refiere a los cinco estambres que tienen forma de dedos. Su nombre náhuatl (*macpalxochitl*) igualmente significa “Flor palma de mano” (Martínez, 2011; López, 2005).

Árbol de 12 a 15m de altura. Las hojas tienen los bordes puntiagudos, son lisas en el anverso y vellosas en el reverso. La flor es vistosa de color rojo intenso, está solitaria y tiene el aspecto de una mano con garras. Los frutos son cápsulas leñosas que llevan en su interior semillas negruzcas con una protuberancia amarilla (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Figura 1. Árbol Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*). Imagen del árbol de flor de Manita.

Figura 2. Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*). Imagen de varias flores donde se observa su forma peculiar de garra.

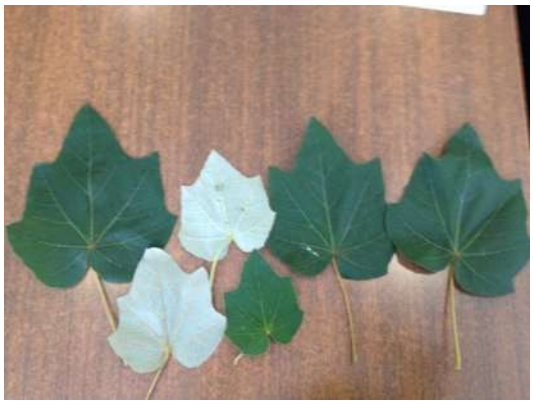

Figura 3. Hojas del árbol Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*). (Vista anterior y posterior). Se puede observar que las hojas son de diversos tamaños.

Originario de México. De climas cálido, semicálido y templado desde los 200 y los 2600 msnm. Planta silvestre asociada a bosque mesófilo de montaña en los estados de México, Morelos, Michoacán, Guerrero, Oaxaca y Chiapas (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009; López, 2005).

Ha sido utilizada medicinalmente desde tiempos prehispánicos por los pueblos del centro de México. Se pueden ver ejemplares en el bosque de Chapultepec y en el jardín botánico de Ciudad Universitaria de la UNAM en el D.F. La Flor de Manita es el emblema de la Sociedad Botánica de México. Actualmente es muy utilizada por indígenas del centro de México y de la zona de Chiapas y Guatemala (Martínez, 2011).

2.2 Clasificación taxonómica.

El árbol Flor de Manita pertenece a la familia de las Esterculiáceas (Sterculiaceae) y es escasamente cultivado (Martínez, 2011).

2.3 Historia.

En el siglo XVI, Martín de la Cruz la califica como analgésico. El Códice Florentino relata: “sirve para el que escupe sangre, al igual que para los que tienen cerrada la cámara (estreñimiento)”. En el mismo siglo, Francisco Hernández describe: “la planta es de naturaleza fría y húmeda, su corteza machacada y untada con agua resuelve los tumores”. A finales del siglo XVIII, Vicente Cervantes, refiere: "los indios de Toluca usaban la infusión de las flores para mitigar las inflamaciones de los ojos y aliviar el dolor de las almorranas" (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Casi a finales del siglo XIX, la Sociedad Mexicana de Historia Natural reporta los siguientes usos: como antiodontálgico (que combate el dolor de muelas), astringente, catártico, emoliente; para curar las enfermedades de los ojos, y analgésico. El Instituto Médico Nacional repite la información de la Sociedad Mexicana de Historia Natural, agregando su uso como antiinflamatorio y para curar los humores. Finalmente, en el siglo XX Maximino Martínez la califica contra: las afecciones cardiacas, como antiepiléptico, curativo de enfermedades de los ojos y analgésico (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

2.4 Usos en la medicina tradicional.

Es utilizada para calmar los nervios, preparada en té, junto con hojas de yoloxóchitl (*Talauma mexicana*), magnolia (*Magnolia spp*.), azahar (*Citrus spp*.), toronjil blanco y morado (*Agastache mexicana*) y toronjil azul o chino (*Dracocephalum moldavica*), o mezclada con tila (*Trenstroemia sp*.), azahar de naranjo (*Citrus sp.),* los tres toronjiles (blanco, morado y azul o chino), hinojo (*Foeniculum vulgare*) y menta (*Mentha piperita*). El té se toma cuando sea necesario. Así lo recomiendan en el Distrito Federal. Otra forma de prepararlo es poner a hervir la flor con floricuerno, damiana califórnica, pasiflorina y flores de azahar, infusión de la que se bebe una taza en la mañana y otra en la noche, como lo hacen en Michoacán. Con frecuencia se le emplea para curar el corazón. En Guanajuato, con este propósito se ingiere una infusión preparada con la flor, a

la que se agrega flor de tila, magnolia y yoloxóchitl. Y en Hidalgo, además de ser usada para curar los males del corazón, se le ocupa para regular la presión arterial. Se hace mención de su uso medicinal en ataques, dolor de cabeza, mareos, postparto y para evitar que el niño suspire (solloce) demasiado (Martínez, 2011; Aguilar, 2003).

Otros usos medicinales: estimulante cardiaco, epilepsia, nervios, presión alta, regula la presión, disentería, analgésico, cólera, diarrea, problemas del sistema nervioso, tos, tuberculosis, antiespasmódica, anticolinérgico, diurético, antiinflamatorio, para dejar adicciones. Se usa el cocimiento para lavados de ojos. Las flores, corteza y hojas se utilizan en baños para tratar las hemorroides. Además tiene usos como: sombra, ornato, hojas para tamal y rituales prehispánicos (Martínez, 2011; Zavaleta, 2012).

2.5 Propiedades farmacológicas.

Estudios químicos de esta planta mencionan que contiene gran cantidad de mucílago. Las flores contienen un pigmento rojo constituido por un glucósido compuesto por una aglicona, más 3 moléculas de glucosa y 3 de ácido gálico, además, en las flores se detectó la presencia de un alcaloide y de un glucósido (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

En el año de 1989, se estudió la actividad antiespasmódica, por medio de la extracción acuosa, como infusión, en la cual el resultado fue positivo para esta actividad. La infusión acuosa preparada con hojas y flores de manita, recolectada en su hábitat natural posee acción diurética, investigación realizada en el año de 1991 (Méndez, 2006). Un extracto polar de las flores, administrado por vía intraperitoneal en ratón a la dosis de 300mg/kg, ejerció un efecto anticolinérgico, observándose piloerección, ligera pérdida del tono muscular, catatonia y aumento del diámetro pupilar. Su aplicación como estimulante cardíaco ha sido validada experimentalmente (Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009).

Las infusiones de flores no poseen toxicidad aguda en el ratón por vía oral hasta una dosis de 3g/kg (Méndez, 2006).

El cocimiento de las flores frescas o secas se recomienda para tratar afecciones del corazón, diarrea, enfermedades nerviosas y epilepsia. La infusión de las hojas y corteza se usan como cataplasma para el tratamiento de ulceras crónicas, hemorroides y oftalmia. Las flores, corteza y hojas se usan en baños para tratar las hemorroides. A las flores y hojas se les atribuye propiedad analgésica, antiepiléptica, antiinflamatoria, astringente, cardiotónica, diurética y emoliente. (Méndez, 2006).

3. Pigmentos vegetales

Todas las células fotosintéticas poseen un número de pigmentos asociados a sus membranas tilacoidales. Estos pigmentos, que no son los mismos en todos los tipos celulares, se agrupan en tres clases principales: 1) clorofilas, 2) carotenoides y, 3) ficobiliproteínas (Santamarina, 2004).

3.1 Clorofilas

Una clorofila es una molécula de porfirina que lleva unida una molécula hidrocarbonada. Hay varios tipos. La clorofila a se presenta en algas y plantas superiores; además de este tipo de clorofila, las algas verdes y las plantas superiores también poseen clorofila b. Los cloroplastos contienen varios tipos de moléculas que absorben diferentes longitudes de onda de la luz, la clorofila, la molécula clave captadora de energía de las membranas tilacoideas, absorbe intensamente la luz violeta, azul y roja, pero refleja la verde. Puesto que a nuestros ojos llegan longitudes de onda verdes, vemos a la clorofila de color verde. Casi todas las hojas se ven verdes porque son ricas en clorofila. Los tilacoides contienen también otras moléculas, llamadas pigmentos accesorios, que

captan energía luminosa y la transfieren a la clorofila (Santamarina, 2004; Audesirk, 2003).

3.2 Carotenoides

Esta clase de pigmentos incluye a los carotenos (tetraterpenos) y las xantofilas (carotenos oxigenados). Los colores que presentan son: el amarillo, rojo y naranja. Se encuentran en el reino vegetal y también en algunos animales, se conocen más de 600 carotenoides diferentes (Primo, 1995).

Son colorantes poliénicos rojos y amarillos cuya molécula posee un grupo cromóforo de dobles enlaces conjugados en una cadena alifática ramificada (grupos metilos), formada por ocho restos de isopreno. Son por lo tanto, tetraterpenos. Algunos son lineales pero la mayoría tienen uno o dos ciclos. Los carotenoides están muy extendidos en la naturaleza. Los primeros se obtuvieron de la zanahoria. Existen en las hojas (donde se hacen visibles en otoño al desaparecer la clorofila), en frutos, en flores, tejidos animales. Están también en las grasas de los animales por ejemplo, en la leche, mantequilla y suero sanguíneo. Los carotenoides son derivados de los carotenos-licopeno, α-caroteno, β-caroteno y γ-caroteno (Primo, 1995;).

4. Flavonoides.

De manera general son moléculas que tienen dos anillos bencénicos (ó aromáticos) unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono, puesto que cada anillo bencénico tiene 6 átomos de carbono, los autores los denominan simplemente como compuestos C6C3C6 (Martínez, 2005).

Estos compuestos fueron descubiertos por el premio Nobel Szent-György, quien en 1930 aisló de la cáscara del limón una sustancia, la citrina, que regulaba la permeabilidad de los capilares. Los flavonoides se denominaron en un principio

vitamina P (por permeabilidad) y también vitamina C2 (porque se comprobó que algunos flavonoides tenían propiedades similares a la vitamina C). Sin embargo, el hecho de que los flavonoides fueran vitaminas no pudo ser confirmado, y ambas denominaciones se abandonaron alrededor de 1950 (Martínez, 2002).

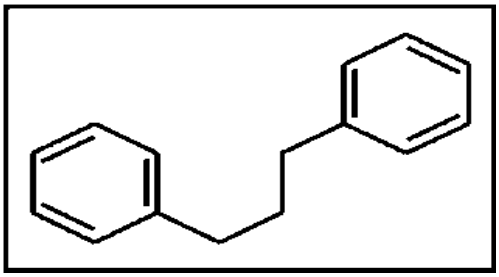

Figura 4. Estructura básica de los flavonoides. Están formados por dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono.

Los flavonoides son compuestos, generalmente amarillos, que se encuentran en componentes celulares y en los pétalos de las flores de algunas plantas en forma de glucósidos de diversos azúcares (glucosa, galactosa, ramnosa o una pentosa) y cuyos aglucones son derivados del núcleo fundamental de la fenilbenzopirona. La unión glucosidica del aglucón y el azúcar suele estar sobre grupos fenólicos situados en las posiciones 7 o 3. Estos compuestos son metabolitos secundarios de las plantas, cuyo papel fisiológico en ellas no se conoce bien. Muchos de ellos se hallan en la corteza de los árboles y se han utilizado como colorantes naturales. Otros tienen carácter vitamínico y aplicaciones terapéuticas. Los flavonoides sin ser metabolitos primarios, se encuentran casi en cualquier vegetal superior, hay más de 8000 compuestos conocidos de plantas vasculares mientras que en los vegetales inferiores: algas, hongos, bacterias, los compuestos fenólicos principales son quinonas y xantonas y a éstos se deben su color. Las funciones de los flavonoides en las plantas son varias. Así, se consideran como de antioxidantes y secuestradores de radicales libres, agentes antimicrobiales, fotoreceptores y protectores contra la luz UV, agentes quelantes de metales, atrayentes visuales para los insectos, entre otros (Marcano, 2002).

4.1 Propiedades

La mayor parte de los glucósidos flavonoides son sólidos cristalinos, amarillos. Su solubilidad en agua depende de los azúcares que contienen. En general, son solubles en alcoholes bajos (Primo, 1995).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición, lo que les confiere una gran capacidad antioxidante. Por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (Martínez, 2002).

4.2 Estructura y nomenclatura

Para su estudio sistemático los más de 4000 flavonoides naturales se han clasificado en varias clases de acuerdo con las variantes estructurales que presenta la cadena central C3. De acuerdo con esto los flavonoides se clasifican en varios grupos: Chalconas, flavonas, flavonoles, flavanonas, flavanonoles, antocianidinas, catequinas, epicatequinas, auronas, isoflavonoides, pterocarpanos, rotenoides, etc. (Martínez, 2005).

Los flavonoides son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico). Los átomos de carbono en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, y los del anillo B desde el 2' al 6' (Martínez, 2002).

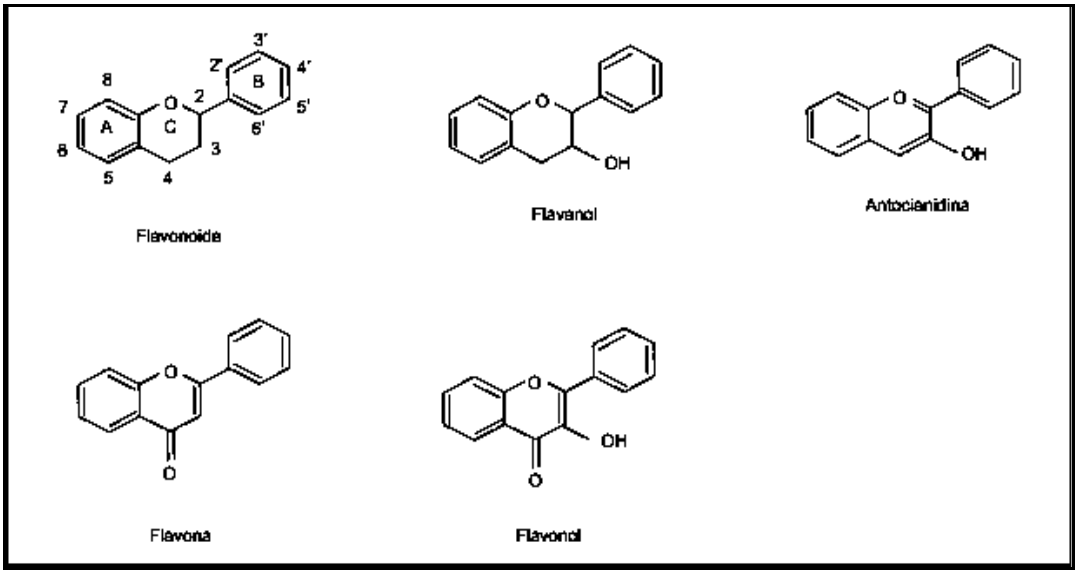

Figura 5. Clasificación de los flavonoides de acuerdo a su grupo funcional. Se puede observar que todos los compuestos conservan la estructura básica de los flavonoides.

En función de sus características estructurales se pueden clasificar en:

1. Flavanos, como la catequina, con un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

2. Flavonoles, representados por la quercetina, que posee un grupo carbonilo en posición 4 y un grupo -OH en posición 3 del anillo C.

3. Flavonas, como la diosmetina, que poseen un grupo carbonilo en posición 4 del anillo C y carecen del grupo hidroxilo en posición C3.

4. Antocianidinas, que tienen unido el grupo -OH en posición 3 pero además poseen un doble enlace entre los carbonos 3 y 4 del anillo C.

4.3 Tipos y fuentes de flavonoides

Los flavonoides se encuentran en frutas, verduras, semillas y flores, así como en cerveza, vino, té verde, té negro y soja, los cuales son consumidos en la dieta humana de forma habitual y también pueden utilizarse en forma de suplementos

nutricionales, junto con ciertas vitaminas y minerales. Los flavonoides se encuentran también en extractos de plantas como arándano, *Ginkgo biloba*, cardo mariano o crataegus. Otras funciones incluyen un papel antifúngico y bactericida, confieren coloración, lo que puede contribuir a los fenómenos de polinización y tienen una importante capacidad para fijar metales como el hierro y el cobre. Los flavonoides se ubican principalmente en las hojas y en el exterior de las plantas, apareciendo sólo rastros de ellos en las partes de la planta por encima de la superficie del suelo. Una excepción son los tubérculos de cebolla, que contienen una gran cantidad de quercetina 4'-D-glucósidos (Martínez, 2002; Romo, 2006).

Aunque los hábitos alimenticios son muy diversos en el mundo, el valor medio de ingesta de flavonoides se estima como 23 mg/día, siendo la quercetina el predominante con un valor medio de 16 mg/día (Martínez, 2002).

El organismo humano no puede producir estas sustancias químicas protectoras, por lo que deben obtenerse mediante la alimentación o en forma de suplementos. Están ampliamente distribuidos en plantas, frutas, verduras y en diversas bebidas y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana. Se han identificado más de 5.000 flavonoides, entre los que se pueden destacar:

1. Citroflavonoides: quercetina, hesperidina, rutina, naranjina y limoneno. La quercetina es un flavonoide amarillo-verdoso presente en cebollas, manzanas, brócolis, cerezas, uvas o repollo rojo. La hesperidina se encuentra en los hollejos (piel blanca) de las naranjas y limones. La naranjina da el sabor amargo a frutas como la naranja, limón y toronja, y el limoneno se ha aislado del limón y la lima.

2. Flavonoides de la soja o isoflavonoides: están presentes en los alimentos con soja tales como tofu, leche, proteína vegetal texturizada, harina. Los dos más conocidos son la genisteína y la daidzeina.

3. Proantocianidinas se localizan en las semillas de uva, vino tinto y extracto de corteza del pino marino.

4. Antocianidinas: son pigmentos vegetales responsables de los colores rojo y rojo-azulado de las cerezas.

5. Ácido elágico: es un flavonoide que se encuentra en frutas como la uva y en verduras.

6. Catequina: el té verde y negro son buenas fuentes.

7. Kaemferol: aparece en brócolis, rábano, y betabel (Martínez, 2002).

5. Fitoterapia.

Si bien la medicina moderna está desarrollada en la mayor parte del mundo, grandes sectores de la población de los países en desarrollo todavía dependen de los profesionales que aplican la medicina tradicional, las plantas medicinales y los medicamentos herbarios para su atención primaria. Es más, durante los últimos decenios, el interés del público en las terapias naturales ha aumentado enormemente en los países industrializados, y se halla en expansión el uso de plantas medicinales y medicamentos herbarios. Las muchas y diversas formas de los productos medicinales tradicionales han evolucionado frente a entornos ampliamente diferentes en lo etnológico, cultural, climático, geográfico y aún filosófico (Hernández, 2005).

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. La fitoterapia constituye una herramienta terapéutica más dentro de todo el abanico de posibilidades que nos brinda la Terapéutica actual. Para que esta herramienta sea realmente útil, es necesario hacer un uso racional de la misma, basado en una utilización apropiada de los preparados a base de plantas medicinales (Hernández, 2005; Vanaclocha, 2003).

