

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua

UNAN-León

Escuela de Medicina Veterinaria

Carrera de Veterinaria



Tesis para optar al título de licenciado en Medicina Veterinaria

Tema

Valoración de la respuesta glicémica en ratones Wistar tras la administración de extractos de Lantana cámara realizado en la Escuela de Medicina Veterinaria el periodo Febrero 2012 – Mayo 2013.

Autores:

Br. Milton José Baca Vargas

Br. Néstor Ramón Briceño Moran

Tutor:

Lic. Quela Ruiz

CoTutor:

Lic. Kelvin Núñez



Agradecimientos

Queremos dedicare este trabajo monográfico, a JEHOVA sinélno hubiese podido ser posible gracias a todas las bendiciones que derrama en nuestras vidas,

A nuestras familias, ya que sin su apoyo, esfuerzo, amor incondicional y constante motivación no hubiese logrado cumplir esta meta.

A los docentes, de nuestra facultad que dedican su tiempo, esfuerzo y sabiduría para forjar en nosotros personas y profesionales integrales.



Dedicatoria

☞ A Dios, por concederme la sabiduría, paciencia y soporte para cumplir esta meta.

☞ A mi esposa Gemadelos Angeles Calero Zapata, a mis hijos Milton José Baca

Calero y Sofía de los Angeles Baca Calero por ser pilares amorosos en mi vida

para la culminación de esta meta

☞ A mis padres, por su apoyo moral, espiritual y económico, ya que sin esos esfuerzos, regaños, consejos y dedicación no me hubiera sido alcanzar la cima en este camino.

☞ A los docentes, que supieron inculcar sus conocimientos durante todo mi estudio y también me brindaron su amistad.

☞ A Lic. Quela Ruiz y Lic. Kelvin Núñez, por su desempeño y dedicación al tener la paciencia de guiarme y corregirme durante la realización de este trabajo.

☞ A todos los que de una u otra manera colaboraron conmigo,

A todos mi más sincero agradecimiento.

Milton José Baca Vargas



Dedicatoria

☞ A Dios, por concederme la vida, en su infinito amor y paciencia para cumplir esta meta.

☞ A mi esposa Carolina María Sandoval Poveda, a mis hijos Brian Josny Briceño

Sandoval, Néstor Dismael Briceño Sandoval por el amor que me brindan día a día
para alentarme en mi vida para la culminación de esta meta

☞ A mis padres, Maritza Moran Vargas y Ramón del Carmen Briceño Mondragón por

su apoyo moral, espiritual y económico, ya que sin esos esfuerzos, regaños, consejos
y dedicación no me hubiera sido alcanzar la cima en este camino.

☞ A los docentes, que supieron inculcar sus conocimientos durante todo mi estudio y

también me brindaron su amistad.

☞ A Lic. Quela Ruiz y Lic. Kelvin Núñez, por su desempeño y dedicación al tenerla

paciencia de guiarme y corregirme durante la realización de este trabajo.

☞ A todos los que de una u otra manera colaboraron conmigo,

A todos mis más sincero agradecimiento.

Néstor Ramón Briceño Moran



Contenido

1.Introducción.....	8
2.Tema.....	10
3.Objetivos.....	12
4.Marcoteórico.....	14
Fisiopatología de la diabetes animal.....	17
Diabetes animal.....	19
Especie de estudio.....	23
Preparación de extractos.....	24
Ensayos de valoración toxicológica.....	26
Animales de experimentación.....	31
Diseción de ratas.....	34
5.Hipótesis.....	37
6.Diseño metodológico.....	40
Procedimiento de preparación de extractos.....	41
Test toxicológico.....	42
Cálculo de DL_{50}	43
Test glicémico.....	43
7.Resultados.....	49
8. Conclusiones.....	56
9. Recomendaciones.....	58
10.Bibliografía.....	60
11.Anexos.....	62



*Ladiabetesnoesmonopoliodeloshumanos.Aproximadamente1decada500perrosy
1decada200gatos tienediabetesy,talycomosucedekonlaspersonas,estascifrasse
hallanenaumento*



INTRODUCCION



Según la Federación Internacional de Diabetes (IDF), aproximadamente 194 millones de personas en el mundo tienen diabetes, lo que la convierte en un verdadero problema de salud pública ya que es la cuarta o quinta causa de muerte en los países más desarrollados y hay evidencias sustanciales de que es una epidemia en las naciones en desarrollo; además, según estimaciones hechas por el Instituto Internacional de Diabetes, basadas en estudios epidemiológicos, para el año 2010 habría 239 millones de diabéticos en el mundo.⁽¹⁾

El tema de la diabetes en humanos cobra importancia en nuestro país ya que, para el año 2000, la prevalencia de la enfermedad era de un 5% en la población y para el 2025 se estima que aumentará a un 7%. Además, a raíz de su alta incidencia y prevalencia, esta enfermedad conlleva un alto costo económico y social, debido a los medicamentos y los cuidados que se deben dar a las personas que en la padecen o quienes sufren de sus complicaciones.⁽¹⁾

Dado que se usan muchas plantas medicinales empíricamente como hipoglucemiantes, es necesario validarlas mediante la investigación de sus efectos.⁽¹⁾ Las especies medicinales con potencial fitoterapéutico suelen en la actualidad carecer de ensayos biológicos o clínicos que sustenten sus usos, estando faltos de veracidad de deben hacerse ensayos a fin de validar científicamente la información en contraste a los usos medicinales populares o etnomédica.

La planta *Lantana camara*, conocida comúnmente con el nombre de cincones grises, ha sido reportada empíricamente para el tratamiento empírico de la diabetes.