5.1 Fármaco

El término fármaco se refiere a cualquier sustancia activa (no alimenticia) de origen natural (vegetal, animal o mineral), semisintética o sintética que interactúa con organismos vivos para modificar un proceso o respuesta biológica y producir así, un efecto farmacológico (Mendoza, 2008; Fernández, 2008).

5.2 Vías de administración

Las posibles vías de entrada de los medicamentos al organismo se pueden dividir en dos grandes grupos: vías entéricas o enterales y vías parenterales.

Vía oral. La vía oral es la forma más común de administrar fármacos y permite la autoadministración, por lo que se depende del cumplimiento del paciente para seguir el tratamiento. Para que se dé una correcta absorción de los medicamentos es necesaria la forma líquida –en solución-; mientras los sólidos, como los comprimidos, requieren desgranularse y disolverse en los fluidos, y las cápsulas, disolverse o abrirse para liberar el contenido que también requiere su combinación con los líquidos, se observa que las soluciones –las formas líquidas- favorecen la rapidez. La absorción se realiza a través del todo el tracto gastrointestinal, aunque las características fisicoquímicas de cada droga determinan si se absorbe en el medio ácido del estómago o en el casi neutro del intestino. La absorción en el estómago es buena para los ácidos orgánicos, ya que todos están sin ionizar al pH gástrico. Cuando el estómago está vacío, la absorción a este nivel se favorece, y es por medio del jugo gástrico sin diluir que el fármaco tiene un buen acceso a la pared mucosa. Solo cuando pudiera ser irritante para la mucosa gástrica, es conveniente administrarlo simultáneamente o después de las comidas. La presencia de alimentos puede dificultar la absorción de fármacos que se administran por esta vía debido a la reducción del mezclado, formación de complejos con sustancias en los alimentos y retardo en el vaciamiento gástrico (Sáenz, 1993; Lane, 1999).

Vía sublingual. Como en algunas drogas es de gran importancia la autoadministración, la vía sublingual es la adecuada porque permite una rapidísima absorción que propicia la aparición pronta del efecto farmacológico, aunque resulte inútil después de su deglución –metabolismo de primer paso-. En la mucosa oral, el proceso de absorción es similar al gastrointestinal: la saliva tiene un pH de 6 y el flujo sanguíneo es elevado. El drenaje venoso de la boca pasa directamente a vena cava superior para alcanzar la circulación sistémica. Por esta vía, el fármaco está protegido de la rápida inactivación hepática, por evitar el sistema porta. La absorción en la mucosa oral es importante para ciertas drogas, a pesar de que la superficie es pequeña (Sáenz, 1993; Betés, 2009).

Vía rectal. Esta vía es a menudo útil cuando la ingestión oral de fármacos es imposible, como en el caso de niños con resistencia a la ingesta. La vía rectal está indicada cuando existen alteraciones patológicas de la mucosa gástrica, en la irritación de la misma por los fármacos, en caso de inactivación de medicamentos –total o parcialmente- debido a los ácidos gástricos; y, si los pacientes están del todo o en parte sin conocimiento. También por haber problemas de deglución en el enfermo y para la aplicación en niños.

El recto comprende el tramo final -15 a 20 cm- del intestino grueso; de ellos, los últimos 5 o 6 últimos centímetros son especialmente importantes para la absorción. Si el supositorio se funde en el área inferior, los medicamentos llegan a circulación general casi sin paso hepático, aumentando de esta manera su biodisponibilidad. No obstante, la absorción puede ser irregular e incompleta, especialmente por la presencia de materia fecal. Está contraindicada la aplicación de fármacos por esta vía cuando hay un cuadro diarreico (Sáenz, 1993; Lane, 1999).

Vía intravenosa. Es la vía parenteral que comúnmente se utiliza para la introducción de fármacos al torrente sanguíneo, por lo general, inyectándolos en la vena antecubital. Tiene como ventaja que, el fármaco alcanza en un tiempo mínimo el espacio intravascular, lo cual es de suma importancia cuando la

velocidad de acción es esencial. La vía intravenosa es una vía directa de aplicación del medicamento en el torrente sanguíneo, es decir, evita los procesos de absorción. Es muy útil en casos de emergencia, pues los fármacos que se suministran presentan su efecto en forma inmediata (o muy rápidamente). Para administrar fármacos por esta vía, deben mantenerse condiciones asépticas en la zona, verificar que el preparado sea acuoso, cristalino, estéril, libre de pirógenos, y tenga en su empaque, la indicación expresa de uso intravenoso (Sáenz, 1993; Betés, 2009).

Vía intramuscular. La vía intramuscular se emplea para fármacos inyectables. Por lo regular, se aplica en músculo esquelético, generalmente en la región glútea o deltoidea, evitando de esta forma, la barrera cutánea. La velocidad de absorción del fármaco depende de la vascularización, de los coeficientes de partición lípido/agua, del tamaño molecular, etc. El flujo sanguíneo se aumenta notablemente con el ejercicio, favoreciendo la absorción. Es una vía adecuada para la administración de volúmenes moderados, unos 5 mL en humanos, vehículos oleosos y algunos compuestos que son irritantes por otras vías (Sáenz, 1993; Betés, 2009).

Vía subcutánea. La inyección subcutánea se utiliza, con frecuencia, para la administración de compuestos que no irritan los tejidos. Se aplica con aguja corta y fina, lo suficiente para atravesar la piel al introducirla en forma perpendicular, permite un volumen máximo de 1 mL. La velocidad de absorción es, a menudo, lo suficientemente lenta y constante para mantener un efecto sostenido (Sáenz, 1993; Lane, 1999).

Vía intradérmica. La vía intradérmica se emplea frecuentemente porque permite la rápida absorción de pequeños volúmenes (0.5 mL) de preparaciones acuosas. Consiste en aplicar una solución en la piel, inyectándola entre la epidermis y la dermis, colocando la jeringa casi paralela a la superficie cutánea. Por esta vía se administran pocos fármacos (Sáenz, 1993; Betés, 2009).

Vía inhalatoria. La vía inhalatoria es, también, llamada vía pulmonar. Por esta vía se emplean compuestos volátiles o gaseosos que penetran por las vías respiratorias, y se absorben a través de los alveolos por difusión. Es una forma de administrar fármacos que tiene mucho uso en anestesia general, aplicando líquidos volátiles y gases. Las membranas alveolares ofrecen una gran superficie y tienen un gran flujo sanguíneo, por lo que las drogas, con la liposolubilidad adecuada, se absorben con rapidez. Esta vía es importante cuando se requiere rápido alivio de tipo intermitente, en las exacerbaciones agudas de un padecimiento crónico, especialmente cuando es deseable la automedicación (Sáenz, 1993; Cotillo, 2004).

Vía intra-arterial. El fármaco se inyecta directamente en la arteria para dirigir su efecto a un órgano blanco, área corporal o tejido determinado. Permite alcanzar concentraciones locales elevadas, aplicaciones inmediatas, intermitentes y en forma constante utilizando una infusión (Sáenz, 1993; Cotillo, 2004).

Vía intratecal. La llamada barrera hematoencefálica a menudo impide o retarda el paso de compuestos farmacológicos al sistema nervioso central. Por lo tanto, cuando se requieren efectos locales y rápidos, sobre las meninges, el tejido cerebral o el eje cerebro-espinal, se pueden inyectar directamente en el espacio subaracnoideo. La administración intratecal permite altas concentraciones locales de fármacos que no se logran por otras vías (Sáenz, 1993; Cotillo, 2004).

Vía tópica. Cuando se desea obtener el efecto farmacológico en el sitio de aplicación, se utiliza la vía tópica de administración, que implica el uso del medicamento directamente sobre la piel o las mucosas (Sáenz, 1993; Lane, 1999).

6. Lectinas

En 1888, Stillmarck encontró que los extractos de semillas de ricino contenían una proteína que podía aglutinar los glóbulos rojos de la sangre de animales. Poco después, un número de semillas de otras plantas se encontró que contienen tales “aglutininas”, pero el interés en ellos comenzó a decaer con la aparición y el desarrollo del campo de la inmunoquímica. No fue hasta la segunda guerra mundial y el interés resultante en la transfusión de sangre, se encontró que algunas lectinas fueron específicas para diversos tipos sanguíneos ABO; y otras tenían especificidad para glicanos diferentes. A estas aglutininas se les cambió el nombre por el de “lectinas”, un término derivado de la palabra latina “lègere” que significa “seleccionar”. Las lectinas se descubrieron hace más de 100 años en las plantas pero ahora se sabe que están presentes en toda la naturaleza. Las lectinas son también frecuentes en el mundo microbiano, en el que tienden a ser llamadas por otros nombres, tales como hemaglutininas y adhesinas (Varky, 2009).

Son proteínas que unen a mono y oligosacáridos específicamente y reversiblemente, pero son desprovistas de actividad catalítica (no son enzimas) y en contraste con los anticuerpos, no son producto de una respuesta inmune. Las lectinas típicamente contienen dos o más sitios de unión a carbohidratos por molécula (Sharon y Lis, 2001).

La unión de una lectina a los azucares de la superficie de células, por ejemplo los eritrocitos, puede causar rompimiento de las células y su subsecuente precipitación, un fenómeno referido como aglutinación celular (Sharon y Lis, 2001).

6.1 Especificidad a carbohidratos

Basada en su especificidad, las lectinas son clasificadas dentro de cinco grupos, de acuerdo con el monosacárido por el cual tienen mayor afinidad: manosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina, fucosa y ácido N-acetilneuraminico (ácido siálico). (Sharon y Lis, 2001).

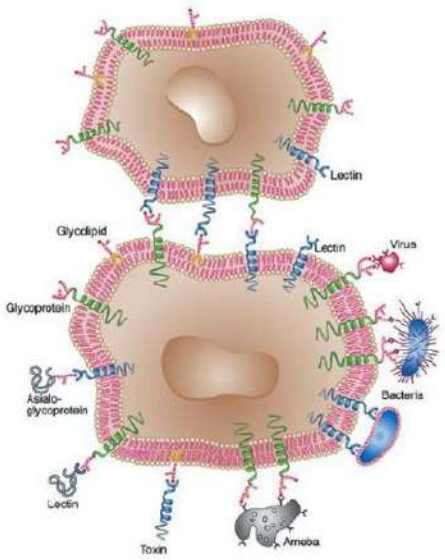

Figura 6. Representación esquemática del reconocimiento y de la especificidad de glicoproteínas. Se muestra la amplia diversidad y especificidad con la que cuentan las lectinas.

6.2 Lectinas de plantas

Las lectinas vegetales se descubrieron decenios antes que las lectinas animales. Merced a su exquisita especificidad y su fácil purificación para estudios histoquímicos, bioquímicos, biofísicos y estructurales, las lectinas vegetales se consideran herramientas idóneas para el estudio estructural de la especificidad de unión de carbohidratos a proteínas (Sharon y Lis, 2001).

Las plantas continúan siendo la fuente más rica de lectinas. Muchas son obtenidas de las semillas de las plantas, pero también han sido obtenidas de todos los tipos de tejidos vegetales, tales como hojas, tallos, frutos y raíces (Sharon y Lis, 2001).

6.2.1 Legumbres

Las lectinas de semillas de leguminosas comprenden una gran familia de proteínas de esta clase, con más de 100 miembros. Todas ellas consisten de dos o más subunidades idénticas, o casi idénticas, de 25-30 kDa., cada una con un sitio de reconocimiento de carbohidratos y con Ca^{2+} y Mg^{2+} por subunidad, que son esenciales para la unión a carbohidratos (Sharon y Lis, 2001).

6.2.2 Cereales

Otra familia de las lectinas de plantas es la de los cereales, un ejemplo prominente de éstas es la aglutinina del germen de trigo (WGA). Toda las lectinas de esta familia son específicas para N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuraminico (o ácido siálico) y consiste también de dos subunidades idénticas, pero difieren marcadamente de las de leguminosas. Son ricas en cisteína, las lectinas de leguminosas carecen de ella, y son desprovistas de metales (Sharon y Lis, 2001).

6.3 Lectinas microbianas

Los virus, bacterias y protozoos expresan un número enorme de proteínas de unión a glicanos o lectinas. Muchas de estas lectinas microbianas se detectaron originalmente en base a su capacidad de agregar las células rojas de la sangre (es decir, para inducir la hemaglutinación). La primera hemaglutinina microbiana identificada estaba en el virus de la gripe, y fue demostrada por Alfred Gottschalk en la década de 1950 que se unía a eritrocitos y otras células, a través de los residuos de ácido siálico de glicoconjugados de la superficie celular. Wiley y sus asociados cristalizaron la hemaglutinina viral y determinaron su estructura en 1981, y más tarde resolvió su estructura de cristales preparados con sialil-lactosa. Desde entonces, un número de hemaglutininas virales han sido identificadas y cristalizadas. Estos estudios prepararon el escenario para el análisis de otros tipos de lectinas microbianas producidas por las bacterias y los protozoos (Varky, 2009).

Nathan Sharon y sus colegas describieron por primera vez lectinas bacterianas superficiales en la década de 1970. Estas lectinas también tienen actividad hemaglutinante, pero su función principal es facilitar la colocación o la adhesión de las bacterias a las células huésped, un prerrequisito para la colonización bacteriana y la infección. Por lo tanto, las lectinas bacterianas son a menudo llamadas adhesinas, y los glicanos ligados en la superficie de las células huésped se llaman receptores. Las bacterias también producen toxinas, cuyas acciones a menudo dependen de subunidades de unión a glicanos que permiten que la toxina se combine con la membrana de glicoconjugados y entregar la subunidad tóxica funcionalmente activa a través de la membrana plasmática. Durante los últimos 30 años, las adhesinas y toxinas se han descrito, clonado y caracterizado. Además, las adhesinas se han descubierto en varios parásitos. Las interacciones de las adhesinas con receptores de glicanos pueden ayudar a determinar el tropismo del organismo (Varky, 2009).

6.4 Lectinas animales

Alrededor de 100 lectinas animales han sido descritas, mayormente de vertebrados. Su actividad de unión a carbohidratos a menudo reside en un segmento limitado de polipéptido, designado como el dominio de reconocimiento de carbohidratos (Sharon y Lis, 2001).

6.4.1 Galectinas. Son una familia de lectinas animales específicas para β-galactósidos, tales como lactosa y N-acetillactosamina. Son encontradas dentro del núcleo y citoplasma de las células y ocasionalmente en la superficie o fuera de la célula. Las galectinas se encuentran como monómeros y dímeros con subunidades de masa molecular de alrededor 14 kDa, así como más grandes polipéptidos (de 30-35 kDa), cada una de las cuales contiene una o dos copias de un dominio de reconocimiento de carbohidratos conocido como S-CRD. Su estructura tridimensional es igual a la de lectinas de legumbres, a pesar de la ausencia de secuencia homologa, la falta de iones metálicos en la estructura y una localización diferente en el sitio de reconocimiento (Sharon y Lis, 2001).

6.4.2 Lectinas tipo C. Mientras las galectinas no requieren iones metálicos para su actividad, muchas otras lectinas animales son dependientes de Ca^{2+}, o llamadas lectinas tipo C. Se diferencian también de las galectinas en su estructura primaria en su sitio de reconocimiento de carbohidratos (designado como C-CRD), y en su tamaño molecular, las cuales son mucho más grandes (cientos de kDa). Las lectinas tipo C son agrupadas dentro de tres familias, -selectinas, colectinas y lectinas endociticas-.

a) **Selectinas.** Esta familia de lectinas consiste de tres miembros, E-selectina, P-selectina y L-selectina. Son llamadas así debido a que median contactos selectivos entre células. Todas las selectinas reconocen al ácido siálico. Las selectinas P y L, los ligandos biológicos también requieren la presencia de un grupo sulfato.
b) **Colectinas.** Un grupo de cinco proteínas solubles encontradas en el suero de mamíferos y aves, reciben este nombre debido a la presencia en estas moléculas de un dominio parecido al colágeno. Un importante miembro de este grupo es la proteína de unión a manosa, MBP-A, un trímero de 32 kDa, con subunidades basadas en una triple hélice formada por su porción de colágeno.
c) **Lectinas endociticas.** Una lectina representativa de este grupo es el receptor de asialoglicoproteína hepática de conejo (RHL), conocida también como proteína de reconocimiento hepático, la primera lectina de mamífero en ser descrita en 1974.

6.4.3 Lectinas tipo P. Un dominio de reconocimiento de carbohidratos diferente de S-CRD y C-CRD y referido como tipo P, es encontrado en dos lectinas cercanamente relacionadas que unen a manosa-6-fosfato, un azúcar encontrado exclusivamente en enzimas lisosomales, que son conocidos como receptores de Man-6-P (Sharon y Lis, 2001).

6.5 Funciones

Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diversos organismos como virus, hongos, bacterias, plantas, así como en vertebrados superiores. Aunque varias de estas proteínas poseen especificidad por estructuras sacarídicas semejantes, presentan actividades biológicas diversas, como son: la aglutinación de eritrocitos de diferentes especies, la estimulación mitogénica de linfocitos e inhibición de la fagocitosis. Debido a la capacidad de estas proteínas para interactuar con células de la respuesta inmune, algunas lectinas poseen efectos inmunosupresores, otras también son tóxicas, inhiben el crecimiento de células tumorales y participan en la adhesión celular. Todas las actividades biológicas reportadas para las lectinas tienen en común el reconocimiento de un receptor oligosacarídico (Hernández y col, 2005). Particularmente se encontró que la lectina del frijol rojo (*Phaseolus vulgaris*), conocida como la fitohemaglutinina (PHA), es mitogénica, es decir, posee la capacidad de estimular los linfocitos a experimentar la mitosis; varias otras lectinas han demostrado ser mitogénicas. Por ejemplo, la concanavalina A actúa como un mitógeno, y en contraste con PHA, su actividad puede ser inhibida por bajas concentraciones de monosacáridos, como la manosa. Las lectinas mitogénicas se convirtieron en herramientas para el estudio de la transmisión de señales en las células y para el análisis de los eventos bioquímicos que se producen durante la estimulación de linfocitos en vivo (Sharon y Lis, 2004).

Se sabe que la aglutinina de germen de trigo (WGA) tiene la capacidad de aglutinar preferentemente células malignas, posteriormente se demostró que la concanavalina y la aglutinina de soja (SBA) también poseen la misma actividad. También existen propuestas de que las lectinas vegetales protegen las plantas contra microorganismos fitopatógenos e insectos, así como contra los animales de presa; también se supone que están implicadas en la asociación de plantas leguminosas y sus bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (Sharon y Lis, 2004).

Tabla 1. Funciones de algunas lectinas

Lectina	Función
1) Microorganismos	
Ameba	Infección
Bacterias	Infección
Virus de la gripe	Infección
2) Plantas	
Varias	Defensa
Legumbres	Simbiosis con bacterias fijadoras de Nitrógeno
3) Animales	
Calnexina, calreticulina, ERGIC-53	Control en la biosíntesis de glicoproteína
Colectinas	Inmunidad innata
Dectina-1	Inmunidad innata
Galectinas	Regulación del crecimiento celular y apoptosis; regulación del ciclo celular, modulación célula-célula y célula-sustrato.
Receptor de manosa de magrófagos	Inmunidad innata, aclaramiento de hormonas de glicoproteína sulfatadas.
Receptores Man-6-P	Orientación de las enzimas lisosomales
L-selectina	Transvasación de linfocitos
E-selectina y P-selectina	Tráfico de leucocitos a sitios de inflamación
Siglecs	Interacciones célula-célula en el sistema inmunológico y neuronal
Adhesina de esperma	Interacción en huevo-esperma

(Sharon y Lis, 2004)

6.6 Aplicaciones

Las lectinas se consideran armas valiosas en el campo de la Genética, la Biomedicina y la Inmunología. Su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales. Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, como son:

- La evaluación de la producción de citocinas (interferón e interleucinas) y la expresión de sus receptores en sobrenadantes de cultivos de linfocitos provenientes de pacientes con enfermedades de alto impacto social como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), la tuberculosis y la Leishmaniasis, entre otras.
- La caracterización de algunos aspectos relacionados con la respuesta inmune y fenómenos asociados con ellas como la inmunosupresión.
- La interacción entre virus, como por ejemplo entre el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y el virus de la hepatitis B, así como la susceptibilidad y resistencia a éstos.
- Evaluación de la efectividad de terapias antirretrovirales de acuerdo con la respuesta de los linfocitos a la estimulación con las lectinas antes y después de la terapia, como por ejemplo en terapias contra el VIH.
- Análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas.
- Estudios acerca de la influencia nutricional en la proliferación de linfocitos y su cinética de proliferación.
- La inducción de genes en linfocitos.
- La detección de anormalidades cromosómicas (Hernández, 1999).

Otra área importante en la cual se emplean las lectinas es la detección de transformaciones malignas en células, a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas. Además se han realizado

investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha visto que disminuyen el crecimiento de las células tumorales. Se utilizan también para la inmunización contra virus productores de inmunodeficiencia y algunos tumores y como medicamentos para prevenir metástasis. Las propiedades citotóxicas de algunas lectinas como la Ricina y Abrina hacen también que éstas brinden interés como potenciales armas terapéuticas en el tratamiento del cáncer humano (Hernández, 1999).

7. Determinación de la toxicidad aguda, dosis letal media (DL50) y toxicidad crónica

7.1 Definiciones

a) **Toxicidad oral aguda:** Se refiere a los efectos adversos que ocurren después de la administración oral de una sola dosis de una sustancia, o de dosis múltiples dentro de 24 horas.

b) **Muerte retardada:** Significa que el animal no muere ni parece moribundo en el plazo de 48 horas, pero muere más tarde durante los 14 días del periodo de observación.

c) **Dosis:** Es la cantidad de sustancia administrada. Se expresa en peso de la sustancia por unidad de peso del animal (por ejemplo, mg/kg).

d) **Toxicidad evidente:** Es un término general que describe signos claros de toxicidad tras la administración de la sustancia de prueba.

e) **GHS (Globally Harmonised Classification System for Chemical Susbstances and Mixtures):** SGA (Sistema Globalmente Aceptado para la Clasificación de Sustancias y Mezclas Químicas); una actividad conjunta de la OCDE (salud humana y medio ambiente), UN, el Comité de Expertos en Transporte de Mercancías y Bienes Peligrosos (propiedades fisicoquímicas) y la

OIT (comunicación de peligros) y coordinado por el Programa Interorganismos para la Gestión Racional de los Productos Químicos (IOMC).

f) Muerte inminente: Estado moribundo o la muerte se espera antes de la próxima observación planeada. Los signos que indican esta situación en los roedores pueden ser: convulsiones, posición lateral, postración y temblor.

g) DL50 (Dosis Oral Letal Media): Es una dosis única, obtenida estadísticamente de una sustancia que se puede esperar que cause la muerte en 50% de la población cuando se administra por vía oral. El valor de la DL50 se expresa en términos de peso de sustancia de ensayo por unidad de peso del animal (mg/kg).

h) Dosis límite: Se refiere a una dosis límite en el ensayo (2000 a 5000 mg/kg).

i) Estado moribundo: Estar en un estado de muerte o incapacidad de sobrevivir, incluso con tratamiento.

j) Muerte predecible: Presencia de signos clínicos que indican la muerte en un momento conocido en el futuro antes de la terminación prevista del experimento, por ejemplo: incapacidad de alcanzar alimentos o agua (OECD No. 420, 2001).

k) Toxicidad crónica. Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos consecuentes a una exposición prolongada; estaos pueden aparecer durante o después de interrumpida la exposición (Repetto, 1997).

7.2 Método de dosis fijas- Toxicidad oral aguda (OECD No. 420) y Método de dosis repetidas por 28 días. Toxicidad crónica (OECD No. 407)

Los métodos tradicionales para evaluar la toxicidad aguda utilizando la muerte de los animales como criterio de valoración. En 1984, un nuevo enfoque para las pruebas de toxicidad aguda fue sugerido por la Sociedad Británica de Toxicología basada en la administración de una serie de niveles de dosis fijas. El enfoque evitó usar la muerte de los animales como criterio de valoración, y se basó en lugar en la observación de signos claros de toxicidad en una de las series de niveles de

dosis fijas. Tras la validación de los estudios *in vivo*, el procedimiento fue adoptado por el Consejo como una Directriz de prueba en 1992. Subsecuentemente, las propiedades estadísticas del Procedimiento de Dosis Fijas han sido evaluadas usando modelos matemáticos en una serie de estudios. Juntos, el estudio *in vivo* y el estudio modelado han demostrado que el procedimiento es reproducible, usando menos animales y causando menor sufrimiento que los métodos tradicionales y es capaz de clasificar sustancias de una manera similar a los otros métodos para evaluar la toxicidad aguda (OECD No. 420, 2001).

El método proporciona información sobre las propiedades peligrosas y permite que la sustancia sea calificada y clasificada según el GHS para la clasificación de sustancias químicas que pueden causar toxicidad aguda (OECD No. 420, 2001; Bulgheroni, 2008).

En la valoración y evaluación de las características tóxicas de una sustancia química, la determinación de la toxicidad oral de dosis repetidas puede llevarse a cabo después de la información inicial obtenida por el ensayo de toxicidad aguda. Este estudio proporciona información sobre los riesgos sanitarios que pueden derivarse de la exposición repetida durante un periodo relativamente limitado de tiempo. La duración de la exposición deberá ser normalmente de 28 días, aunque un estudio de 14 días puede ser apropiado en ciertas circunstancias (OECD No. 407, 1995; Rojas, 2009).

7.3 Principio de la prueba

Estudio de toxicidad aguda. Los grupos de animales de un solo sexo se dosifican de manera graduada dosis fijas de 5, 50, 300 y 2000 mg/kg (excepcionalmente una dosis fija de 5000 mg/kg, puede ser considerada). El nivel de dosis inicial se selecciona sobre la base de un estudio preliminar y la dosis esperada para producir algunos signos de toxicidad sin causar efectos tóxicos graves o mortalidad. Otros grupos de animales pueden darse dosis más altas o más bajas, dependiendo de la presencia o ausencia de signos de toxicidad o mortalidad. El procedimiento continúa hasta que la dosis cause toxicidad evidente

o no más de una muerte es identificada, o cuando no son vistos efectos en la dosis más alta o cuando la muerte ocurre en la dosis más baja (OECD No. 420, 2001; Bermúdez, 2007).

Estudio de toxicidad crónica. La sustancia de ensayo se administra en vía oral diariamente en dosis graduadas a distintos grupos de animales de experimentación, a razón de una dosis por lote durante un periodo de 28 días. Durante el periodo de administración de los animales se observan de cerca, cada día en busca de signos de toxicidad. Los animales que mueren o son sacrificados durante el ensayo se les practicarán la autopsia y en la conclusión de la prueba a los animales supervivientes se sacrificarán y se someterán a autopsia (OECD No. 407, 2008; Rojas, 2009).

7.4 Descripción del método

Selección de la especie animal. La especie preferida de roedor es la rata, aunque otras especies de roedores pueden ser utilizados. Animales jóvenes y sanos de cepas de laboratorio de uso común deben ser empleados. Cada animal, al comienzo de su administración, debe ser entre 8 y 12 semanas de edad; al comienzo del estudio la variación de peso de los animales utilizados debe ser mínima y no superar el ± 20% de peso medio de cada sexo (OECD No. 407, 2008; OECD No. 420, 2001; Bermúdez, 2007).

Vivienda y alimentación adecuadas. La temperatura de la sala de experimentación debe ser de 22°C (±3°C), aunque la humedad relativa debe ser de la menos 30% y preferiblemente no superior de 70%. La iluminación debe ser artificial, con una alternancia de 12 horas luz y 12 horas de oscuridad. Para la alimentación, las dietas convencionales del laboratorio pueden ser usadas, con un suministro ilimitado de agua potable. Los animales pueden alojarse en jaulas agrupados por dosis, pero no debe interferir con las observaciones claras de cada animal (OECD No. 420, 2001; OECD No. 407, 2008).

Preparación de los animales. Animales jóvenes y sanos son seleccionados al azar, se marcan para permitir su identificación individual y se mantienen en su jaula durante al menos cinco días antes del inicio de la dosificación para permitir su aclimatación a las condiciones del laboratorio (OECD No. 420, 2001; Bermúdez, 2007).

Preparación de la dosis. Para ambos ensayos, el volumen de la dosis máxima para la administración no debe ser excedida. El volumen máximo de líquido que puede administrarse de una sola vez depende del tamaño del animal de ensayo. En roedores, el volumen máximo no debe exceder de 1ml/100gr de peso corporal. La dosis tiene que prepararse poco antes de la administración a menos que la estabilidad de la preparación sobre el periodo durante el cual puede ser usada, es conocida y mostrada para ser aceptada. La sustancia de ensayo se administra por sonda, con la dieta o con agua potable. El método de administración oral depende de la finalidad del estudio y de las propiedades físicas/químicas del material de prueba. Cuando sea necesario la sustancia de ensayo se disuelve o suspende en un vehículo adecuado. El uso de una solución/suspensión acuosa se recomendará primero (OECD No. 407, 2008; OECD No. 420, 2001).

7.5 Procedimiento

La administración de la dosis. Para el ensayo de toxicidad aguda la sustancia de ensayo se administra en una dosis única por alimentación forzada mediante sonda gástrica o una adecuada intubación con cánula. En la circunstancia inusual que una dosis única no sea posible, la dosis se puede administrar en fracciones más pequeñas durante un periodo no mayor a 24 horas. Los animales deben de estar en ayunas con agua *ad libitum* antes de la administración. Después del periodo de ayuno, los animales se pesan y se administra la sustancia de ensayo. Después de que la sustancia haya sido administrada, podrá continuarse el ayuno por 3-4 horas más (OECD No. 420, 2001; Pérez, 2011). Para el ensayo de toxicidad crónica, los animales se dosifican con la sustancia de ensayo diariamente siete días cada semana durante un periodo de 28 días. Cuando la

sustancia de ensayo se administra por sonda, debe hacerse en una sola dosis a los animales utilizando una sonda gástrica o una cánula de intubación adecuada. El volumen no debe superar 1ml/100gr de peso corporal. La dosis debe administrarse a la misma hora cada día (OECD No. 407, 2008; Rojas, 2009).

Estudio preliminar en la toxicidad aguda. El propósito del estudio preliminar es para permitir la selección de la dosis inicial adecuada para el principal estudio. La sustancia de ensayo se administra a cada animal en una manera secuencial (5, 50,300 y 2000 mg/kg). El estudio preliminar se completa cuando una decisión sobre la dosis inicial para el estudio principal puede ser hecha (o si la muerte se ve en la menor dosis fija) (OECD No. 420, 2001).

7.6 Estudio principal

7.6.1 El número de animales y dosis

Para los dos ensayos, un total de cinco animales del mismo sexo normalmente se utilizan para cada nivel de dosis investigado para observar la reversibilidad, la persistencia o la aparición retardada de efectos tóxicos, por lo menos durante 14 días después del tratamiento. El intervalo de tiempo entre la administración de cada nivel de dosis está determinado por la aparición, duración y gravedad de los signos tóxicos. El tratamiento de los animales con la dosis siguiente no se realizará hasta que haya seguridad sobre la supervivencia de los animales previamente tratados. Un periodo de 3 o 4 días entre la administración de cada nivel de dosis, se recomienda, si es necesario, para permitir la observación de toxicidad retardada. Particularmente en la toxicidad crónica, al menos tres grupos de prueba y un grupo control se deben utilizar. Las dosis deben seleccionarse teniendo en cuenta la eventual toxicidad existente. La dosis más alta debe ser elegida con el propósito de inducir efectos tóxicos, pero no la muerte ni un sufrimiento intenso. A partir de entonces, una secuencia descendente de niveles de dosis deben seleccionarse con el propósito de demostrar cualquier respuesta

relacionada con la dosis y efectos adversos no observados en un nivel más bajo de dosis (OECD No. 420, 2001; OECD No. 407, 2008; Pérez, 2011; Rojas, 2009).

Ensayo límite para la toxicidad aguda. El ensayo límite se usa principalmente en situaciones en las que el experimentador tiene información de que el material de ensayo probablemente no sea tóxico, es decir, que tiene la toxicidad por encima de la dosis límite reglamentario. Usando el procedimiento normal, un estudio preliminar con dosis inicial de 2000 mg/kg (o excepcionalmente de 5000 mg/kg), seguido por la dosificación de otros cuatro animales en este nivel sirve como una prueba límite para esta directriz (OECD No. 420, 2001).

7.7 Observaciones

En el ensayo de toxicidad aguda, se observarán los animales después de la dosificación al menos una vez durante los primeros 30 minutos, periódicamente durante las primeras 24 horas, con especial atención en las primeras 4 horas, y diariamente a partir de entonces, para un total de 14 días, salvo que los animales necesiten ser retirados del estudio y sacrificados necesariamente por razones de bienestar animal o que se encuentren muertos. Sin embargo, la duración de la observación no debe fijarse rígidamente. Se debe determinar según las reacciones tóxicas, su momento de aparición y la duración del periodo de recuperación, y lo que podrá ampliarse cuando se considere necesario. En el caso de la toxicidad crónica, el periodo de observación debe ser de 28 días, al menos que la duración del estudio sea de 14 días. Se debe realizar observación clínica general al menos una vez al día preferiblemente a la misma hora cada día y teniendo en cuenta el periodo más agudo de los efectos previstos tras la administración. La condición de salud de los animales debe ser registrada. En ambos ensayos, los signos clínicos incluyen cambios en la piel, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.), cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de las convulsiones clónicas y tónicas, movimientos, estereotipias o comportamientos anómalos, todos estos

deben registrarse. La observación también incluye las vías respiratorias, el sistema nervioso autónomo y central, el circulatorio, la actividad somato-motriz y el patrón de comportamiento. La atención debe ser dirigida a la presencia de temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo, sueño y coma (OECD No. 420, 2001; OECD No. 407, 2008; Bermúdez, 2007; Rojas, 2009; Pérez, 2008).

Peso corporal. El peso de cada animal debe determinarse poco antes de ser administrada la sustancia de ensayo, y al menos cada semana posteriormente. Cambios de peso deben calcularse y registrarse. Al final de la prueba los animales supervivientes se pesan y luego se sacrifican en condiciones adecuadas para evitar el sufrimiento innecesario (OECD No. 420, 2001; Pérez, 2011; Bermúdez, 2007).

7.8 Patología

Autopsia. Todos los animales de estudio serán sometidos a una necropsia macroscópica completa y detallada que incluye examen cuidadoso de la superficie externa del cuerpo, todos los orificios, las cavidades torácica, abdominal y craneal, así como su contenido. El hígado, riñones, glándulas suprarrenales, testículos, epidídimos, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales deben limpiarse de los tejidos adherentes y pesarse lo antes posible tras la disección para evitarse su desecación. Los siguientes tejidos deben de conservarse en el medio de fijación más adecuado (OECD No. 407, 2008; Ávila, 2011).

Histopatología. Se debe de llevar a cabo en los órganos y tejidos conservados que son susceptibles de ser dañados como es el caso del hígado, riñón y algunos otros. Se deben incluir todos los animales del grupo control y de los grupos de todas las dosis. Todas las lesiones macroscópicas se examinarán (OECD No. 407, 2008).

Hematología. Los exámenes hematológicos siguientes deben hacerse al final del periodo de ensayo: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de

eritrocitos, recuento leucocitario total y diferencial, recuento de plaquetas y medida del tiempo de coagulación (OECD No. 407, 2008).

Bioquímica clínica. Se hacen determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en los tejidos, y específicamente, en el riñón e hígado. Las investigaciones de plasma o de suero incluyen sodio, potasio, glucosa, colesterol, urea, creatinina total y albúmina (OECD No. 407, 2008).

7.9 Criterio para la clasificación de sustancias tóxicas

Las sustancias pueden ser asignadas a una de las cinco categorías de toxicidad basadas en la toxicidad aguda por vía oral, cutánea o por inhalación, de acuerdo a los criterios numéricos como se muestra en el siguiente cuadro (GHS, 2009; Bulgheroni, 2008.).

Tabla 2. Categorías de riesgo y estimación de toxicidad aguda por vía oral

Ruta de exposición	Categoría 1	Categoría 2	Categoría 3	Categoría 4	Categoría 5
Oral (mg/kg de peso corporal)	5	50	300	2000	*ver nota de tabla

***Nota de tabla 2.** Los criterios para la categoría 5 tienen por objeto permitir la identificación de las sustancias que tienen peligro de toxicidad aguda pero es relativamente bajo pero que en determinadas circunstancias puede representar un peligro para poblaciones vulnerables. Estas sustancias se prevé que tengan una DL50 oral dentro del intervalo de 2000-5000 mg/kg de peso corporal. La sustancia se clasifica dentro de esta categoría si la evidencia es confiable si ya está disponible los valores de la DL50 e indica que puede estar en el intervalo de Categoría 5 (GHS, 2009; Bulgheroni, 2008).

Tabla 3. Categorías y rangos para la clasificación de la toxicidad aguda por vía oral

Ruta de exposición	Clasificación de categoría o estimación del intervalo de toxicidad aguda obtenido experimentalmente
Oral (mg/kg de peso corporal)	0 < Categoría 1 ≤ 5 5 < Categoría 2 ≤ 50 50 < Categoría 3 ≤ 300 300 <Categoría 4 ≤ 2000 2000 < Categoría 5 ≤ 5000

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La farmacodinamia define y clasifica a los fármacos de acuerdo a su afinidad, potencia, eficacia y efectos relativos, uno de los índices es la determinación de la toxicidad aguda y crónica, de esta manera es posible determinar la bioseguridad de un producto y su eficacia. Existe la creencia popular de que este tipo de sustancias son inocuas para la salud, no existiendo ningún riesgo en su consumo. La FDA (Food and Drug Administration) ha informado de 185 muertes, en un periodo de 5 años, asociadas al consumo de plantas medicinales. La adquisición de la mayoría de las plantas medicinales en todo el mundo se realiza sin receta, con escasa información para el consumidor y muchas veces sin controles suficientes para garantizar la calidad de los productos comercializados. Solo en los últimos años, las plantas medicinales han empezado a tener una regulación más estricta por parte de las autoridades, principalmente por la presencia de informes de toxicidad en la literatura científica (Caméan y col, 2012)

La validación científica de las plantas medicinales es una necesidad, no podemos limitar a la sabiduría popular la seguridad y eficacia de una planta, pues cada parte de ella tiene numerosas sustancias con actividad biológica, capaces potencialmente de producir efectos tóxicos. La introducción de estas en la terapéutica debe efectuarse sobre una base científica que valide tanto sus acciones farmacológicas como su toxicidad (Pérez, 2008).