Por lo cual se justificó el presente trabajo de investigación en la cual se evaluó el efecto que sobre los niveles de glucosa puede tener la administración oral del extracto en ratones de la variedad *Wistar*. Así mismo el presente estudio tuvo como finalidad investigar *in vitro* al menos una especie popularmente indicada como hipoglucemiante en animales de experimentación ratones *wistar* aplicando conocimientos adquiridos en la rama de la medicina veterinaria que demuestren la utilidad en colectivos de trabajo de investigación multidisciplinarios como un campo más laboral de perfil laboral, y contribuir a alternativas medicinales naturales para el tratamiento de esta enfermedad en animales que los aquejan.



TEMA



Valoración de la respuesta glucémica en ratones *Wistar* tras la administración de extractos
de *Lantana camara*



OBJETIVOS



Generales

- Valorar la respuesta glucémica de ratones *Wistar* tras la administración de extractos de *Lantana camara*

Específicos

- Identificar la dosis letal 50 DL_{50} experimental mediante ensayo de toxicidad previo a la administración de extractos en animales de experimentación
- Determinar la dosis efectiva experimental de los extractos acuosos de *Lantana camara* en ratones *Wistar*
- Evaluar la histología de tejido animal para la valoración de la respuesta glucémica de *Lantana camara* en comparación con estándares de referencia.



MARCO TEORICO



1. DIABETES HUMANA

La diabetes mellitus (DM) es un conjunto de trastornos metabólicos, que afecta a diferentes órganos y tejidos, durante toda la vida y se caracteriza por un aumento de los niveles de glucosa en la sangre: hiperglucemia. La causa de varios trastornos, siendo el principal la baja producción de la hormona insulina, secretada por las células β de los islotes de Langerhans del páncreas endocrino, o por su inadecuado o por parte del cuerpo, que repercutirá en el metabolismo de los hidratos de carbono, lípidos y proteínas.⁽³⁾

Los síntomas principales de la diabetes mellitus son emisión excesiva de orina (poliuria), aumento anormal de la necesidad de comer (polifagia), incremento de la sed (polidipsia), y pérdida de peso sin razón aparente. La Organización Mundial de la Salud reconoce tres formas de diabetes mellitus: tipo 1, tipo 2 y diabetes gestacional (ocurre durante el embarazo),⁵ cada una con diferentes causas y con distinta incidencia.⁽³⁾

Para el año 2000, se estimó que alrededor de 171 millones de personas eran diabéticas en el mundo y que llegarán a 370 millones en 2030. Este padecimiento causa diversas complicaciones, dañando frecuentemente a ojos, riñones, nervios y vasos sanguíneos. Sus complicaciones agudas (hipoglucemia, cetoacidosis, coma hiperosmolar no cetótico) son consecuencia de un control inadecuado de la enfermedad mientras sus complicaciones crónicas (cardiovasculares, nefropatías, retinopatías, neuropatías y daños microvasculares) son consecuencia del progreso de la enfermedad.⁽³⁾

Tipos de diabetes

Hay dos tipos principales de diabetes. El tipo I, dependiente de la insulina, a veces se le llama diabetes juvenil, porque normalmente comienza durante la infancia (aunque también puede ocurrir en adultos). Como el cuerpo no produce insulina, las personas con diabetes del tipo I deben inyectarse insulina para poder vivir. Menos del 10% de los afectados por la diabetes padecen el tipo I.⁽³⁾

En el tipo II, que surge en adultos, el cuerpo sí produce insulina, pero, o bien, no produce suficiente, o no puede aprovechar la que produce. La insulina no puede entrar a la glucosa al interior de las células. El tipo II suele ocurrir principalmente en personas a partir de los cuarenta años de edad.⁽³⁾



✓ **Regulación hormonal**

Las hormonas que regulan la concentración de glucosa en sangre son:

- a. Insulina (células beta del páncreas), hipoglucemiante.
- b. Glucagón (células alfa del páncreas), hiperglucemiante.
- c. Adrenalina (médula suprarrenal), hiperglucemiante.
- d. Tiroxina (glándulas tiroides), efecto insignificante.
- e. Hormona del crecimiento, GH (pituitaria anterior o hipófisis anterior), hiperglucemiante.
- f. Hormona adrenocorticotropa, ACTH (pituitaria anterior), hiperglucemiante.
- g. Cortisol (corteza suprarrenal), hiperglucemiante.
- h. Somatostatina (células del páncreas, otros tejidos) leve.
- i. Somatomedinas (hígado), leve.

✓ **Alteraciones del metabolismo de la glucosa**

• **Hiperglucemias**

a. **Diabetes mellitus (clasificación según el comité de expertos de la ADA y la OMS):**

1. Diabetes mellitus tipo 1
2. Diabetes mellitus tipo 2
3. Diabetes gestacional

b. **Otros tipos específicos de diabetes:**

1. Defectos genéticos de la función de la célula beta
2. Defectos genéticos en la acción de la insulina
3. Enfermedades del páncreas exocrino
4. Endocrinopatías
5. Inducida por químicos o drogas
6. Infecciones
7. Formas no comunes de diabetes mediada por fenómenos inmunes
8. Otros síndromes genéticos asociados a veces con diabetes

✓ **Afecciones en la tolerancia a la glucosa**

✓ **Anormalidad previa de tolerancia a la glucosa**



✓ **Anormalidad potencial de la tolerancia a la glucosa**

- **Hipoglucemias**

- a. Reactiva
- b. Ficticia
- c. Posprandial
- d. Espontánea de ayuno

- **Errores innatos del metabolismo**

- **Afectaciones del Almacenamiento del Glucógeno**

- a. Tipo I (von Gierke)
- b. Tipo II (Pompe)
- c. Tipo III (Cori)
- d. Tipo IV (Andersen)
- e. Tipo V (McArdle)
- f. Tipo VI (Hers)
- g. Tipo VII (Tauri)
- h. Tipo VIII, IX y X

- **Galactosemia**

Incapacidad de metabolizar la galactosa por deficiencia o ausencia de las tres enzimas que participan en su metabolismo. La galactosemia clásica es diagnosticada en lactantes. Tras la ingestión de leche se presentan vómitos, diarrea, cirrosis, cataratas y retraso mental. El diagnóstico se efectúa por la identificación de galactosa en orina o suero y se confirma al encontrar una deficiencia enzimática.⁽³⁾

- **Afecciones del metabolismo de la fructosa**

La fructosa puede aparecer en orina después de la ingestión de frutas, miel y jarabes. Hay tres grupos específicos de afectaciones; todos ellos se transmiten como rasgo autosómico recesivo.⁽³⁾

Enfermedades de almacenamiento de los mucopolisacáridos

Los mucopolisacáridos son componentes estructurales de cartílagos, hueso, piel y otros tejidos conjuntivos. Los tres tipos que participan son: dermatán sulfato, heparán sulfato y queratán sulfato.



El Síndrome de Hurler es el prototipo; se trata de un almacenamiento progresivo que conlleva el enturbiamiento de la córnea y la muerte antes de los 10 años. Los individuos presentan anomalías esqueléticas, retraso en el desarrollo y hepatoesplenomegalia. Se diagnosticó mediante la determinación de mucopolisacáridos en la orina.⁽³⁾

1.1 FISIOPATOLOGÍA DE DIABETES ANIMAL

Desde que Mering y Minkowski (1890) confirmaron, en 1889, por la pancreatometomía, el origen pancreático de la diabetes, se atribuyó la incapacidad del organismo para utilizar la glucosa a la falta de una sustancia secretada por ese órgano.

Recién en 1922 el descubrimiento de la insulina permitió iniciar el estudio de la acción de esa hormona, la cual sigue siendo motivo de intensas investigaciones experimentales y bioquímicas.

El concepto de que los tejidos no pueden utilizar la glucosa sin la acción de la insulina no fue aceptado por todos los investigadores. Ya en 1917 von Noorden sostuvo que la diabetes podía ser ocasionada por una excesiva producción de glucosa por el hígado (teoría de la hiperproducción). Los trabajos de Manny Magath (1922) y Soskin (1927) demostraron que la hepatectomía impedía la hiperglucemia, aun en los animales sin páncreas.

La diabetes, en estos animales, mejora también después de la hipofisectomía, lo que fue demostrado por Houssay y Biassotti en 1930. Posteriormente, Long y Lukens (1936) comprobaron que la extirpación de las suprarrenales producía el mismo efecto, con lo cual se demostró que ambas glándulas tenían una acción hiperglucemiante o diabética, que podía influir en la producción de la diabetes.

En 1937, Soskin y Levin realizaron una investigación muy importante, utilizando perros eviscerados, con y sin páncreas, en los que mantenían la glucemia a distintos niveles, por infusión permanente de glucosa.



En los animales sin páncreas con glucemias superiores a 6g/dl. se conseguía la utilización de la glucosa en la misma proporción que en los animales no diabéticos con glucemias normales. A medida que se aumentaba la glucemia en el animal sin páncreas, se obtenía una mayor utilización de la glucosa (ver fig.1).

Esa experiencia, que tuvo una enorme repercusión, demostraba que los músculos podían fijar la glucosa sin necesidad de la insulina, siempre que el nivel glucémico estuviera aumentado.

El efecto de la insulina consistiría en descender el umbral por arriba del cual la glucosa era utilizada. Esas experiencias sirvieron de base para los trabajos posteriores de Levine que demostraron que la insulina favorece el transporte de la glucosa a las células.

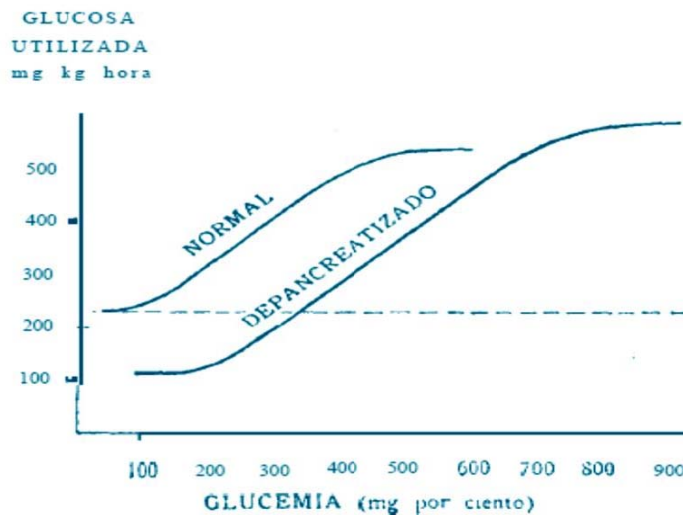


Fig.1 Relación entre el nivel glucémico y la utilización de la glucosa en el animal normal y el perro de pancreatizado (Soskiy Levine 1937)

Como ya hemos dicho, la insulina no tiene, al parecer, el mismo mecanismo de acción para todos los tejidos, siendo necesaria para la utilización de la glucosa en los músculos y en el tejido adiposo, y no siendo indispensable en el hígado y en el sistema nervioso. Para estudiar la fisiopatología de la diabetes humana, debemos tener en cuenta que los factores que intervienen en su producción no son aún conocidos. Hay muy pocos casos de pancreatectomía en el hombre y el requerimiento de insulina no es en ellos superior a 40 unidades diarias.