El árbol de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) posee actividad terapéutica contra diferentes afecciones y es muy utilizada por la población como medicina alternativa. Sin embargo, no hay estudios de toxicidad en donde se compruebe que las hojas de este árbol sean inocuas y que se pueden consumir sin mayor riesgo para la salud. Por otro lado, se sabe que las lectinas participan en muchas funciones fisiológicas y que cuando se encuentran unidas a toxinas pueden ser mortales, sin embargo, no existe información en la literatura respecto a la presencia de éstas proteínas en las hojas de ésta planta y si pudieran tener una

toxicidad en los animales. En base a lo anterior se plantearon la siguiente hipótesis y objetivos.

IV. HIPÓTESIS

La administración oral de extractos de hojas del árbol Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) no genera efectos tóxicos.

V. OBJETIVO GENERAL

- Determinar la toxicidad aguda y crónica del extracto crudo de las hojas del árbol flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon)*.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar la presencia de lectinas en extractos de las hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon)*.
- Determinar la toxicidad aguda de extractos de hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon)*.
- Determinar la toxicidad crónica de extractos de hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon)*.
- Analizar las alteraciones físicas o conductuales en las concentraciones estudiadas.
- Evaluar alteraciones histológicas en la administración aguda y crónica.
- Realizar un análisis estadístico.

VII. MATERIAL

- Hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon)*
- 48 ratas Wistar macho con peso promedio de 300-450 gr
- Cánula de alimentación oral 16G
- Reactivos de grado analítico
- Panel de fenotipo conocido formado por los siguientes grupos sanguíneos humanos: A_1, A_2, B, O

VIII. MÉTODOS

Obtención del Extracto crudo y de la Fracción sin pigmentos

Extracción acetónica y alcohólica de pigmentos. Los pigmentos fotosintéticos son componentes solubles en grasas por lo que su extracción se puede realizar con solventes orgánicos como acetona, metanol o etanol. En las extracciones de pigmentos, hay que tomar en consideración la alta sensibilidad de los pigmentos fotosintéticos a la luz. Por esto, la extracción debe realizarse en condiciones de luz tenue (González, 2002). A las hojas de flor de manita se le removieron los pigmentos mediante inmersión de las hojas en los solventes y numerosos lavados hasta obtener las hojas sin pigmentos.

Extracto crudo (EC). 1gr de hojas secas del árbol flor de manita se trituraron hasta polvo fino, se añaden 10ml de buffer PBS 0.1M pH 7.5 hasta la formación de una pasta de consistencia espesa. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 min. Al sobrenadante se le llamó extracto crudo.

Fracción sin Pigmentos (FSP). Se pesaron 1gr de hojas secas del árbol de Flor de Manita sin pigmentos se trituraron y se añaden 10ml de buffer PBS hasta la

formación de una pasta de consistencia espesa. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 min. Al sobrenadante se le llamó fracción sin pigmentos.

Remoción de lípidos

Método de Folch. Los lípidos de los diferentes tipos de muestras, se pueden separar del resto de biomoléculas mediante una extracción con disolventes orgánicos. El más utilizado es el método de Folch; en el cual se hace una extracción con cloroformo:metanol (2:1, V:V). El metanol rompe los enlaces que se dan entre los lípidos y las proteínas de las membranas e inhibe la acción de las enzimas lipasas (desnaturalizándolas), mientras que el cloroformo permite la disolución de los lípidos. Los lavados con NaCl permiten la eliminación de los materiales polares disueltos por el metanol, de manera que al añadir una disolución acuosa de NaCl al extracto de Folch y agitar vigorosamente, se forman dos fases inmiscibles: en la fase superior acuosa se encuentran las sustancias más polares y parte del metanol, mientras que en la fase inferior se encuentra el cloroformo con los lípidos. Los lavados se repiten varias veces, y se elimina la parte acuosa después de cada lavado. Se obtiene al final una mezcla de cloroformo:metanol (2:1,V:V) con los lípidos en ella, siendo este el extracto de Folch o extracto de lípidos purificados. (Roca y col., 2004). Para la remoción de lípidos de las hojas de Flor de manita, se utilizó una mezcla de 2:1 de cloroformo y metanol. Se añadió la muestra (extracto crudo y fracción sin pigmentos); se agitó suavemente repetidas veces (abrir tapón para la expulsión de vapores), se refrigeró y dejó reposar 18 horas; se separó cada una de las tres fases formadas.
La fase superior está formada por algunas proteínas y metanol (F1), en la fase intermedia se encuentran solamente las proteínas (F2), y la fase inferior la forman los lípidos que se arrastraron con el cloroformo (F3).

Cuantificación de proteínas

Método de Bradford. Este método se basa en la unión de un colorante Comassie Brillant Blue G-250 (también Serva Blue) a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas, una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la

forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Se basa en el cambio de absorbancia de 466nm a 595nm. Este método es sensible (1-15µg), simple, rápido, económico y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas (Reyes y col., 1985). Para cuantificar la concentración de proteínas se utilizó éste método. Se realizó una curva patrón con BSA (albúmina bovina) y reactivo de Bradford. La absorbancia obtenida en las muestras problema se interpoló en la curva con lo que se obtuvo la concentración en mg/mL

Ensayo de hemaglutinación. El ensayo de hemaglutinación consiste en la agregación sistemática de células mediada por macromoléculas específicas (anticuerpos o lectinas) que reconocen estructuras moleculares determinadas (antígenos) sobre la superficie celular. La mayoría de las lectinas aglutinan eritrocitos de todos los grupos sanguíneos, actuando a la misma dilución y por lo tanto no son específicas de grupo. Las específicas aglutinan eritrocitos humanos preferentemente de un determinado grupo sanguíneo. Esta especificidad permite usar a las lectinas como reactivo de tipificación de grupo sanguíneo y en la identificación de individuos secretores (Rodríguez y col., 2004). Se utilizó este ensayo para analizar la presencia de lectinas. Se utilizó un panel de fenotipo conocido (con los grupos sanguíneos humanos A1, A2, B y O). Utilizando el método de dilución serial se expresa la actividad de la lectina en unidades de hemaglutinación (UHA) estas se definen como el último pozo donde se aprecia la hemaglutinación (Girón-Calle y col., 2005), la actividad específica se expresa como el resultado de las unidades de hemaglutinación/ mg proteína (AE: UHA/mg proteína) y la mínima concentración de proteínas (C: µg/mL) necesaria para producir hemaglutinación. El ensayo cuenta con un control negativo (carente de hemaglutinación) y uno positivo (presenta hemaglutinación) (Goldstein y col., 1997, Zenteno, 1988).

Diálisis. En este procedimiento los solutos más pequeños que el tamaño de poro de la membrana de diálisis se intercambian libremente entre la muestra y la masa de solución hasta que se alcanza el equilibrio. Las sustancias más grandes no pueden atravesar la membrana y permanecen donde están. La diálisis es en especial útil para separar moléculas grandes, como proteínas o ácidos nucleicos de otras más pequeñas. Como las partículas solubles pequeñas se mueven libremente entre la muestra y el medio que las rodea, la diálisis puede repetirse varias veces para reemplazar el medio de la muestra con otra solución (Voet y col., 2007). Se realizaron diálisis utilizando membranas Spectra/Por 3 MWCO 3,500. Spectrumlabs 3233006 para el extracto crudo y la fracción sin pigmentos después de haberse sometido al método de Folch. Realizando varios lavados para asegurar la remoción de los tratamientos antes descritos.

Liofilización. Es un proceso de secado en el que el agua se sublima del producto una vez que este se congeló. Las ventajas particulares de este proceso son que los productos biológicos y farmacéuticos relativamente inestables en solución acuosa pueden procesarse y ponerse en unidades posológicas en estado líquido, aprovechando la relativa facilidad del procesamiento de un líquido (Gennaro, 2003). Después de someterse a las diálisis, se liofilizaron las muestras de los respectivos extractos para una mejor conservación y para concentrar los componentes. Se utilizó un equipo de liofilizado FreeZone 4.5.

Métodos para la determinación de la toxicidad aguda y crónica

1) **Grupo control negativo.-** Solución Salina (0.9%)
2) **Grupos experimentales.-** Extracto crudo de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) a diferentes dosis.

Los grupos experimentales se prepararon basándose en las categorías de toxicidad dadas por el sistema global de las naciones unidas (GHS), donde la categoría 1 de DL50 es que es fatal si es ingerida y la categoría 5 es que no

provoca daño y se le denomina “no clasificado”, en ésta categoría permite la identificación de sustancias que tienen una toxicidad aguda baja y que bajo ciertas circunstancias podría ser dañina en poblaciones vulnerables (Bulgheroni y col., 2009).

Se pesó la concentración deseada de hojas secas del árbol Flor de manita, se trituraron hasta polvo fino, se disolvieron en agua destilada para obtener la concentración por 100 gr de peso corporal. Se centrifugó a 2500 rpm por 15 min, se utilizó el sobrenadante. Con base en un incremento logarítmico en la concentración fueron calculadas las dosis en mg/kg. Las dosis fueron las siguientes:

Tabla 4. Dosis empleadas para el ensayo de toxicidad aguda

Grupos	Log Dosis	Dosis en mg/kg
I	Control negativo	Solución salina 0.9%
II	1.3	19.95
III	2.3	199.52
IV	3.3	2000
V	3.8	6300
VI	4.3	19,952

Tabla 5. Dosis empleadas para el ensayo de toxicidad crónica

Grupos	Log Dosis	Dosis en mg/kg
I	Control negativo	Solución salina 0.9%
II	2.3	200

Toxicidad aguda: Se conformaron aleatoriamente seis grupos experimentales de 6 ratas macho cada uno. Las sustancias de ensayo fueron administradas con un ayuno previo de 18 horas por vía oral mediante cánula de alimentación oral, con las siguientes dosis 19.95, 199.52 2000, 6300 y 19952 mg/kg de peso corporal y un grupo control al que se le administró una dosis de 1mL/100 gr peso corporal de solución salina 0.9%. Los animales fueron observados individualmente durante los primeros 30 minutos, con especial atención durante las primeras 4 horas y diariamente hasta los 14 días del experimento (OCDE No. 420, 2001).

Toxicidad crónica: Se conformaron aleatoriamente dos grupos experimentales de seis ratas macho cada uno, con dosis repetidas por 21 días de 200 mg/kg de peso corporal y un grupo control al que se le administró una dosis repetida por 21 días de 1mL/100 gr peso corporal de solución salina 0.9% (OCDE No. 407, 2008).

En ambos ensayos, los animales fueron observados día con día recogiéndose signos y síntomas de toxicidad (cambios en la piel, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones y excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, tamaño de la pupila, respiración anómala, etc.), cambios en la marcha, postura y respuesta a la manipulación, así como la presencia de las convulsiones clónicas y tónicas, movimientos, estereotipias o comportamientos anómalos). Se controló el peso de los animales como uno de los parámetros demostrativos de toxicidad.

Necropsia

Al concluir cada experimento se sacrificaron los animales bajo las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para el posterior estudio anatomopatológico macroscópico del hígado, riñones, estómago, bazo, pulmones, corazón, músculos, esófago, ganglios linfáticos y el intestino delgado para observar anormalidades o daños (inflamación, úlceras, adherencias de sustancias al pulmón, daño renal, daño cardiaco).

Método histológico para el análisis celular microscópico

El método histológico para la observación en microscopía simple consta de varias etapas: 1) Fijación, 2) Inclusión, 3) Corte, 4) Coloración, 5) Montaje

Fijación. Es el primer paso del proceso. Mediante la fijación se interrumpen los procesos del metabolismo celular y se conservan de una manera fidedigna las estructuras celulares y tisulares. La fijación se puede realizar mediante procedimientos físicos -congelación-, o procedimientos químicos, los utilizados generalmente, y que consisten en la inmersión de la muestra en una solución fijadora que suele ser formol neutro o tamponado (10-15%). La fijación debe iniciarse lo más pronto posible, para evitar la autolisis; uno de los requisitos para obtener una buena fijación es que los bloques de tejido a fijar tengan un tamaño que no exceda de 1 x 1 cm y que no sean más gruesos de 5 mm. El volumen de fijador debe ser veinte veces mayor al volumen de la muestra ya que el fijador pierde eficiencia durante el proceso de fijación. El tiempo de fijación debe durar desde unas horas a varios días, dependiendo del tamaño y espesor de la muestra (Gómez de Ferraris, 2009; Welsch, 2009).

Inclusión. Tras la fijación se comienza el proceso de inclusión de la muestra. Si el objetivo final es la obtención de una lámina delgada de aproximadamente 5µm de espesor que pueda ser teñida y observada con un microscopio óptico, es imprescindible que las muestras adquieran dureza para poder ser cortadas. Esto se consigue mediante la inclusión de los tejidos en sustancias que adquieren esa dureza por algún mecanismo. La inclusión más utilizada de forma rutinaria es la inclusión en parafina. El punto de fusión de la parafina oscila entre los 45 y los 60°C, según su composición. A temperatura ambiente la parafina solidifica y su consistencia es la suficiente para poder obtener láminas delgadas de un espesor adecuado. Como la parafina no se mezcla con el agua, es imprescindible que se elimine toda el agua existente en las muestras fijadas y para ello se realiza la

deshidratación, que además da algo de dureza a los tejidos. El agente deshidratante suele ser alcohol etílico, y para la deshidratación se procede a colocar las piezas de tejido en soluciones acuosas de concentraciones crecientes de etanol (50, 60, 70, 80, 90, 95, 100%), el tiempo de cada paso depende del tipo de tejido a estudiar y del tamaño de la pieza. Una vez deshidratadas las piezas, se procede a su aclaramiento, es decir, a la sustitución del agente deshidratante por otro, llamado líquido intermedio, que sea miscible con el medio de inclusión. Los productos más utilizados para este fin son, entre otros, el benceno, el xileno, el tolueno, etc. En consecuencia, una vez fijado y parado el metabolismo celular y retirada toda el agua de la muestra se realiza la inclusión, que tiene por objeto la ocupación por parafina de todos los espacios de la pieza de tejido que en vida estaban ocupados por agua. El proceso de infiltración se realiza en estufas de inclusión y a una temperatura un poco por encima del punto de fusión de la parafina que se utilice. Para iniciar el proceso de infiltración de la parafina se introduce la pieza en una mezcla a partes iguales de líquido intermedio y parafina a la temperatura antes dicha. Más tarde se realizan varios pases por parafina líquida hasta conseguir que la parafina caliente ocupe todos los espacios intra e intercelulares. Este proceso suele requerir varias horas de 45-60°C. Todo este proceso de la inclusión se puede realizar de forma manual dentro de la estufa o de forma automática mediante la programación adecuada de procesadores de tejidos. Finalmente se procede a la realización del bloque sólido que contiene la muestra a estudiar con el microscopio. Para ello se utilizan moldes metálicos o plásticos en los que se coloca la muestra histológica y se rellena con parafina líquida para luego dejar enfriar y permitir la solidificación completa del bloque de parafina que contendrá en su interior el objeto de estudio. Es fundamental a la hora de colocar la muestra en el molde orientar la pieza de tal forma que cuando se realicen los cortes se puedan observar aquello que se desea estudiar (Gómez de Ferraris, 2009; Welsch, 2009).

Corte. Para la obtención de láminas delgadas a partir del bloque de parafina se realiza el corte con unos instrumentos llamados micrótomos. El más utilizado es el

llamado de rotación o tipo Minot que tiene una cuchilla de acero asegurada fuertemente y que permanece fija con un ángulo de inclinación adecuado; un sistema de fijación del bloque de parafina que se desplaza verticalmente durante el corte; y un sistema mecánico que nos permite seleccionar los micrones que tendrá el corte en su espesor. Con estos instrumentos podemos obtener láminas de entre 7-15 µm de espesor. Estos cortes se extienden por flotación en agua a 37°C y se recogen con los portaobjetos, que se dejan posteriormente secar en la estufa a la temperatura dicha anteriormente (Ross, 2007; Gómez de Ferraris, 2009).

Coloración. Para proceder a la coloración de la muestra, el primer paso es la desparafinación, ya que los colorantes suelen ser soluciones acuosas. Para eliminar la parafina se suelen utilizar disolventes orgánicos tipo xileno. Más tarde se procede a la hidratación del corte en soluciones decrecientes de etanol y como paso final agua destilada. La coloración más habitual es la de hematoxilina-eosina (HE), que utiliza un colorante básico –la hematoxilina- que colorea estructuras ácidas de las células y tejidos, dichas estructuras de denominan basófilas (el núcleo celular o acúmulos de ácidos nucleicos como los ribosomas), y un colorante de carácter ácido –la eosina- que colorea estructuras básicas que se denominan eosinófilas o acidófilas (el citoplasma celular o algunos orgánulos como las mitocondrias). Para realizar esta coloración en primer lugar se introducen los cortes en una cubeta con hematoxilina durante unos minutos, se lava en agua corriente y luego en agua destilada, y a continuación se colorean con la eosina durante un minuto o menos. Con la coloración de HE los núcleos celulares se ven de color azul violeta y el citoplasma de color rosa-anaranjado (Ross, 2007; Gómez de Ferraris, 2009).

Montaje. Finalmente los cortes son lavados en agua destilada, deshidratados en soluciones crecientes de etanol, aclarados en xileno y cubiertos con el cubreobjetos depositando previamente unas gotas de medio de montaje. Tras el

montaje los medios histológicos ya están disponibles para su observación microscópica (Gómez de Ferraris, 2009).

Se realizó el anterior método histológico utilizando una inclusión en parafina de manera automatizada en el Histokinette y se realizaron cortes de 5 µm de espesor de los siguientes órganos: hígado, riñón, pulmón, intestino, bazo y ganglios linfáticos. Se utilizó la coloración HE para su posterior análisis en el microscopio. Se utilizó un microscopio óptico marca LEICA DM 1000 y el programa LAS Core para visualizar las imágenes a través de la computadora.

Análisis estadístico. Para este trabajo se utilizaron medidas de tendencia central como: media ($\overline{X}$), medidas de dispersión como: desviación estándar (DE) y error estándar (EE). Se utilizaron métodos estadísticos como la determinación del coeficiente de correlación de Pearson el cual cuantifica el grado de relación lineal entre dos o varias variables; otro de los métodos fue ANOVA, el cual resulta conveniente cuando deseamos comparar las medias entre dos o más grupos o conjuntos de datos; otro método utilizado fue el T-student que nos sirve para analizar diferencias entre los promedios de dos grupos u observaciones independientes. También se incluyeron los análisis post hoc, los cuales son de utilidad cuando en ANOVA se obtienen diferencias significativas entre más de dos promedios o grupos. Dentro de estos análisis se utilizó el método de Tukey y Dunnett, el primero consiste en hacer comparaciones múltiples luego de haber obtenido una razón F significativa en ANOVA; se utiliza para determinar en donde se encuentran las diferencias significativas, lo cual no se puede determinar con el ANOVA. El segundo método, el de Dunnett, el cual hace una comparación de las muestras con el grupo control. (Fuentes, 1997; Álvarez, 2007; Moncada, 2005). El programa estadístico utilizado fue GraphPad Prisma 4.0.