La anatomía patológica y las dosificaciones de insulina en la sangre y en el páncreas del diabético indican que las condiciones de producción de esta enfermedad son distintas a aquellas que la provocan experimentalmente.

En este caso es necesario extraer o destruir la totalidad de los islotes para provocar la diabetes, mientras que en la diabetes humana no hay nunca una destrucción total de los islotes y, en la generalidad de los casos, hay sólo una alteración parcial o una reducción variable en el número de células beta y en el tamaño de los islotes. Podemos decir que la diabetes es una entidad clínica cuyo sustrato anatómico no explica la importancia de los trastornos metabólicos que la caracterizan y que tiene un componente hormonal en el que predomina la insuficiencia primitiva o secundaria de la hormona hipoglucemiante.

1.2 DIABETES ANIMAL

Hay muchas similitudes entre la diabetes de los humanos y la diabetes en gatos y perros.

Los cambios de estilo de vida no sólo afectan a las personas, sino también a los animales de compañía. En estos últimos, la obesidad se está haciendo cada vez más común y aumenta el riesgo de desarrollar diabetes entre 3 y 5 veces más. Algunas razas parecen correr un mayor riesgo. En los perros, la diabetes es más común entre los keeshonds, malamutes, spitzes finlandeses, shnauzers enanos, caniches enanos y springers spaniels ingleses, mientras que entre los gatos, la raza burmesa parece desarrollar diabetes con más frecuencia, al igual que los gatos castrados de todas las razas. La diabetes podría ser transitoria, especialmente en los casos en los que los animales han recibido medicación que antagoniza el efecto de la insulina, como es el caso de los corticoides o las hormonas sexuales, o en los casos en los que se da otra enfermedad endocrina de modo concomitante. La diabetes aparece con más frecuencia en los gatos y perros de avanzada edad.

Hallazgos clínicos

Los síntomas clínicos de los animales de compañía con diabetes son similares a los de las personas y no son necesariamente específicos de la diabetes. El aumento del azúcar en sangre lleva a un aumento de la sed y la micción. Los perros y gatos diabéticos pueden estar obesos o delgados. Podría darse pérdida de peso y podría suceder rápidamente, dependiendo del estado de la enfermedad.



Esto sucede a pesar de que a veces se dé un enorme apetito. Muchos animales diabéticos tienen hígados grasos y aproximadamente un tercio de todos los gatos diabéticos muestran una decoloración amarilla de las membranas mucosas (ictericia).

El pelaje podría tener un aspecto descuidado. Un síntoma de diabetes en los gatos es una actitud poco común, el gato camina agachando los corvejones, tocando el suelo. Mientras que se suelen observar cataratas en muchos perros diabéticos en el momento del diagnóstico, raramente los gatos diabéticos desarrollan cataratas.

Cuadro Clínico

Entre otros síntomas clínicos se encuentran la posible pérdida de apetito, la deshidratación, la depresión y los vómitos.

Plan de Diagnóstico

Ya que ninguno de los síntomas clínicos es un claro indicador de diabetes, podría ser necesario efectuar otros análisis para poder efectuar un diagnóstico.

A menudo se realiza un análisis completo de sangre y orina, ya que la diabetes afecta a muchos órganos. Como mínimo, el veterinario realiza un análisis de sangre y orina en ayunas con el fin de medir la glucosa y las cetonas. Ya que a veces el estrés puede provocar un alto nivel de azúcar en sangre incluso en la orina, especialmente en gatos, el veterinario debe medir también las concentraciones de hemoglobina glucosilada o de fructosamina que no se ven influidas por el estrés a corto plazo. Tampoco se ven alteradas por la ingestión reciente de comida y el animal por lo tanto no necesita estar en ayunas para efectuar dichos análisis.

Tratamiento

Los tratamientos varían según los síntomas del animal. Los animales diabéticos siguen comiendo y no vomitan, suelen tratarse con inyecciones subcutáneas de insulina.

El animal enfermo de diabetes necesita un tratamiento intensivo en un hospital veterinario.

Varios preparados de insulina de acción intermedia o prolongada podrían utilizarse para tratar al animal diabético, entre los cuales se encuentran la insulina humana y las insulinas de origen animal. Las inyecciones deben administrarse dos veces al día en la mayoría de los casos para obtener un buen control.



Cada animal reacciona de un modo distinto a un preparado concreto de insulina y, por lo tanto, no existe un preparado concreto con el que se pueda conseguir un buen control en todos los animales diabéticos.

La medicación oral hipoglucemiantes glipizida se ha utilizado con distintos niveles de éxito en algunos gatos. En la actualidad, se cree que menos del 25% de todos los gatos diabéticos responden a esta medicación oral. Otros agentes orales se están evaluando para el tratamiento de gatos diabéticos.

El objetivo terapéutico práctico en animales diabéticos es más conservador que el objetivo en una persona con diabetes, en donde la norma es aproximarse a los niveles normales de azúcar en sangre. En el animal diabético, la preocupación es evitar los peligros de un nivel de azúcar demasiado bajo. Las complicaciones que producen las concentraciones de glucosa persistentemente altas juegan un papel menor en los animales, como resultado, en parte, de que su vida es más corta.

Si el nivel de azúcar en sangre del animal se mantiene ligeramente elevado, los síntomas clínicos como el aumento del apetito, la sed y la micción desaparecerán. Un régimen alimenticio adecuado es importante en los animales diabéticos.

La dieta debería ser equilibrada, completa y atractiva para el animal. No hay nada más frustrante y peligroso que tratar a un animal diabético que no quiere comer. Es importante que el animal reciba la misma dieta y la misma cantidad todos los días, de otro modo será difícil conseguir un buen control. No se le debería permitir comer nada fuera de su dieta.

Monitorización

Los animales diabéticos necesitan ser monitorizados con regularidad. En casa, losamos deberían observar el comportamiento del animal y observar cuánto come, cuánto bebe y cuánto orina. Losamos también pueden monitorizar las concentraciones de azúcar y de cetonas de la orina. Esto suele resultar fácil de hacer en perros, pero bastante difícil en gatos. Recientemente, se ha introducido un nuevo método para medir la glucosa de la orina en gatos.



Se mezclan unos trozos de material que mide la glucosa en la orina en la arena limpia del gato. La glucosa de la orina del gato causa cambios visibles de color. El peso del animal también es un indicador que debe observarse.

Un animal con diabetes bien controlado debería mantener el peso. Si el animal gana peso con la misma cantidad de alimento y ejercicio, es posible que leadosis de insulina sea demasiado alta; por el contrario, si el animal pierde peso, puede que sea demasiado baja. El veterinario debería monitorizar las concentraciones de hemoglobina glucosilada o fructosamina con regularidad. Un nivel bajo de azúcar en sangre podría ser el resultado de un exceso de insulina o de una ingestión inadecuada de comida. Ya que el cerebro es particularmente sensible a las deficiencias de glucosa, se pueden observar disfunciones del sistema nervioso. Podría darse confusión, nerviosismo, temblores o hiperexcitabilidad y podrían producirse convulsiones si no se tratan.

Algunos animales pueden que se queden muy tranquilos cuando tienen niveles de glucosa en sangre incluso gravemente bajos; algunos podrían volverse agresivos. En una situación de emergencia, los propietarios podrían administrar soluciones de glucosa por vía oral.

En clínica suele observarse pancreatitis en perros con diabetes mellitus y se ha sugerido como una causa de diabetes luego de la destrucción de los islotes. Sin embargo, la incidencia de pancreatitis identificable en estudios histológicos de perros diabéticos es sólo del 30 al 40%. Aunque la destrucción de las células beta consecutiva a pancreatitis es una explicación obvia para la aparición de diabetes mellitus en perros sin lesiones pancreáticas obvias participan otros factores quizá más complejos como se muestra en la tabla 1

Tabla 1 Factores potenciales comprendidos en la etiopatogenia de la diabetes mellitus en perros y gatos:

Perros	Gatos
Genética	Amiloides de los islotes
Insulinitis mediada por mecanismos inmunitarios	Obesidad
Pancreatitis	Infección
Obesidad	Enfermedad concurrente
Infección	Fármacos (p.ej., acetato de megestrol)
Enfermedad concurrente	Pancreatitis
Fármacos (p.ej., glucocorticoides)	Genética
Amiloides de los islotes	Insulinitis mediada por mecanismos inmunitarios.



2. ESPECIE DE ESTUDIO

Lantana camara⁽⁵⁾

Taxonomía

Reino: Plantae;

Subreino: Traqueobionta (plantas vasculares);

Superdivisión: Spermatophyta (plantas con semillas);

División: Magnoliophyta (plantas con flor);

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas);

Subclase: Asteridae;

Orden: Lamiales



Fig.2

Descripción botánica Basada en Rzedowski Rzedowski, 2001.⁽⁵⁾

Arbusto de 1 a 3 m de alto, de tallo con cuatro ángulos, usualmente con espinas, con o sin pelos, con o sin glándulas en la punta de los pelos. Las hojas generalmente opuestas, pecíolos de 3 a 12 mm de longitud, con o sin pelos, láminas ovadas a oblongo-ovadas, de 2 a 12 cm de longitud y de 0.5 a 6 cm de ancho, ápice agudo o redondeado, base cuneada, cordada u obtusa, margen crenado (condientes redondeados) - aserrado, con pelos en ambas superficies, envés en ocasiones sin pelos. Las inflorescencias: en forma de cabezuela de 0.5 a 3 cm de diámetro, pedúnculos de 2 a 14 cm de longitud, brácteas lineares u oblongo-lanceoladas, de 3 a 7 mm de longitud, con pelos rectos de base redondeada, las flores con cáliz de aproximadamente 2 mm de longitud; corola color naranja o rojo, tubo de 7 a 10 mm de longitud con pelos suaves y largos.

Frutos y semillas: El fruto es agrupado, esférico, negro, de aproximadamente 3 mm de diámetro, jugoso y carnoso.

Raíz: Pivotante.

Composición química⁽⁵⁾ (López Palacios 1977):

Las hojas contienen 0.3-0.7% de lantánina, ácidos terpenicos, 0.05-0.2% de aceite esencial que contiene citral y otros sesquiterpenos, hasta 80% de β -cariofileno, 10-12% de felandreno. Geraniol, linalol, eugenol, cinol y furfural, taninos resinas, azúcares reductores.



3. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS⁽⁶⁾

Métodos de extracción

La extracción sólido-líquido es una operación que está presente prácticamente en todos los procesos tecnológicos relacionados con la industria química y médico-farmacéutica; dentro de ésta, los métodos de extracción por maceración y la percolación y lixiviación son los más utilizados.⁽⁶⁾

✓ Maceración

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con una cantidad suficiente de solvente, en un tanque cerrado a temperatura ambiente durante 2-14 días para agotamiento del dróg vegetal. Puede utilizarse agitación. Posteriormente, el tiempo para la mezcla es filtrada, el material insoluble es lavado con el mismo solvente y los filtrados se mezclan para concentrar el extracto.⁽⁶⁾

✓ Percolación y lixiviación

El material crudo previamente triturado se pone en contacto con una cantidad suficiente de solvente de forma tal que el solvente cubra la capa de sólido en el tanque percolador. El solvente es renovado de modo continuo manteniéndose un gradiente de concentración, el disolvente puro desplaza al que contiene la sustancia extraída sin ser necesario aplicar presión. La dróg residual es prensada y el fluido obtenido es combinado con el percolado para concentrar el extracto.⁽⁶⁾

Clasificación de los extractos vegetales

Dependiendo del grado de concentración de los extractivos, los extractos pueden clasificarse en:

- Extractos fluidos o líquidos
- Extractos semisólidos o blandos
- Extractos secos⁽⁶⁾

Obtención de extractos⁽⁶⁾

Es importante establecer los parámetros de extracción para lograr la estandarización del proceso, esto garantizará la calidad, rendimiento, seguridad y eficacia del producto medicinal por su empleo:

- ✓ Naturaleza química de la materia prima vegetal: conocer las características del metabolito o compuesto químico a extraer.



- ✓ Selección del solvente: definir la selectividad del solvente a emplear, el solvente óptimo será el que logre extraer un mayor rendimiento del compuesto de interés.
- ✓ Relación sólido-líquido: la proporción más conveniente de trabajo será aquella con la que se alcancen los mayores rendimientos de extracción.
- ✓ Tamaño de partícula del sólido: de la forma y dimensión de los sólidos depende en gran medida el éxito de la lixiviación, a menor tamaño de partícula, mayor superficie de contacto entre el dragado y el disolvente, y por tanto, mayor acceso de los principios activos al medio líquido; no obstante, tamaños de partícula muy pequeños conducen a la formación de polvos demasiado finos, que pueden causar problemas en el proceso de extracción.
- ✓ Temperatura: el aumento de la temperatura favorece la extracción, hay que prestar especial atención cuando la sustancia de interés es termolábil o el menstro es volátil, además, temperaturas elevadas pueden conducir a lixiviar cantidades excesivas de solutos indeseables.
- ✓ Velocidad de agitación y tiempo de extracción: los óptimos valores de estos parámetros serán aquellos que logren extraer un mayor rendimiento del producto. A mayor tiempo de contacto, mayor capacidad tendrá el disolvente para alcanzar el equilibrio de concentraciones.
- ✓ Viscosidad del medio: no debe seleccionarse solventes de viscosidad relativamente alta.

El extracto vegetal obtenido se debe caracterizar en cuanto a: sustancias activas y marcadores, densidad, solventes residuales, sólidos totales, pH, control microbiológico y volumen total.

Concentración de extractos⁽⁷⁾

Todavía se ha realizado la etapa de extracción y separación, se procede a eliminar parte del solvente de extracción para aumentar el contenido de sólidos en el extracto.

Este proceso se realiza a presión reducida con lo que se disminuye la temperatura de calentamiento necesaria para la salida del solvente, el rotavapor es una buena alternativa para trabajar en el laboratorio y es ampliamente usado mientras que sistemas análogos se utilizan a escala industrial (evaporadores, condensadores).



También pueden utilizarse métodos de precipitación del principio activo, combinados con etapas de filtración, extracción líquido-líquido, entre otras.

Secado.⁽⁷⁾

Para preservar los componentes naturales presentes en los extractos de plantas, se emplean métodos de secado para su obtención en forma de polvos. Estos pueden ser secados por atomización y lecho fluidizado fundamentalmente. En estos procesos es muy importante evaluar las variables:

- ✓ Concentración de sólidos,
- ✓ Temperatura de secado,
- ✓ Humedad,
- ✓ Presión,

Flujo y velocidad de trabajo, así como la utilización de aditivos inertes como coadyuvantes del secado para favorecer el rendimiento.

4. ENSAYOS NECESARIOS PARA LA VALORACIÓN TOXICOLÓGICA DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS.⁽⁸⁾

La necesidad de controlar el uso de sustancias químicas, requiere que cada sustancia química de síntesis a la cual el hombre está potencialmente expuesto, sea homologada. La legislación de varios países ha establecido regulaciones que toman en cuenta, entre otros elementos, el potencial tóxico de estas sustancias.



Fig.3

Esta situación ha determinado el desarrollo de una rama de la toxicología moderna conocida como toxicología de reglamentación, que cuida de los aspectos científicos y técnicos de las pruebas toxicológicas necesarias para llevar a cabo una valoración toxicológica. La valoración toxicológica es de gran importancia para el proceso de homologación y control de las sustancias químicas.



El número y tipo de pruebas toxicológicas para fines de homologación varía de país a país. Sin embargo, organizaciones internacionales como, por ejemplo, la OMS, FAO y la OECD han desarrollado protocolos toxicológicos con el auxilio del proceso de armonización internacional en este campo.