IX. RESULTADOS

Remoción de pigmentos de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Se inició con la remoción de pigmentos con solventes orgánicos (acetona y etanol) de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*). Esto se realiza con el fin de remover los pigmentos que pudieran interferir con la determinación de la actividad hemaglutinante de dicho extracto. Primero, se somete a las hojas a lavados con acetona para remover los pigmentos de color verde como las clorofilas a y b. Posteriormente después de la remoción de las clorofilas se procede a la remoción de carotenoides y xantofilas con etanol (color amarillo y rojo). A las hojas con pigmentos se le llamó extracto crudo (EC) y a las hojas sin pigmentos se le llamó fracción sin pigmentos (FSP).

Tabla 6. Remoción de los pigmentos de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Solvente	Pigmentos	Coloración
Acetona	Clorofilas	Verde-azul
Etanol	Carotenoides y xantofilas	Amarillo-rojo

Debido a que las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) contienen glucósidos y glucolípidos se procedió a hacer una remoción de estos mediante el método de Folch para que no tenga interferencia al momento de hacer los diferentes ensayos.

Del extracto crudo se obtuvieron tres fracciones: la primera a la cual se le llamó EC F1 está compuesta por algunas proteínas, pigmentos, y por metanol, la fase intermedia a la cual se le llamó EC F2 contiene a la mayor parte de las proteínas, y por último la fase inferior llamada EC F3 contiene el cloroformo con los lípidos removidos.

De la fracción sin pigmentos, igualmente, se obtuvieron tres fracciones: la primera se le llamó FSP F1 la cual contiene algunas proteínas en combinación con el metanol, la segunda fase llamada FSP F2 contiene a la mayoría de las proteínas y a la tercera fase se le llamó FSP F3 la cual contiene los lípidos que se removieron con el cloroformo.

Para eliminar los residuos de cloroformo y metanol, todas las fracciones se sometieron a varias diálisis y posteriormente se liofilizaron, para conservar solamente los componentes propios de las hojas de Flor de manita.

Cuantificación de proteínas

Con la finalidad de conocer la concentración de proteínas que contiene cada fracción del EC y de FSP se procedió a realizar una cuantificación de proteínas de las diferentes fracciones con el método de Bradford; los resultados indican que la fracción F2 de la FSP contiene mayor concentración de proteínas. Debido a que ésta fracción se encuentra enriquecida.

Tabla 7. Cuantificación de proteínas de las diferentes fracciones del extracto crudo y de la fracción sin pigmentos

Muestras	Cantidad de proteína (mg/mL)
Extracto crudo	0.45 ± 0.10
EC F1	0.22 ± 0.13
EC F2	0.21 ± 0.07
Fracción sin pigmentos	0.19 ± 0.10
FSP F1	0.13 ± 0.12
FSP F2	0.26 ± 0.06

La tabla muestra la media ± DE (n=5) de la concentración de proteína en cada extracto. EC: 18 gr/150 mL de agua estéril; EC F1: 0.052 gr/1mL de agua estéril; EC F2: 0.035 gr/1mL de agua estéril; FSP: 35gr/400 mL de agua estéril; FSP F1: 0.239gr/1mL de agua estéril; FSP F2: 0.020 gr/1mL de agua estéril.

Actividad hemaglutinante de los diferentes extractos de las hojas de Flor de Manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Para determinar la presencia de lectinas en los diferentes extractos de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), se utilizó un panel de fenotipo conocido con los siguientes grupos sanguíneos humanos: A_1, A_2, B, O; utilizándose también un control positivo de extracto crudo de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa*), y un control negativo utilizando solución buffer PBS 0.1M, pH 7; esto con la utilidad de comparar los resultados de nuestros extractos. En las siguientes tablas se puede observar la presencia de hemaglutinación en los diferentes extractos.

Como se muestra en la Tabla 8 se puede apreciar que a pesar de no mostrar una diferencia significativa en la actividad específica, se observó una mayor actividad cuando se utiliza el tipo sanguíneo B. También al utilizar éste grupo sanguíneo se observa que tiene una mayor afinidad.

Tabla 8. Actividad hemaglutinante del Extracto crudo (EC) de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).

Tipo Sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	131,072 ± 44,869	102,400± 35,054	0.0008± 0.0003
A_2	143,360 ± 40,960	112,000 ± 32,000	0.0007 ± 0.0003
B	163,840 ± 0	128,000 ± 0	0.00062 ± 0
O	139,264± 54,953	108,800± 42,932	0.0009± 0.0008

Los resultados muestran la media ± EE de un total de ensayos n=6. Se observa actividad hemaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos teniendo más actividad con el grupo sanguíneo B. UHA.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad Especifica (UHA/ mg/mL) y C es la concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Concentración de proteína: 0.45 ± 0.10 mg/mL (n=5).

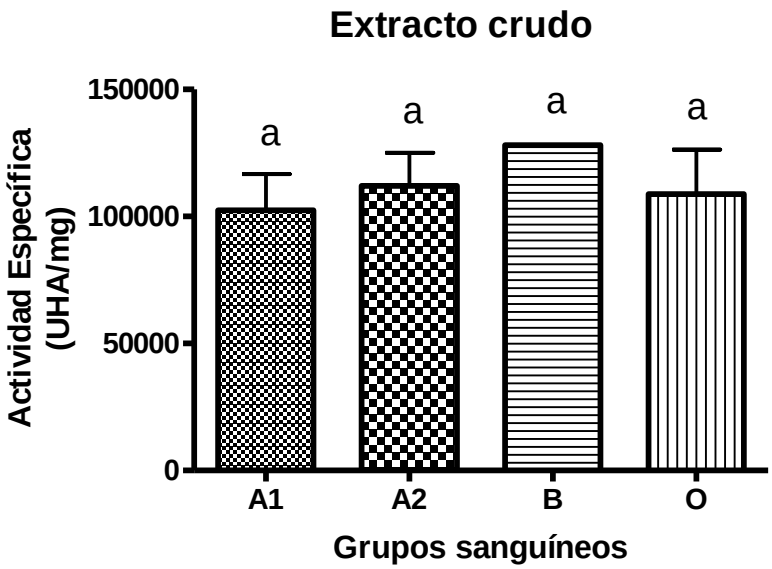

Figura 7. Actividad hemaglutinante del Extracto crudo. Los resultados muestran la media ± EE (error estándar) de un total de n=6 ensayos. Las letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (p>0.05) (ANOVA, Tukey) entre los grupos sanguíneos.

La figura anterior muestra que el extracto crudo posee actividad específica similar para los cuatro grupos sanguíneos, sin mostrar diferencia significativa, es decir, que posee una mezcla de lectinas afines para los carbohidratos de los cuatro grupos sanguíneos.

Como se comentó anteriormente, se realizó la remoción de lípidos para obtener una fracción enriquecida, los resultados del análisis de la presencia de lectinas se muestra a continuación.

Tabla 9. Actividad hemaglutinante del Extracto crudo F1 (EC F1) de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Tipo Sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	30,720 ± 14,481	163,404 ± 77,029	0.0005 ± 0.0002
A_2	40,960 ± 35,472	217,872 ± 188,682	0.0005 ± 0.0003
B	122,880 ± 70,944	653,617 ± 377,365	0.0001 ± 0.0001
O	122,880 ± 57,926	653,617 ± 308,118	0.0001± 0.00006

Los resultados muestran la media ± EE de un total de ensayos n=6. Se observa actividad hemaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos teniendo más actividad con el grupo sanguíneo B y O. UHA.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad Especifica (UHA/ mg/mL) y C es la concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Concentración de proteína: 0.22 ± 0.13 mg/mL (n=5).

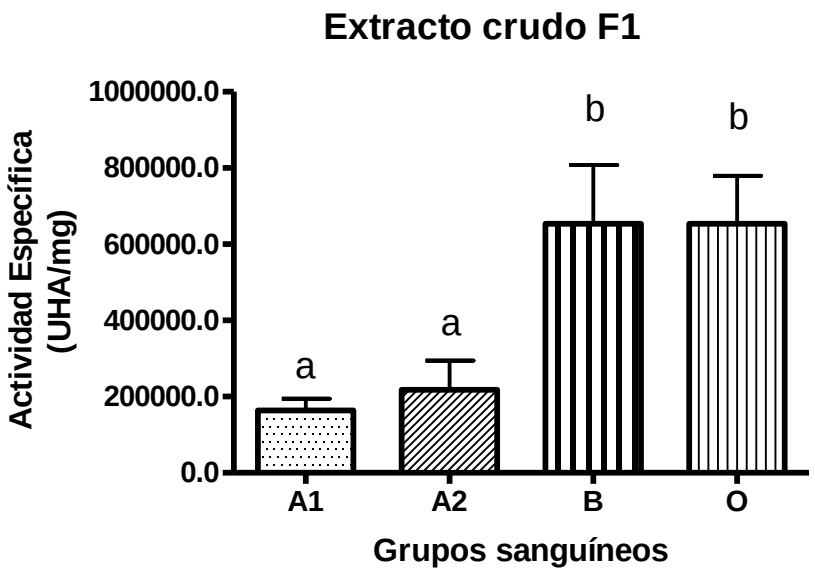

Figura 8. Actividad hemaglutinante del Extracto crudo F1. Los resultados muestran la media ± EE de un total de n=6 ensayos. Las letras diferentes indican que existe diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) (ANOVA, Tukey) mostrándose mayor actividad con los grupos B y O.

Como se puede apreciar, la fracción del EC F1 posee mayor afinidad hacia los carbohidratos de los grupos sanguíneos B y O. La afinidad disminuye en los grupos A_1 y A_2 mostrando una diferencia significativa entre ellos. En esta fracción se encuentran lectinas más específicas con B y O.

Tabla 10. Actividad hemaglutinante del Extracto crudo F2 (ECF2) de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Tipo Sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	11,520 ± 12,671	14,750 ± 16,224	0.013 ± 0.01
A_2	163,840 ± 0	209,782 ± 0.0002	0.0003 ± 0.00000001
B	116,053± 82,768	148,595± 105,978	0.0012± 0.0015
O	61,440 ± 28,963	78,668 ± 37,084	0.001 ± 0.0005

Los resultados muestran la media ± EE de un total de ensayos n=6. Se observa actividad hemaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos teniendo más actividad con los grupos sanguíneos A_2. UHA.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad Especifica (UHA/ mg/mL) y C es la concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Concentración de proteína: 0.21 ± 0.07 mg/mL (n=5).

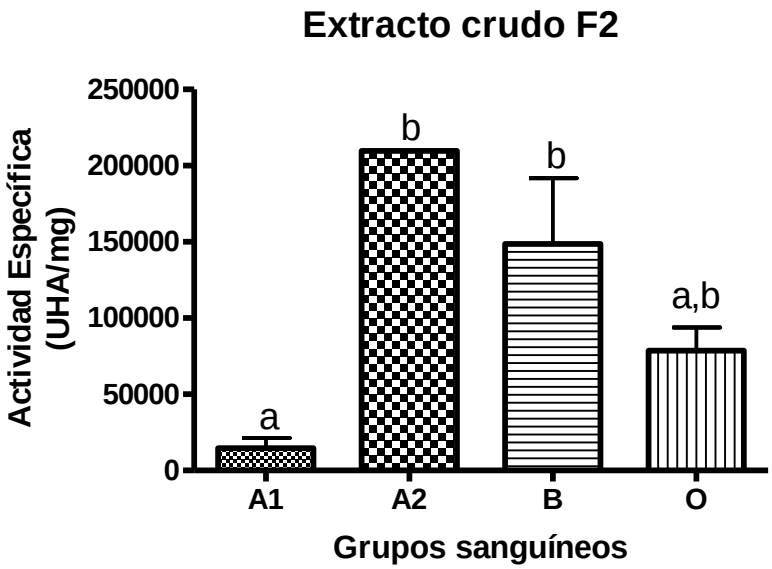

Figura 9. Actividad hemaglutinante del Extracto crudo F2. Los resultados muestran la media ± EE de un total de n=6 ensayos. Las letras diferentes indican que existe diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) (ANOVA, Tukey), mostrándose mayor actividad con el grupo A2.

La figura anterior muestra que la fracción F2 del extracto crudo posee mayor afinidad hacia los carbohidratos del grupo A_2, seguido con un poco menor por el grupo B sin mostrar diferencia significativa. La menor afinidad lo tiene por el grupo A_1 por el cual si muestra una diferencia significativa, y por el grupo O indica que no hay diferencia con respecto al grupo A_1 y B pero si con A_2. Las lectinas de esta fracción tienen mayor afinidad hacia los carbohidratos del grupo A_2 y B.

Como se puede observar en los resultados antes mostrados, la remoción de lípidos (glicolípidos), provoca un incremento en la actividad hemaglutinante.

En el estudio de la toxicidad se separan los componentes activos, al realizar la remoción de pigmentos que serán evaluados posteriormente en su carácter tóxico, permite analizar la actividad hemaglutinante de las lectinas, a continuación se muestran los resultados de la fracción sin pigmentos (FSP) y sin lípidos (FSP F1 y FSP F2).

Tabla 11. Actividad hemaglutinante de la Fracción sin pigmentos (FSP) de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Tipo Sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	128,000 ± 71,680	135,084 ± 14,167	0.0005 ± 0.00005
A_2	12,800 ± 10,861	97,709 ± 82,909	0.001 ± 0.001
B	11,946 ± 7820	91,195 ± 59,701	0.001± 0.0007
O	46,080 ± 5,068	117,251 ± 55,273	0.0004 ± 0.0005

Los resultados muestran la media ± EE de un total de ensayos n=6. Se observa actividad hemaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos teniendo más actividad con el grupo sanguíneo A_1. UHA.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad Especifica (UHA/ mg/mL) y C es la concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Concentración de proteína: 0.19 ± 0.10 mg/mL (n=5).

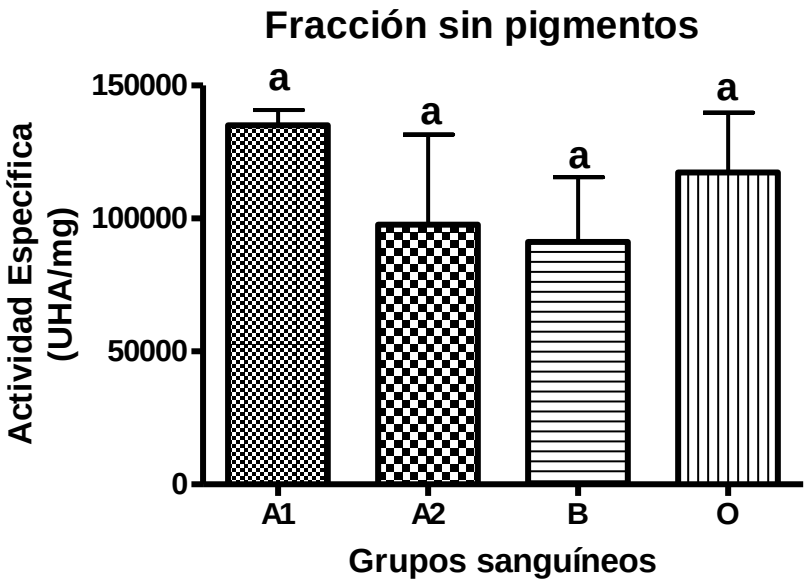

Figura 10. Actividad hemaglutinante de la Fracción sin pigmentos. Los resultados muestran la media ± EE de un total de n=6 ensayos. Las letras iguales indican que no existe diferencia estadísticamente significativa (p> 0.05) (ANOVA, Tukey) entre los cuatro grupos.

En la figura anterior se puede observar que la FSP posee mayor actividad con el grupo A_1 pero al hacer el análisis estadístico (ANOVA, seguido de un test de Tukey) no mostraron diferencias significativas entre ellos.

Tabla 12. Actividad hemaglutinante de la Fracción sin pigmentos F1 (FSP F1) de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Tipo Sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	30,720 ± 14,481	171,620 ± 80,902	0.0005± 0.0002
A_2	122,880 ± 70,944	686,480 ± 396,339	0.0001± 0.0001
B	10,240 ± 8,868	57,206± 49,542	0.002 ± 0.001
O	11,520 ±12,671	64,357 ± 70,789	0.0005 ± 0.003

Los resultados muestran la media ± EE de un total de ensayos n=6. Se observa actividad hemaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos teniendo más actividad con el grupo sanguíneo A_2. UHA.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad Especifica (UHA/ mg/mL) y C es la concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Concentración de proteína: 0.13 ± 0.12 mg/mL (n=5).

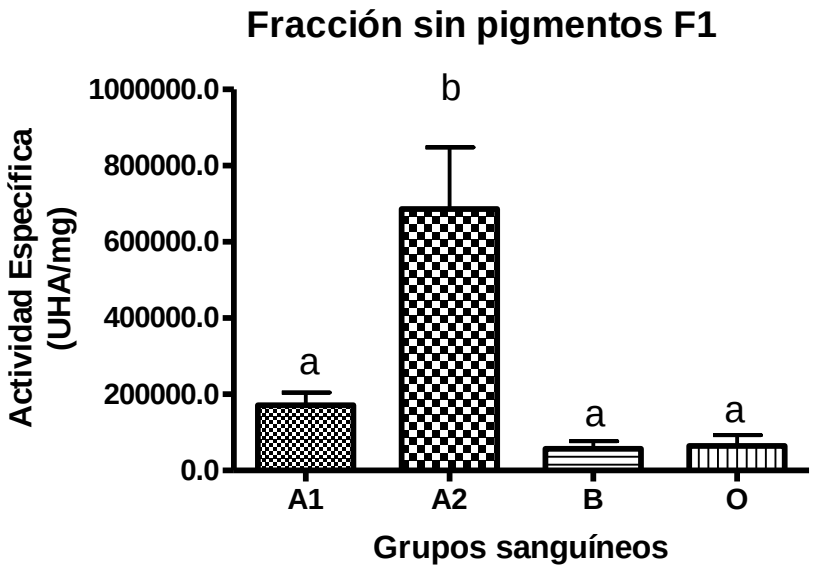

Figura 11. Actividad hemaglutinante de la FSP F1. Los resultados muestran la media ± EE de un total de n=6 ensayos. Las letras diferentes indican que existe diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) (ANOVA, Tukey) entre el grupo A2 respecto al resto de los otros grupos sanguíneos.

La figura anterior nos indica que la FSP F1 posee mayor actividad hacia los carbohidratos del grupo A2, siendo significativo estadísticamente con respecto a los demás grupos sanguíneos los cuales muestran una actividad notablemente menor.

Tabla 13. Actividad hemaglutinante de la Fracción sin pigmentos F2 (FSP F2) de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Tipo Sanguíneo	UHA	AE	C
A_1	109,226± 47,296	160,627± 69,553	0.0004± 0.0001
A_2	30,720 ± 14,481	45,176 ± 21,296	0.001 ± 0.0009
B	163,840 ± 0	240,941 ± 0	0.0003 ± 0
O	163,840 ± 0	240,941 ± 0	0.0003 ± 0

Los resultados muestran la media ± EE de un total de ensayos n=6. Se observa actividad hemaglutinante en los cuatro grupos sanguíneos teniendo más actividad con los grupos sanguíneos B y O. UHA.- Unidades de hemaglutinación, AE.- Actividad Especifica (UHA/ mg/mL) y C es la concentración mínima de proteína necesaria para generar una aglutinación en µg/mL. Concentración de proteína: 0.26 ± 0.06 mg/mL (n=5).

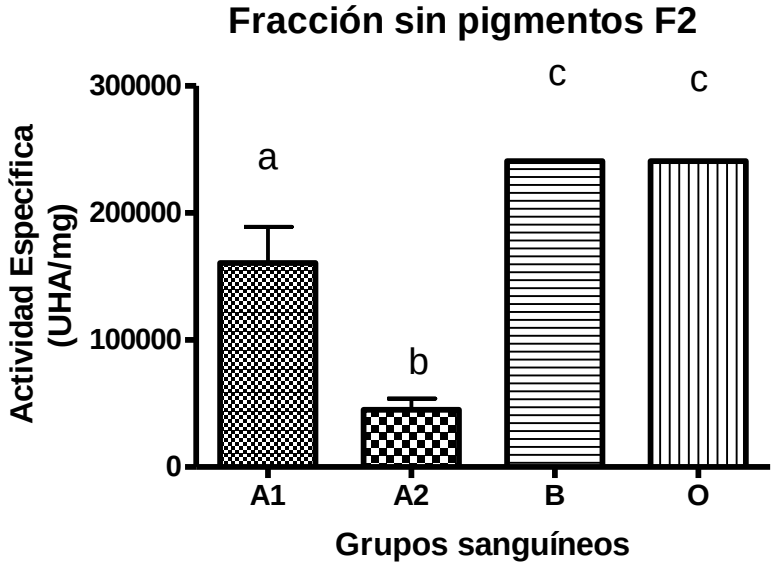

Figura 12. Actividad hemaglutinante de la FSP F2. Los resultados muestran la media ± EE de un total de n=6 ensayos. Las letras diferentes indican que existe diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$) (ANOVA, Tukey) entre los cuatro grupos sanguíneos, mostrando mayor actividad con los grupos B y O.

En la figura anterior podemos observar que la FSP F2 tiene una mayor actividad hacia los carbohidratos de los grupos B y O, siendo estadísticamente significativos con respecto a la actividad de A1 y A2, el cual, este último, tiene una actividad mucho menor al resto de los grupos.

Determinación de la toxicidad aguda de extractos de hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Se determinó la toxicidad aguda del Extracto crudo (EC) de las hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*); para este ensayo se siguió el método de dosis fijas de acuerdo con las directrices 420 de la OCDE. Se formaron seis grupos aleatoriamente de seis ratas Wistar macho cada uno. Para la administración del extracto crudo se utilizó una cánula de alimentación oral 16G, con las siguientes dosis únicas de: 19.95, 199.52 2000, 6300 y 19952 mg/kg de peso corporal y un grupo control al que se le administró una dosis de 1mL/100 gr peso corporal de solución salina 0.9%.

Figura 13. Administración de la solución salina. La imagen muestra el momento de la administración de la solución salina al 0.9% a una rata macho del grupo control mediante cánula de alimentación oral.

Signos clínicos

Después de la administración del EC de hojas del árbol flor de manita y en el período comprendido entre los 14 días de observación no se observaron cambios conductuales en los animales de experimentación correspondientes a las cinco dosis establecidas (19.95, 199.52, 2000, 3600, 19952 mg/Kg de peso corporal) con 100 % de supervivencia.

Se analizaron además los parámetros siguientes: Cambios en la piel y el pelaje, ojos, membranas mucosas, ocurrencia de secreciones y excreciones, actividad utonómica (lacrimación, piloerección, tamaño de la pupila, patrón respiratorio inusual), cambios en el paso, postura y respuesta a la manipulación, también presencia de movimientos tónicos o clónicos, estereotipias (acicalamiento excesivo, dar vueltas repetitivas) o comportamientos extraños (automutilación, caminar hacia atrás).

Los animales tratados no presentaron alteraciones físicas o conductuales en todas las dosis analizadas.

Registro de peso

El peso es muy importante cuando se está realizando un estudio de toxicidad, ya que una pérdida de peso de los animales es un indicador de que la sustancia experimental está causando toxicidad en ellos (Pérez, 2008; Pérez, 2011).

Se registró el peso de los animales de todos los grupos una vez por semana por 14 días, los resultados indican que hubo un aumento en los días 7 y 14 con respecto al día 1 del ensayo pero sin diferencia significativa entre los diferentes grupos ($p>0.05$) (ANOVA, seguida de un test de Dunnett).

Tabla 14. Registro de pesos en el ensayo de toxicidad aguda.

Registro de peso (gramos) Toxicidad aguda			
Grupo (control y EC)	**Día 1**	**Día 7**	**Día 14**
I (solución salina)	338.66 ± 59.38	379 ± 30.37	388.83 ± 37.75
II (19.95 mg/kg)	359.5 ± 42.24	417.16 ± 41.50	423.66 ± 38.33
III (199.52 mg/kg)	361.83 ± 69.04	400.16 ± 59.25	402.5 ± 71.71
IV (2000 mg/kg)	278.83 ± 49.83	344.66 ± 20.38	368.33 ± 36.66
V (6300 mg/kg)	379.16 ± 64.68	386.66 ± 39.22	395.16 ± 18.88
VI (19,952 mg/kg)	369.8 ± 59.96	388.8 ± 30.99	394.2 ± 26.45

Los valores corresponden al peso promedio ± DE con n=6 de los pesos obtenidos durante los 1, 7 y 14 días de observación de los diferentes grupos de experimentación. No se encontraron diferencias significativas entre las dosis en los días 1, 7 y 14.

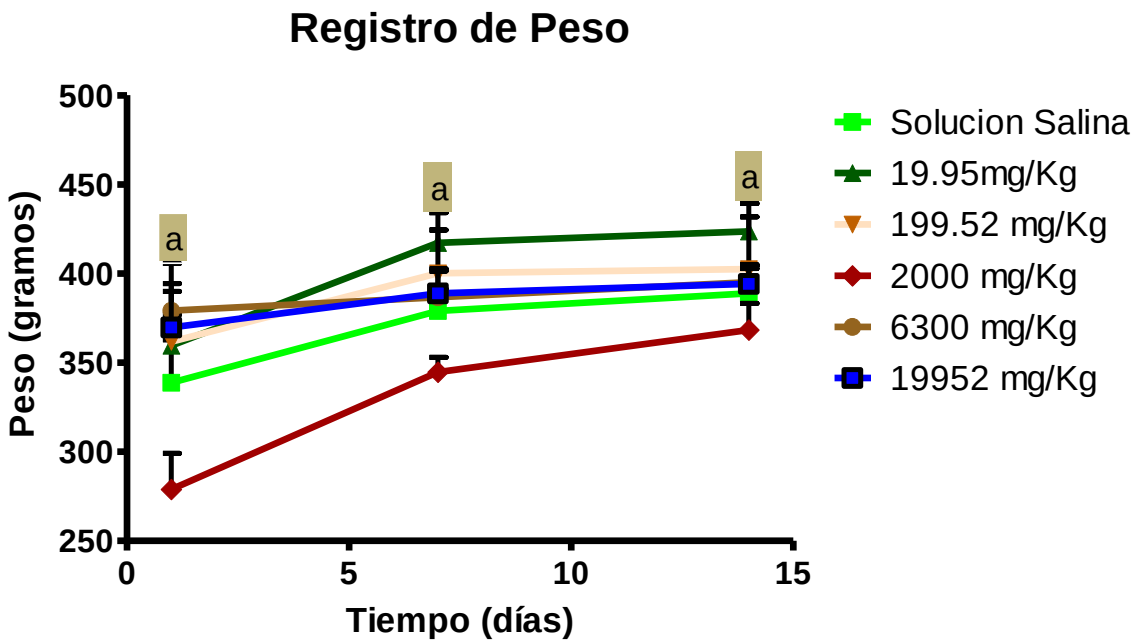

Figura 14. Registro de pesos en toxicidad aguda. La gráfica muestra el aumento de peso de los diferentes grupos de experimentación (n=6). No se observaron diferencias estadísticamente significativas (p>0.05) (ANOVA, seguido de un test de Dunnett) en el incremento de pesos entre las dosis en los tiempos (1, 7 y 14 días) evaluados.

En la figura anterior, se puede observar que en la dosis de 19.95 mg/kg hay diferencia significativa ($p<0.05$) (ANOVA, Tukey) con respecto al peso del día 1 con el día 14. Y en la dosis de 2000 mg/kg también se muestra diferencia significativa ($p<0.05$) (ANOVA, Tukey) con respecto al día 1 con los días 7 y 14. Esto nos indica que los animales siguieron aumentando de peso normalmente.

En el lote utilizado para la administración de la dosis de 2000 mg/kg se inició con animales de menor peso, sin embargo el incremento de peso a lo largo del ensayo de toxicidad aguda fue mayor; teniendo como resultado final un peso similar al encontrado en el resto de los grupos.

Por otro lado, al utilizar la dosis mayor de 19.95 g se encontró que siguen aumentando de peso, esto es otro de los criterios para denominarla como extracto "No clasificado".

Registro de temperatura corporal

Se midió la temperatura corporal en todos los grupos de experimentación durante los primeros 240 minutos de administrar las diferentes dosis del extracto crudo, esto con el fin de verificar que el extracto crudo de las hojas de Flor de manita no contenía compuestos pirógenos que podrían alterar los resultados de toxicidad. La siguiente tabla muestra que no hay incremento en la temperatura corporal durante los primeros 240 minutos después de la administración de las diferentes dosis, no muestra diferencia significativa ($p>0.05$) (ANOVA) con la temperatura basal.

Tabla 15. Registro de temperatura en el ensayo de toxicidad aguda

Registro de temperatura (°C) toxicidad aguda							
Grupo (control y EC)	**T° basal**	**15'**	**30'**	**60'**	**120'**	**180'**	**240'**
I (solución salina)	35.08 ± 1.5	34.96 ± 1.3	34.36 ± 0.4	34.25 ± 0.9	33.95 ± 1.1	34.11 ± 0.6	33.75 ± 0.6
II (19.95 mg/kg)	33.93 ± 1	35.26 ± 1.2	34.41± 0.7	34.4 ± 1.7	34.1 ± 1.2	34.63 ± 0.9	34.18 ± 0.9
III (199.52 mg/kg)	35.2 ± 1.5	35.13 ± 0.8	34.35 ± 0.5	34.81 ± 1.3	34.35 ± 0.8	34.68 ± 0.1	35.08 ± 0.8
IV (2000 mg/kg)	34.48 ± 1.6	34.86 ± 1.8	34.88 ± 1.4	34.01 ± 1.3	34.05 ± 0.9	34.21 ± 0.5	34.31 ± 0.6
V (6300 mg/kg)	34.2 ± 0.9	34.01 ± 0.7	34.25 ± 0.6	33.83 ± 0.4	33.81 ± 0.7	34.01 ± 0.3	33.73 ± 0.7
VI (19,952 mg/kg)	34.18 ± 0.9	34.21 ± 0.7	34.03 ± 0.7	33.96 ± 0.9	34.18 ± 1.1	33.78 ± 1.1	33.88 ± 1

La tabla muestra el registro de temperatura promedio ± DE (n=6) en un tiempo de 240 minutos (4 horas), de los diferentes grupos de experimentación.

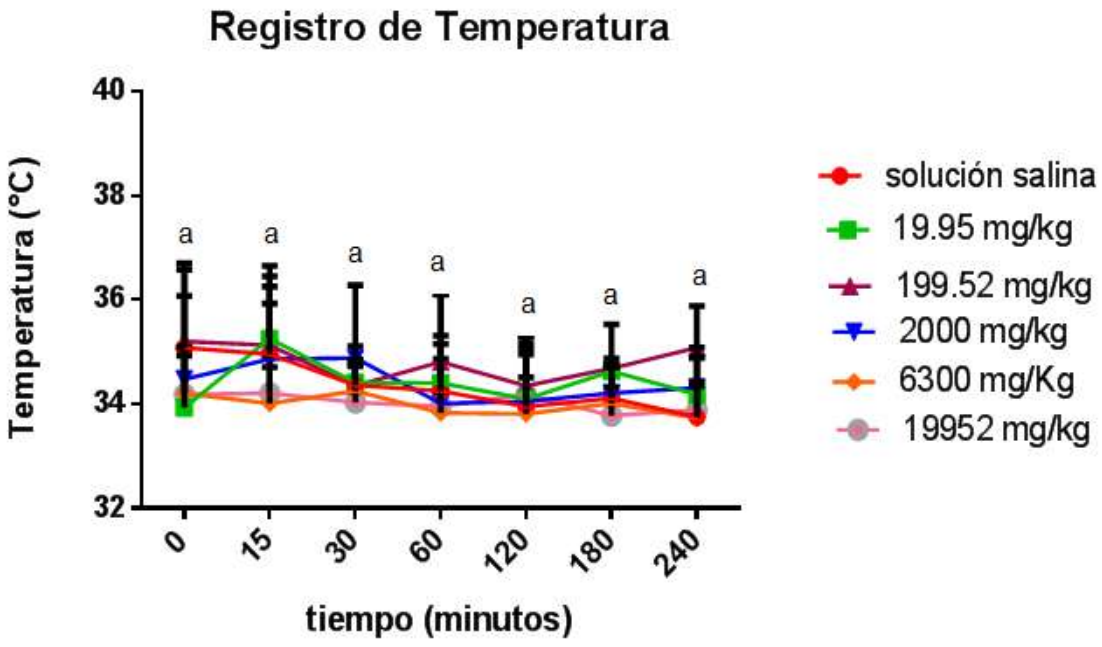

Figura 15. Registro de Temperatura en toxicidad aguda. La gráfica muestra el registro de temperatura en los primeros 240 minutos después de administrado el extracto crudo. Las letras iguales indican que no hay diferencia estadísticamente significativa p>0.05 (ANOVA, seguido de un test de Dunnett) en ninguno de los grupos de experimentación, con respecto a la temperatura basal de los animales.

Determinación de la toxicidad crónica de extractos de hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*)

Se determinó la toxicidad crónica del Extracto crudo (EC) de las hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*); para este ensayo se siguió el método de dosis repetidas por 28 días; estudio de toxicidad oral en roedores de acuerdo con las directrices 407 de la OCDE. Se formaron dos grupos aleatoriamente de seis ratas Wistar macho cada uno; con una dosis de 200 mg/kg de peso corporal administrada cada día por 21 días consecutivos y un grupo control al que se le administró una dosis diaria por 21 días de 1mL/100 gr peso corporal de solución salina 0.9%.

Registro de pesos

Para la determinación de la toxicidad crónica se registró el peso de los animales de los dos grupos una vez por semana los días 1, 7,14 y 21 hasta la conclusión del ensayo. Los resultados muestran un aumento de peso durante los días 7 y 14 en el grupo al cual se le administro el EC 200 mg/kg y una disminución en el día 21 pero no siendo estadísticamente significativo ($p>0.05$) (prueba t-student) con respecto al grupo control. Se observa una disminución en el peso pero sin llegar a ser menor que en el del día 1. Los resultados los muestra la siguiente tabla:

Tabla 16. Registro de pesos en toxicidad crónica

Registro de pesos (gramos)				
Grupo	**Día 1**	**Día 7**	**Día 14**	**Día 21**
I (Solución salina)	395.16 ± 32.1	383.66 ± 40.5	426 ± 54.4	397.66 ± 48.6
II (EC 200 mg/kg)	369.16 ± 18.5	375.16 ± 18.9	381 ± 23	371.33 ± 22.1

La tabla muestra el promedio de pesos ± DE de los dos grupos de experimentación (n=6) durante los 21 días de administración.

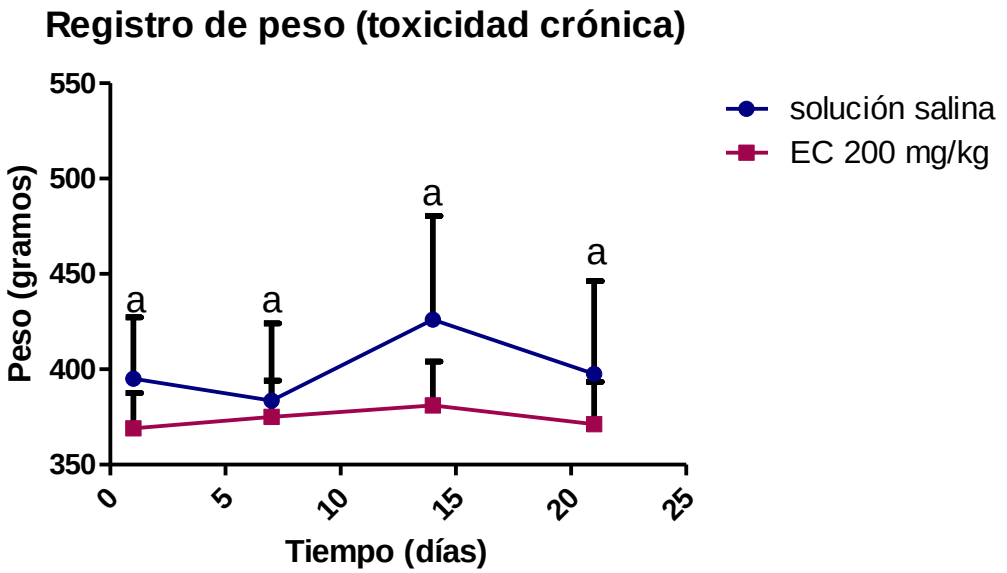

Figura 16. Registro de pesos en la toxicidad crónica. La gráfica muestra el peso promedio ± DE (n=6) de los diferentes grupos de experimentación. Las letras iguales indican que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la disminución del peso (p>0.05) (prueba t-student) en el día 21.

Al hacer un análisis adicional, comparando el peso en cada uno de los días, tanto de la solución salina como del extracto crudo 200 mg/kg, los resultados arrojaron que no hay diferencia significativa (p>0.05) (ANOVA, Tukey) en ninguno de los grupos con respecto a los días 1, 7 14 y 21.

Necropsia en el ensayo de toxicidad aguda

Después de concluido el ensayo para determinar la toxicidad aguda del extracto crudo de las hojas del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) se sacrificaron los animales bajo las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para evitar el sufrimiento innecesario; se continuó haciendo una necropsia de los animales para realizar un análisis anatomopatológico macroscópico de los diferentes órganos y tejidos. Los órganos a analizar fueron los siguientes: corazón, pulmón, ganglios linfáticos, hígado, bazo y riñones; también se observaron tráquea, estómago, esófago, intestino delgado, músculos, vejiga urinaria, próstata, testículos. Los daños a evaluar fueron: presencia de úlceras, adherencia en algún órgano, lesiones, color anormal, presencia de pus, abscesos, inflamación, daño renal, daño cardiaco.