La naturaleza y la extensión de las investigaciones toxicológicas necesarias para obtener una satisfactoria garantía de seguridad de una sustancia química pueden variar de una sustancia a otra. La determinación de cuáles sean los ensayos toxicológicos más apropiados en cada circunstancia es un área que requiere la asistencia de un juicio toxicológico muy experimentado. Varias organizaciones nacionales e internacionales han desarrollado directrices en este sentido: las más conocidas entre ellas son la "Food and Drug Administration", la "Environmental Protection Agency (EPA)", el "Department of Health and Social Security" (DHSS) (nacionales), la "Commission of the European Communities" (CEC) (interregional), la "World Health Organization (International Programme on Chemical Safety-IPCS)" y la "Organisation for Economic Cooperation and Development" (OECD) (internacionales).

Existen también directrices de grupos independientes como el "Food Safety Council" y la "National Academy of Sciences".

A pesar de que cada una de estas directrices tenga sus peculiaridades, todas ellas tienen en común los elementos fundamentales que se resumen a seguir.

Informaciones preliminares.⁽⁸⁾

La sustancia que se somete a la investigación toxicológica deberá ser suficientemente caracterizada antes de iniciar cualquier investigación toxicológica. El material destinado al ensayo toxicológico deberá evidentemente ser representativo del material utilizado en uso práctico. Su pureza e identidad química deberá ser claramente definida.



Fig.4

Un estudio atento de la estructura química de una nueva sustancia puede revelar características comunes a otras sustancias cuyas actividades biológicas ya se conocen.



La naturaleza y las cantidades de las impurezas presentes en el material que se quiere investigar deberán ser bien conocidas ya que estas pueden influenciar de modo significativo el potencial tóxico de la sustancia en cuestión. Las propiedades químicas y las características físicas de la sustancia, tales como el olor, la volatilidad, etc., determinarán la posibilidad de formular regímenes de alimentación de adecuada estabilidad y aceptación por parte del animal; así, en su lugar será necesario suministrar la sustancia por otra vía que no sea la normal, como por ejemplo, por intubación gástrica.

Para el diseño experimental del ensayo será también importante tener una información, aunque aproximativa, del nivel de la exposición potencial a la sustancia. Esta información, aunque aproximativa, del nivel de la exposición potencial a la sustancia.

Ensayos de toxicidad aguda⁽⁸⁾

En el caso de una sustancia desconocida, las investigaciones se comienzan generalmente con ensayos de toxicidad aguda. Estos ensayos tienen por objeto obtener datos sobre los efectos producidos en el animal después de una única exposición del material de ensayo.



Fig. 5

En el caso de aditivos alimentarios, el procedimiento básico consiste en una administración por vía oral de una serie de dosis que van de cero hasta una dosis que produzca 100% de mortalidad. De la relación entre dosis y mortalidad se puede calcular estadísticamente la así llamada dosis letal 50% o DL-50. Tal dosis calculada, proporciona, entre otros, un medio aproximativo para comparar la toxicidad aguda de diferentes sustancias.

Es necesario notar que la simple determinación de una DL-50 es de valor muy limitado; la observación detallada de los síntomas que conducen a la muerte es mucho más importante que la fórmula tradicional de medir la toxicidad aguda en términos estadísticos como es el caso en la determinación de una dosis letal 50.



Fig. 6

Un ensayo de toxicidad aguda puede proporcionar mucho más información si las observaciones vienen extendidas a otros efectos que no sea el efecto "cuántico" vida-muerte; a saber, efectos tales como el inicio, naturaleza y duración de la sintomatología toxica asociada con la mortalidad.



Estas observaciones acopladas a las observaciones macro y microscópicas de los tejidos animales muertos y/ o sobrevivientes pueden proporcionar elementos indicadores de “target organs” de toxicidad potencial.

La utilización de diferentes especies animales de ambos sexos puede revelar diferencias significativas entre especies y entre sexos con relación a la sustancia en cuestión. Las informaciones recogidas serán de gran auxilio en el planeamiento de estudios toxicológicos de larga duración con el objetivo de obtener datos sobre los efectos producidos por exposición continua.

En el caso de aditivos alimentarios, es muy raro que una sustancia se revele tóxica en la fase aguda para que deba ser rechazada en esta fase de valoración. Normalmente, el procedimiento de valoración deberá extenderse a investigación sobre el metabolismo y estudios a largo plazo.

✓ Estudios de cortaduración

Por estudios de mediana duración o corto plazo entienden los estudios de toxicidad que van de los 21 días hasta los 90 días en los roedores y hasta un año en los animales más grandes como por ejemplo, el perro.



Fig.7

El objetivo de estos estudios es el de identificar y caracterizar los efectos que pueden producirse a raíz de una exposición repetida a la sustancia en objeto, incluyendo la posibilidad de acción acumulativa, con la finalidad de determinar los niveles aproximativos de las dosis asociadas con los efectos, con el fin de planear estudios de larga duración.

El ensayo a corto plazo, de 3 o 4 semanas, utilizando dosis relativamente altas son a veces llevados a cabo para identificar los órganos “blanco”; de todas maneras, los protocolos que consideran la duración de 90 días son los más frecuentes. En estos estudios grupos de animales, generalmente roedores, se exponen a la sustancia mezclada al alimento o al agua por un periodo de 90 días consecutivos. Una serie de dosis es utilizada; las dosis que van idealmente desde la dosis que no producen ningún efecto observable hasta la dosis que producen efectos observables. Durante el ensayo, los animales se observan en su aspecto general, comportamiento, cantidad de alimento consumido, crecimiento y mortalidad.



Se deberán hacer exámenes clínicos periódicos de sangre y orina, además, también de funcionalidad de los órganos más importantes, incluido el sistema inmunológico y endocrino.