Al hacer el análisis anatómico macroscópico en los diferentes grupos de experimentación se observó que ninguno tenía anormalidades en los múltiples órganos analizados, todos se encontraban dentro de lo normal para su especie como lo muestran las siguientes imágenes:

Figura 17. Realización de necropsia. La imagen muestra la realización de la necropsia para el posterior análisis anatomopatológico macroscópico. Se puede observar que los órganos se encuentran en perfecto estado.

Figura 18. Extracción de tráquea, pulmones y corazón. Se extrajeron diversos órganos para verificar la ausencia de adherencias en los pulmones. Todos los órganos estaban sanos.

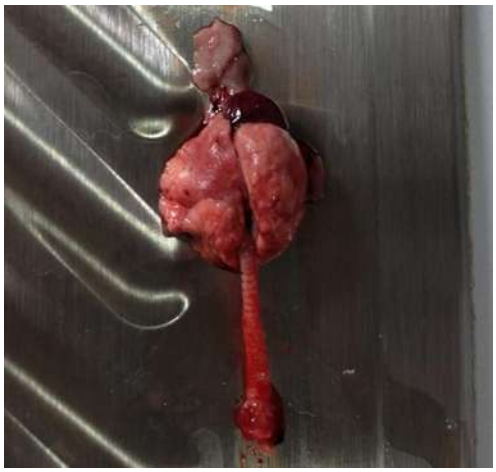

Figura 19. Observación de pulmones y tráquea. La imagen muestra la tráquea y pulmones de la rata en perfecto estado y sin adherencia de sustancias en ellos.

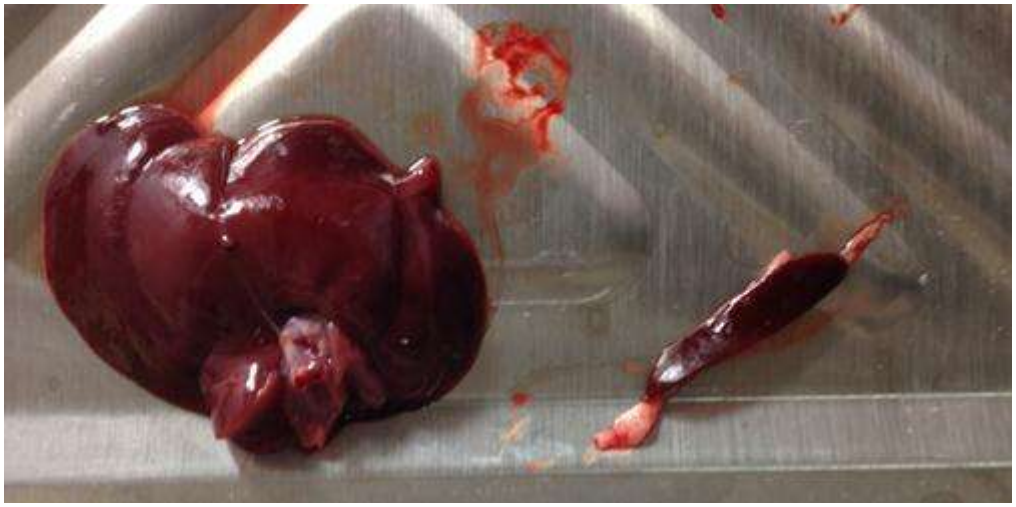

Figura 20. Observación de hígado y bazo. La imagen muestra el hígado y el bazo de la rata sin ninguna alteración. Se puede observar una coloración normal en ellos.

Figura 21. Observación de riñones. Se observa en la imagen un corte transversal de los riñones de la rata. Se observa una coloración normal y la corteza suprarrenal se encuentra sin ninguna alteración. No se aprecian daños.

Después de realizado el análisis macroscópico de los órganos, se procedió a tomar muestras de cada uno de ellos (corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón, ganglios linfáticos) y se colocaron en un frasco con formol al 10% para su conservación y posterior análisis celular.

Necropsia en el ensayo de toxicidad crónica

Después de administrar por 21 días continuos y de haber concluido el ensayo para determinar la toxicidad crónica del extracto crudo de las hojas del árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) se sacrificaron los animales bajo las especificaciones de la NOM-062-ZOO-1999 para evitar el sufrimiento; de la misma forma se realizó una necropsia para hacer un análisis macroscópico de los mismos órganos y tejidos que se observaron en el ensayo de toxicidad aguda. Se evaluaron los mismos daños que en el anterior ensayo.

Al hacer este análisis en los diferentes grupos de experimentación se observó que ninguno tenía anormalidades en los múltiples órganos analizados, todos se encontraban dentro de lo normal para su especie como lo muestran las siguientes imágenes:

Figura 22. Observación de varios órganos del grupo control. Se muestra en la imagen los órganos de una rata del grupo control (solución salina al 9%); se observa que el hígado, los riñones y los pulmones se encuentran en perfecto estado y sin ninguna lesión.

Figura 23. Observación de intestino e hígado. La imagen muestra el hígado e intestinos de una rata a la que se le administró la dosis crónica de EC (200 mg/kg) y se puede observar que el hígado posee un color normal y que los intestinos y el estómago no contienen ninguna lesión anormal.

Figura 24. Observación de pulmones e hígado. La imagen muestra a hígado, pulmones, corazón y tráquea del lote del ensayo de toxicidad crónica, en el que se puede observar color y textura normales, no se observa ningún daño.

Después de realizado el análisis anatomopatologico se procedió a tomar muestras de los diferentes órganos (corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón, ganglios linfáticos) y se colocaron en un frasco con formol al 10% para su conservación y posterior análisis celular, al igual que en la necropsia del ensayo de toxicidad aguda.

Figura 25. Conservación de las muestras. La imagen muestra los ganglios linfáticos de rata del ensayo de toxicidad crónica sumergidos en formol al 10% para su posterior análisis celular.

Histopatología

Después de conservadas las muestras en formol se procedió a analizar los órganos y tejidos microscópicamente siguiendo la metodología arriba descrita. Las observaciones se hicieron con un microscopio óptico con lentes de 10X.

Se observaron las muestras correspondientes a las dosis del ensayo de toxicidad aguda y la dosis empleada en el ensayo de toxicidad crónica, así como su control negativo de solución salina 0.9%.

No se observaron daños a nivel celular en ninguna de las dosis analizadas, como se pueden ver en las siguientes imágenes:

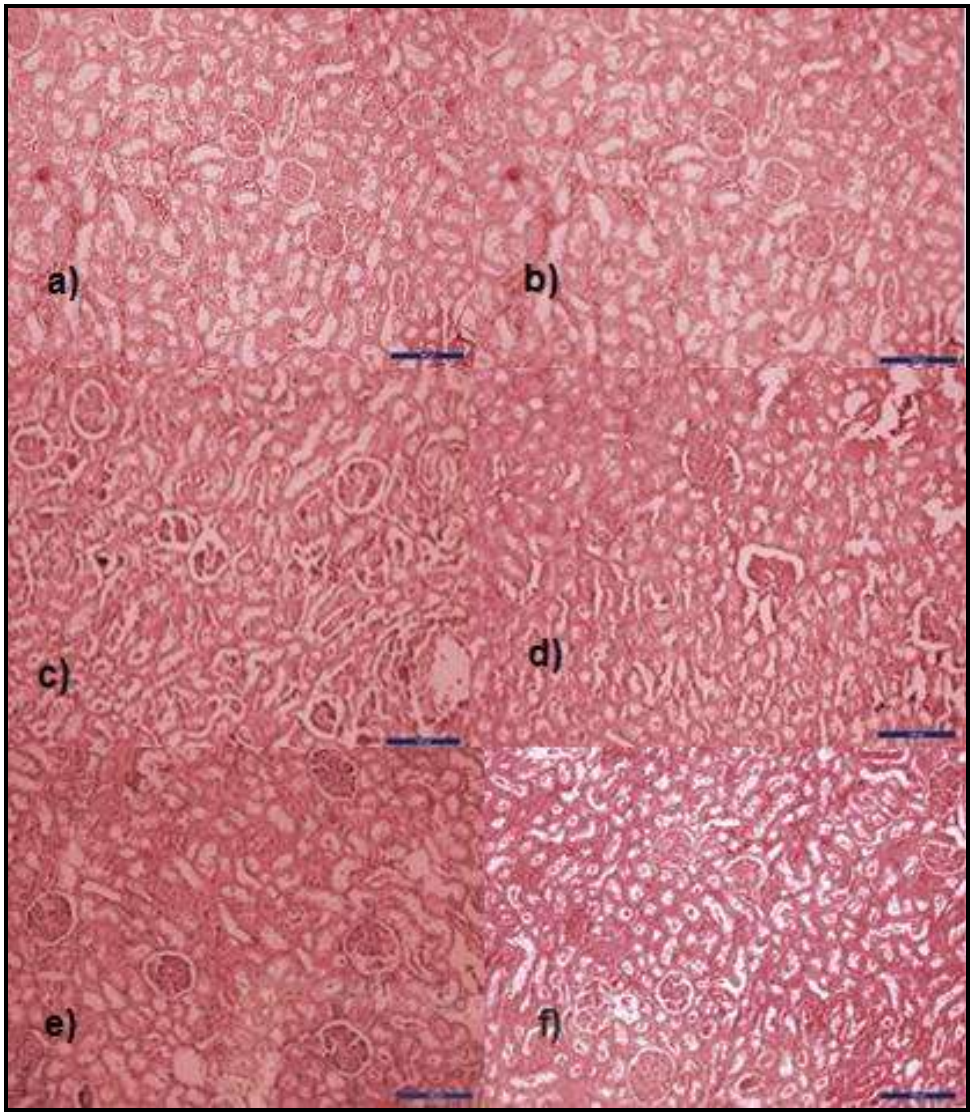

Figura 26. Micrografías del análisis celular de riñón en ratas. La imagen muestra los cortes de riñón hechos en el ensayo de toxicidad aguda; a) solución salina 0.9% (control negativo); b) 19.95 mg/kg; c) 199.52 mg/kg; d) 2000 mg/kg; e) 6300 mg/kg; f) 19 952 mg/kg. Se observa que no existe daño en nefronas y en túbulos renales (10X).

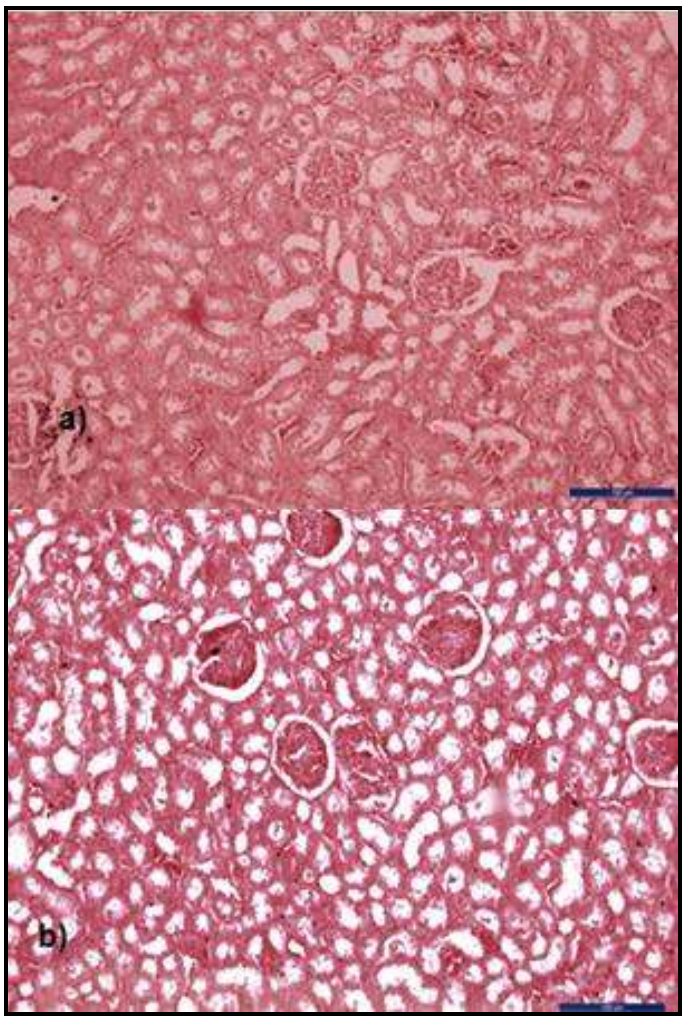

Figura 27. Micografías del análisis celular de riñón en el estudio de toxicidad crónica. La imagen muestra los tejidos de riñón de ratas sometidas al estudio de toxicidad crónica en donde: a) solución salina 0.9% (control negativo); b) EC 200 mg/kg. Se puede apreciar que no existe ningún daño microscópico (10X).

X. DISCUSIÓN

Este trabajo de tesis se centró en las hojas árbol flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*), en la medicina tradicional existen reportes que es utilizada para tratar diferentes enfermedades (Martínez, 2011; Aguilar, 2003; Méndez, 2006). Los dos reportes farmacológicos indican que los extractos de hojas tienen actividad anticolinérgica. Sin embargo, hasta donde sabemos no existen reportes de estudios referentes a la toxicidad de extractos de hojas, por lo que en éste trabajo se concentró en analizar tanto la toxicidad aguda como crónica.

Para analizar el o los componentes bioactivos, así como tóxicos de los extractos de hojas de una planta, en este caso se utilizaron por un lado los extractos crudos (acuosos) de las hojas, las fracciones sin pigmentos y sin lípidos.

Por otro lado las lectinas participan activamente en una multitud de funciones en la fisiología de los organismos. Si éstas proteínas se encuentran asociadas a toxinas son sumamente tóxicas como es el caso de las semillas del ricino (*Ricinus communis*) son venenosas para el hombre, los animales y los insectos, es uno de los venenos más potentes, basta un miligramo para matar a una persona adulta. Fueron identificadas por Stillmark en 1888. La ricina pertenece a la familia de proteínas conocidas como proteínas inactivantes de los ribosomas ["ribosome-inactivating proteins" (RIPs)], que presenta en su estructura a una toxina y una lectina que reconoce galactosa (Sharon y Lis, 2001; Varki, 2009).

Por lo anterior, como primer objetivo se planteó la identificación de lectinas en extractos de ésta planta, ya que no existen reportes en la literatura de la presencia de éstas proteínas en las hojas de flor de manita.

Primeramente se determinó la presencia de lectinas en el Extracto crudo de las hojas, y como lo muestran los resultados (Figura 7), se obtuvo actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos humanos: A_1 y A_2 (GalNAc-Gal-Fuc), B (Gal-Gal-Fuc) y O (Fuc-Gal). Esto indica que en el extracto crudo de las

hojas existe una variedad de lectinas que reconocen a los carbohidratos terminales de cada grupo sanguíneo humano. El extracto crudo mostró actividad específica similar en los cuatro grupos sanguíneos.

Después de determinar la presencia de lectinas en el extracto crudo de las hojas de Flor de manita *(Chiranthodendron pentadactylon)* se prosiguió con la remoción de lípidos y glicolípidos presentes en esta fracción, ya que estos pueden interferir al momento de obtener los demás resultados. El método utilizado para la remoción de lípidos fue el propuesto por (Folch, 1956). De cada fracción se obtuvieron dos fracciones más, las cuales se dializaron y liofilizaron para eliminar algunos componentes como el metanol y cloroformo, conservando sólo los componentes propios de cada fracción. A las fracciones resultantes también se les determinó la actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos humanos.

Del extracto crudo se obtuvieron dos fracciones a las cuales se les llamó EC F1 y EC F2, la primera contiene al metanol y a algunas proteínas, la segunda contiene a la mayoría de las proteínas, se les realizaron varias diálisis exhaustivas para eliminar cualquier de residuo de metanol y cloroformo. Posteriormente se les determinó su actividad hemaglutinante; ambas presentaron actividad con los cuatro grupos sanguíneos pero el EC F1 mostró mayor actividad específica con el grupo B (Gal-Gal-Fuc) y con el grupo O (Fuc-Gal) (Figura 8). El EC F2, en cambio, mostró mayor actividad específica para el grupo A_2 (GalNAc-Gal-Fuc) (Figura 9). Como se puede apreciar las proteínas se separan por la solubilidad y esto se hace evidente con la especificidad hacia los distintos carbohidratos.

Después de verificar la presencia de lectinas en el extracto crudo de las hojas de Flor de manita, se prosiguió con la remoción de pigmentos de las hojas obteniendo la Fracción sin pigmentos (FSP), esto, con la finalidad de separar los pigmentos y tener una concentración mayor de proteínas. En esta fracción también se determinó la actividad hemaglutinante hacia los cuatro grupos sanguíneos humanos; obteniendo actividad con todos, pero mostrando mayor actividad específica con el grupo sanguíneo A_1 (GalNAc-Gal-Fuc), (Figura 10). Lo anterior

comprueba que la estabilidad y actividad de las lectinas no se ven afectadas por la remoción de pigmentos.

De igual manera, a la FSP se le aplicó la remoción de lípidos con el método antes dicho. Se obtuvieron dos fracciones, las cuales fueron FSP F1 y FSP F2; ambas mostraron actividad hemaglutinante con los cuatro grupos sanguíneos. La FSP F1 mostró que obtuvo una mayor actividad específica con el grupo A_2 (GalNAc-Gal-Fuc) (Figura 11). En cambio, la FSP F2 obtuvo una mayor actividad específica con el grupo B (Gal-Gal-Fuc) y con el grupo O (Fuc-Gal) (Figura 12). De nueva cuenta se observa que cada fracción contiene lectinas que son específicas para diferentes carbohidratos terminales de los eritrocitos sanguíneos humanos.

Después de determinar la presencia de lectinas en las múltiples fracciones de las hojas de flor de manita, se continuó con el segundo objetivo de este trabajo que fue la determinación de la toxicidad aguda y crónica del extracto de las hojas del árbol Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*).

Este es el primer trabajo en donde se reporta la toxicidad aguda y crónica de las hojas de Flor de manita, sólo había estudios anteriores en donde se reporta la toxicidad de sus flores, en donde se menciona que las infusiones de las flores no poseen toxicidad aguda en el ratón por vía oral hasta una dosis de 3 g/kg de peso corporal (Méndez, 2006). En otro estudio se reporta que un extracto polar de las flores, administrado por vía peritoneal en ratón a la dosis de 300 mg/kg, ejerció un efecto anticolinérgico, observándose piloerección, ligera pérdida del tono muscular, catatonia y aumento del diámetro pupilar (Bliblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana, 2009). Otro estudio nos revela que al utilizar el extracto metanólico de las flores hasta una concentración de 4800 mg/kg no hubo mortandad en los animales ni se observaron daños macroscópicos en los órganos observados (Velásquez, 2006).

Para evaluar la toxicidad aguda se utilizó el extracto crudo de las hojas de flor de manita a diferentes concentraciones, desde una concentración menor de 19.95 mg/kg hasta una concentración mayor de 19,952 mg/kg. Se utilizaron modelos

biológicos como lo son ratas macho de la cepa Wistar, el método utilizado concuerda con las directrices internacionales para la determinación de la toxicidad aguda en roedores (OECD No. 420, 2001).

Como lo indica el ensayo, se les administró una dosis única de extracto crudo a diferentes dosis, incluyendo un grupo control al que se le administró solución salina 0.9% para que fuera posible realizar una comparación al momento de que ocurriera algún cambió con los animales a los que se les administró el extracto crudo.

Después de administrar las cinco diferentes dosis, se continuó con la observación de los animales durante las primeras cuatro horas después de la administración. Los animales se comportaron de una manera habitual, similar al grupo control; no se observaron cambios físicos ni conductuales aparentes. Se prosiguió con una observación de 72 horas posteriores hasta 14 días después de la administración. En este periodo de tiempo los animales no mostraron comportamiento distinto al del grupo control, descartando algún síntoma de toxicidad.

Otro de los parámetros a evaluar fue el peso de los animales, los cuales se pesaron antes de la administración de las dosis de extracto crudo y durante los días 7 y 14, el cual fue el periodo de tiempo de observación. Es por ello que una variación en su valor sugiere algún efecto adverso de drogas o químicos y se considera significativa si hay una disminución de más de 10% del peso corporal inicial (Rojas, 2009).

El peso de los animales se incrementó en el día siete y se volvió a incrementar en el día 14, siendo prácticamente normal para el incremento de peso de su especie y su ciclo de vida (Figura 14). Con la ausencia de la disminución de peso se descartó que el extracto crudo de las hojas de flor de manita alterara de alguna forma el metabolismo de los animales. Esto es similar a lo que fue reportado para la toxicidad aguda de extractos de hojas de *Boldoa purpurascens Cav, Werneria dactylophylla* y *Solanum torvum;* siguiendo la misma metodología *y* las cuales resultaron ser no tóxicas (Pérez, 2008; Ávila, 2011; Pérez, 2011).

Como otro parámetro adicional, se tomó la temperatura corporal de los animales antes y después de la administración del extracto crudo de las hojas; con la finalidad de descartar que el extracto contuviera agentes inductores de fiebre. Se tomó la temperatura basal de los animales como parámetro de comparación, y consecuentemente se volvió a medir a diferentes tiempos después de la administración. Los resultados arrojaron que el extracto crudo de las hojas a diferentes concentraciones no se trata de una sustancia pirógena, manteniéndose la temperatura corporal en un intervalo similar en todas las dosis administradas (Figura 15).

Para concluir el ensayo de toxicidad aguda, se sacrificó a los animales realizándoles una necropsia, en la cual se observó macroscópicamente la posible alteración de los diferentes órganos de los animales. Se observaron los múltiples órganos con todas las dosis administradas, en las que no se observó ninguna alteración macroscópica (Figuras 17-21).

La realización de este ensayo concuerda con otros estudios en los cuales de determinó la toxicidad aguda de diferentes extractos de plantas, utilizando la misma metodología y criterios de evaluación (Pérez, 2008; Ávila, 2011; Bermúdez, 2007; Pérez, 2011).

Continuando con el objetivo de este trabajo, posteriormente se determinó la toxicidad crónica del extracto crudo de las hojas de Flor de manita. Para la realización de este ensayo se utilizó el extracto crudo de las hojas de Flor de manita con una concentración de 200 mg/kg, administrando también solución salina a un grupo control, en ambos grupos se les administró cada sustancia por 21 días consecutivos.

El primer parámetro a evaluar fue el peso de los animales, se tomó el peso antes de la administración y posteriormente en los días 7, 14 y 21 durante la administración del extracto crudo. El peso aumento en los días 7 y 14 y en el día 21 se vio disminuido pero sin ser menor que el peso registrado antes de la administración del extracto crudo (Figura 16).

Este acontecimiento no se tomó como indicio de toxicidad ya que la pérdida de peso en los animales no correspondió al 10% de su peso total sino solamente una pérdida del 3% con respecto al día 14 en el cual se habían pesado. Con respecto al peso inicial (antes de la administración) no hay disminución y prácticamente los pesos se mantuvieron similares.

Por otro lado es importante mencionar que la disminución de peso en los animales se debió al inicio de la huelga en la UMSNH, los trabajadores no nos permitieron entrar a alimentar a los animales, lo que provocó éste descenso observado, sin embargo, como se menciona arriba, no existió una diferencia significativa en el peso de los animales al final del estudio de la toxicidad crónica.

Este estudio concuerda con otro trabajo en el cual se determinó la toxicidad crónica de plantas que correspondió al extracto metanólico de hojas de maracuyá (*Passiflora edulis Sims*), siguiéndose la misma metodología descrita en este trabajo para la determinación de la toxicidad crónica (Rojas, 2009).

Posteriormente, también se realizó una necropsia similar que en el ensayo de toxicidad aguda, analizando macroscópicamente cada órgano y observando cualquier signo de toxicidad, a lo que no hubo ninguna alteración en su organismo (Figura 22-24). Una fracción de cada órgano se conservó en formol al 10% para continuar el análisis celular microscópicamente.

Finalmente se realizó un análisis histológico de cada órgano conservado de las diferentes dosis, tanto del ensayo de toxicidad aguda como de la toxicidad crónica.

Se observaron los cortes en los diferentes órganos analizados de todas las dosis administradas y en ninguno se observaron anormalidades en los túbulos renales y en las nefronas; al contrario con otro estudio en el cual se evaluó la toxicidad de *Passiflora edulis*, y los análisis histológicos arrojaron un daño en riñón e hígado en donde se observó nefritis crónica focal e infiltrado crónico inflamatorio, respectivamente; con una dosis de 200mg/kg por 28 días (Rojas, 2009).

Los resultados obtenidos nos revelaron que el extracto crudo de las hojas de Flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) no es tóxico, ya que la administración por vía oral con una dosis de hasta 19 gr por cada kg de peso corporal en ratas no generó la muerte de ningún animal, ni manifestó la existencia de signos de toxicidad relevantes durante el periodo de tiempo de observación, tampoco hubo alteraciones de órganos a nivel macroscópico y a nivel celular; por lo que pertenece a la clasificación de no toxica o “no clasificado” (GSH, 2009).

Lo anterior es sumamente importante ya que el presente trabajo confirma la seguridad del uso de hojas de flor de manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) en la medicina tradicional.

XI. CONCLUSIONES

- Los extractos de las hojas de Flor de Manita *(Chiranthodendron pentadactylon)* poseen actividad hemaglutinante con los cuatro tipos sanguíneos humanos (A1, A2, B, O).
- El extracto crudo (EC) mostró más actividad hemaglutinante con el grupo sanguíneo B.
- El extracto crudo (EC) de las hojas del árbol flor de manita *(Chiranthodendron pentadactylon)* no provocaron alteraciones conductuales en ninguno de los grupos evaluados.
- No se presentó toxicidad con la dosis de 19.95gr/Kg, por lo tanto el extracto crudo de las hojas del árbol flor de manita se determina como “no clasificado”.
- No se observaron daños ni alteraciones en los animales con las dosis repetidas de 200mg/kg por 21 días.
- El extracto crudo de las hojas del árbol flor de manita *(Chiranthodendron pentadactylon)* desde el punto de vista macroscópico no produce daño alguno en ningún órgano.
- A nivel celular, no se observaron daños en los tejidos y órganos evaluados en todas las dosis administradas.

XII. PERSPECTIVAS

- Purificar las lectinas que se encuentren en las hojas del árbol Flor de Manita *(Chiranthodendron pentadactylon).*

- Determinar la toxicidad de la Fracción sin pigmentos y de los pigmentos por separado de las hojas de Flor de Manita *(Chiranthodendron pentadactylon).*

- Analizar la toxicidad de las fracciones separadas por el método de Folch (ECF1, ECF2, FSPF1 y FSPF2) de las hojas del árbol Flor de manita *(Chiranthodendron pentadactylon).*

XIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, A., López, V.M., Xolalpa, M.S. 2003. Los tratamientos populares y el personal de salud. Relevancia de la herbolaria. México, D.F: 1-87.
- Alvarado, S., Castro, L. 2010. Histología del hígado de ratas tratadas con una infusión de hojas de Higuera (*Ficus carica*). Reporte de caso. Rev Fac Cs Vets; Venezuela. 51 (2): 99-103. Disponible en: http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/revisfcv/article/view/73/57
- Álvarez, R. 2007. Análisis de la varianza. En: Estadística aplicada a las ciencias de la salud. Ed. Díaz de Santos: 515.
- Audersik, T., Audersik, G., Byers, B. 2003. Reacciones dependientes de la luz. En: Biología: la vida en la tierra. Pearson Educación: 119.
- Ávila, J., Ruiz, G., Tórrez, C., et al. 2011. Evaluación de la toxicidad aguda en dosis fijas del extracto de Werneria dactylophylla (pupusa). Revista boliviana de química.; Vol. 28 (2). http://www.bolivianchemistryjournal.org
- Bermúdez, D., Monteagudo, E., Bofill, M., et al. 2007. Evaluación de la toxicidad aguda de extractos de plantas medicinales por un método alternativo. Revista electrónica de veterinaria.; Vol. VIII (3): 1-7. http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=63613302006
- Betés de Toro, M. 2009. Farmacocinética. En: Farmacología para fisioterapeutas. Editorial Médica Panamericana: 8-10.
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009. México. Disponible en: www.velvet.unam.mx
- Bulgheroni, A., Kinsner, A., Hoffmann, S., Hartung, T., et al. 2008. Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) from the 28 days repeated dose toxicity studies in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology; 53, 16-19.
- Bulgheroni, A., Kinsner, A., Hoffmann, S., Hartung, T., Prieto, P. 2009. Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level (NOAEL) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 53 16–19.

- Castillo, A., Abdullaev, F. 2005. Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. Revista de investigación clínica. México. 57 (1) Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0034-83762005000100007&script=sci_arttext
- Cornejo, J., Chamorro, G., Garduño, L., Hernández, R., Jiménez, M. 2012. Toxicidad aguda y subaguda (28 días) en ratones, de la mezcla de ácido ursólico y ácido oleanóico obtenida de *Bouvardia ternifolia.* Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas México, D.F. 11(1): 91-102. Disponible en: http://www.revistas.usach.cl/ojs/index.php/blacpma/article/viewFile/512/487
- Cotillo, P. 2004. Vías de administración. En: Atención farmacéutica. Bases farmacológicas. Fondo editorial de la UNMSM. 47-52.
- Fernández, E., Galván, A. Métodos para la cuantificación de proteínas. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, campus universitario de Rabanales, Córdoba. 1-7.
- Fernández, T. 2001. Medicina natural y fitoterapia. En: Manual de patología médica y fitoterapia. Editorial Universidad Pontifica Comillas: 31-32.
- Fonnegra, R. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquía.
- Fuentes, X. 1997. Interrelaciones entre variables cuantitativas. En: Bioquímica clínica y patología molecular. Reverte: 43.
- García, V., Mendiola, E., Blanco, A., García, T. Afinidad de fracciones concentradas de lectinas de frijol Tépari (*Phaseolus acutifolius*) por eritrocitos humanos. Disponible en: http://www.uaq.mx/investigacion/difusion/veranos/memorias-2009/11VCRC_46/10_Garcia_SantoyoV.pdf
- Gennaro, A. 2003. Productos naturales. En: Remington: Farmacia. Editorial Médica Panamericana: 470-476.
- Gennaro, R. 2003. Farmacia industrial. En: Remington Farmacia. Editorial Médica Panamericana: 931.

- Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS). 2009. Third revised edition. United Nations. New York and Geneva, Disponible en: http://jonai.medwel.cst.nihon-u.ac.jp/uploadfiles/file/pdf/GHS%20rev3%20en.pdf
- Goldstein, J., Winter, C., Poretz, D. 1997. Plant lectins: Tools for the study of complex carbohydrates. En: Glycoproteins II. Montruil J, Vilegenthart JFG and Schachter H (Eds). Elsevier Science BV. Chp 12: 403-474.
- Gómez de Ferraris, M., Campos, A. 2009. Métodos y técnicas de estudio en histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. En: Histología, embriología e ingeniería tisular bucodental. Ed. Médica Panamericana: 17-18.
- Hernández, A., 2005. Fitoterapia. Bases científicas y legales para su aplicación. Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Sociedad Latinoamericana de fitoquímica. Santiago, Chile. Julio; 4 (004): 71-74. Disponible en: http://redalyc.uaemex.mx/pdf/856/85640404.pdf
- Hernández, P., Martín, O., Rodríguez, Y., Ganem, F. 1999. Aplicaciones de las lectinas. Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia. Ciudad de La Habana, Cuba. Mayo-agosto; 15 (2). Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-02891999000200002
- Hernández, P., Pérez, E., Martínez, L., Ortiz, B., Martínez, G. 2005. Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. Revista de educación bioquímica. Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México. Marzo 24 (001): 21-27. Disponible en: http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/490/49024104.pdf
- Hernández, R., Gally, M. 1981. Plantas medicinales: uso y dosificación de las 184 plantas más usadas en América Latina. México: editorial Pax.
- Iglesias, B., Rodríguez, T. Métodos de estudio en histología. Disponible en: http://www.sld.cu/galerias/pdf/sitios/histologia/metodos.pdf

- Lane, L., Aucke,r S. 1999. Administración de fármacos. En: Farmacología en enfermería. Elsevier España: 59-81.
- López, C. 2005. Flor de manita. En: La riqueza de los bosques mexicanos: más allá de la madera: experiencias de comunidades rurales. CIFOR: 81.
- Lozoya, X., Cañigueral, S. 2006. Sobre la Fitoterapia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Sociedad Latinoamericana de fitoquímica. Santiago, Chile. Julio; 5 (004): 67. Disponible en: http://redalyc.uaemex.mx/redalyc/pdf/856/85650401.pdf
- Marcano, D., Hasegawa, M. 2002. Compuestos aromáticos. En: fitoquímica orgánica. Editorial Torino: 137-138.
- Martínez, A. 2005. Flavonoides. Facultad de Química Farmacéutica. Universidad de Antioquía. Medellín: 1-76.
- Martínez E. Guía ilustrada de plantas medicinales existentes en México para preparar tinturas. 2011. Disponible en: www.microdosismartinez.blogspot.com
- Martínez, S., González, J., Culebras, M., Tuñón, J. 2002. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. Nutr. Hosp. XVII (6): 271-278.
- Méndez, L. 2006. Validación farmacológica de la actividad analgésica de las infusiones de la corteza de Spondias purpurea L. (jocote), hojas de Chiranthodendron pentadactylon (Manita) y Croton guatemalensis (Copalchi). [tesis] Guatemala: Universidad de San Carlos. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia; Disponible en: http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/06/06_2484.pdf
- Mendoza, N. 2008. Las plantas como agentes terapéuticos. En: Farmacología Médica. Editorial Médica Panamericana: 924-928.
- Moncado, J. Pruebas t-student. En: Estadísticas para ciencias del cuerpo humano. Ed. Universidad de Costa Rica: 14-15.
- Mongelli, R., Coussio, D., Ciccia, N. 1995. Estudio de toxicidad aguda de plantas medicinales argentinas mediante el bioensayo de Artemia salina leach. Dominguezia, Vol. 12 (1).

- Nanne, C., Aragón, F. 1991. Aislamiento, purificación y caracterización de una lectina de la semilla del poró *Erythina costaricensis* (Leguminosae). Rev Biol Trop; 39 (1): 15-21.
- Navarro, Y., Pérez, G. 1978. Detección y caracterización preliminar de lectinas presentes en semillas de leguminosas. Revista colombiana de química. Vol. 8
- Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional, medicamentos esenciales y política farmacéutica (EDM). OMS 2013. Disponible en: http://www.who.int/topics/traditional_medicine/definitions/es/index.html
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2008. Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Paris, France. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECDtg407-2008.pdf
- Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), 2001. Guideline for the Testing of Chemicals 420 on Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris, France. Disponible en: http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL420.pdf
- Pérez, L., Castillo, A., Salas, H., et al. 2011. Toxicidad aguda oral de Solanum torvum Sw. (prendejera). Revista Cubana de Plantas Medicinales. Vol. 16 (4): 390-395. http://scielo.sld.cu
- Pérez, M., Monteagudo, E., Bofill, M., et al. 2008. Evaluación de la toxicidad aguda por el procedimiento de dosis fijas de un extracto de Boldoa purpurascens Cav. Revista electrónica de veterinaria, REDVET. Vol. IX (3). Disponible en: http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n030308/030822.pdf
- Plantas Medicinales en México. 2011. México; [consultado noviembre 2012]. Disponible en: http://plantasdemexico.blogspot.mx/2011/03/flor-de-manita-chiranthodendron.html
- Primo, E. 1995. Flavonoides y antocianos. En: Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Editorial Reverte: 915-916.

- Repetto, M., Repetto, G. 2009. Interacciones entre fármacos. En: Toxicología fundamental. Ediciones Díaz de Santos: 367-373.
- Roca, P., Oliver, J., Rodríguez, M. 2004. Determinación de lípidos. En: Bioquímica: técnicas y métodos. Editorial Hélice: 239.
- Rojas, J., Díaz, D. 2009. Evaluación de la toxicidad del extracto metanólico de hojas de Passiflora edulis Sims (maracuyá), en ratas. An Fac med. Vol. 70 (3):175-80.
- Romo de Vivar, A. 2006. Química de la flora mexicana. Investigaciones en el Instituto de Química. UNAM.
- Ross, M., Wojciech, P. 2007. Técnica histológica y microscopia. En: Histología. Ed. Médica Panamericana: 2-5.
- Sáenz, D. 1993. Vías de administración. En: Principios de farmacología general y administración de fármacos. Editorial Universidad de Costa Rica: 39-46.
- Santamarina, P., García, F., Roselló, J. 2004. Extracción y separación de pigmentos fotosintéticos. Cromatografía en capa fina. En: Prácticas de biología y botánica. Editorial Universidad Politécnica; Valencia: 237.
- Sharon, N., Lis, H. 2001. Lectins. ENCYCLOPEDIA OF LIFE SCIENCES. Nature Publishing Group .www.els.net
- Sharon, N., Lis, H. 2004. History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. Oxford Journals. 14(11): 53-62.
- Varki, A., Cummings, D., Esko, D,, et al. 2009. Glycan-binding Proteins. In: Essentials of Glycobiology. 2nd edition. Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press; Chapter: 26-34. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1918/
- Vásquez, M., Gómez, C., Lugo, C. 2002. Las matemáticas y las ciencias. En: Historia de México: de la época prehispánica a la actualidad. Editorial Limusa: 59.
- Velázquez, C. 2006. Evaluación *in vivo* de la actividad inhibidora de la actividad intestinal inducida por la toxina de *Vibrio cholerae* de 26 plantas medicinales: estudio fitoquímico biodirigido del extracto metanólico de las

flores de *Chiranthodendron pentadactylon* (Sterculieceae). IPN, México, D.F.

- Voet, D., Voet, G., Pratt, W. 2007. El agua. En: Fundamentos de bioquímica: la vida a nivel molecular. Editorial Médica Panamericana: 30.
- Welsch, U. 2009. Citología/biología celular, histología y anatomía microscópica. En: Histología. Ed. Médica Panamericana: 4-5.
- Zavaleta, A. 2012. Medicinal Plants of the Borderlands: A bilingual resource guide. Autorhouse: 241.
- Zenteno, E., Debray, H., Montreuil, J., 1988. Purification and partial characterization of two lectins from the cactus *Machaerocereuseruca*. FEBS Lett.238: 95-100.