Ala terminación del ensayo (que puede incluir un periodo de observación) cada animal viene sometido a estudio post-mortem. Los pesos absolutos y relativos de los órganos y glándulas más importantes vienen apuntados, muestras de órganos y tejidos son conservadas para el análisis microscópico.

Si el ensayo de cortadura está bien hecho, es muy probable que se revele la mayor parte de los efectos tóxicos. La utilización de varias dosis permitirá establecer la dosis sin efecto. Los ensayos a largo plazo siguen fundamentalmente los mismos criterios, con la diferencia, naturalmente, de la duración.

✓ Ensayos de larga duración

En estos estudios se trata del suministro de la sustancia a animales de laboratorio durante toda la vida de la especie utilizada, con el fin de detectar efectos tóxicos que se desarrollan solo en exposiciones prolongadas. Con respecto a muy pocas excepciones, esto se refiere casi exclusivamente a los efectos cancerígenos, ya que la mayoría de los otros efectos se hacen generalmente evidentes en ensayos de cortadura.



Fig. 8

El ensayo de larga duración está sujeto a la influencia de muchas variables debido a su extensión y complejidad; por consecuencia, la elaboración del diseño experimental tiene una importancia particular en la planificación de un ensayo de larga duración.

Existen muchos análisis críticos de los procedimientos que pueden ser adoptados con respecto a los ensayos de larga duración, pero todavía no existe un consenso general acerca de muchos de los múltiples aspectos que complican sus diseños experimentales.

Uno de estos aspectos se refiere a la selección de la especie animal y de su cepa. Diferentes especies y sus cepas se defieren considerablemente en la sensibilidad a los agentes cancerígenos químicos y en la susceptibilidad a la producción de tumores espontáneos, a saber, no relacionados con el tratamiento experimental.



Fig. 9



Los animales, por consecuencia, deberían ser seleccionados a la luz de la máxima información posible con respecto a sus antecedentes biológicos y experiencia previa; en el momento presente no existe consenso acerca de cómo hacer esta selección.

✓Tendencias modernas

Las tendencias modernas con respecto a la selección de los ensayos toxicológicos son variadas y de mucho interés. Ahora los ensayos de larga duración son los únicos aceptados para establecer el potencial carcinógeno de una sustancia. Sin embargo son estudios lentos, de gran costo y por el contrario es posible establecer la misma inocuidad mediante ensayo de corto plazo mediante consideraciones de actividad biológica y estructura química y niveles de exposición, son consideraciones cruciales en estos momentos históricos de la toxicología experimental y ambiental.

5. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN⁽⁹⁾

5.1 Animales de experimentos

Los experimentos con animales se utilizan ampliamente para desarrollar nuevas medicinas y para probar la seguridad de otros productos.⁽⁶⁾

Muchos de estos experimentos causan dolor a los animales involucrados o reducen la calidad de vida de otras maneras.⁽⁶⁾

En todo el mundo se usa para vivisección una amplia gama de especies. Las ratas y ratones se llevan la mayor proporción de los experimentos de laboratorio, sobre todo porque son fáciles de manejar y baratos de mantener por su pequeño tamaño. Ocupan menos sitio en un laboratorio que otros animales más grandes, y además tienen de 50 a 100 crías al año.⁽⁶⁾

Los conejos albinos se utilizan sobre todo para pruebas de ojos y de piel por su fácil manejo y su capacidad limitada de expulsar sustancias de los ojos durante los experimentos. Las cobayas también se utilizan para pruebas de piel y de grupo por ejemplo de vacunas.⁽⁶⁾

Los perros y los primates se utilizan mucho en experimentos de toxicidad, investigaciones del cerebro, odontología y prácticas de cirugía.



Larazamáshabitualenperros elBeagle, elegidosobre todoporque tienen muy buen carácter yesdeuntamañomanejableparalaspruebas. Los primates como babuinos, macacos, tití y chimpancé se siguen utilizando amiles. Otros son los gatos, aves, peces, cerdos, caballos, ovejas y hámster, aunque hay otros muchos.⁽⁶⁾

5.2 Ratones wistar⁽¹⁰⁾

Orden: Rodentia Subord

en: Myomorpha

Familia: Muridae

Género: Rattus Espe

cie: norvegicus

Características:

Ratones exocriados. Modelo general en investigación biomédica, muy utilizadas en toxicología.



Fig.10

5.3 Ratones wistar^(10,12)

Orden: Rodentia Suborden

: Myomorpha

Familia: Muridae

Género: Mus

Especie: musculus

Características: Ratones exocriados: vigorosos, buena capacidad reproductiva y rápido crecimiento. Se usan ampliamente en estudios de toxicología, farmacología y pruebas de seguridad.



Fig.11

5.3 Ratones silvestres

Proechimys chrysaeolus

Orden: Rodentia Familia:

Echimyidae

Subfamilia: Eumysopidae

Género: Proechimys Espec

ie: chrysaeolus



Fig.12



Características: Ratonessilvestres (llevados al laboratorio, manteniendo colonias de forma exocriado). Se utilizan en estudios de epidemiología de zoonosis tropicales. Son reservorios u hospederos intermediarios de enfermedades (encefalitis equina venezolana, Leishmaniosis, equinococcosis tropical y Chagas). Además son utilizadas para estudios neurológicos por su resistencia a epilepsias.

5.4 *Rattus*⁽¹¹⁾

Rattus es un género de roedores miomorfos de la familia Muridae, conocidos comúnmente como ratas. Son roedores de mediano tamaño que no sobrepasan los 300 g de peso y los 30 cm, más una cola de similar longitud. Las patas anteriores son cortas y con cuatro dedos (el pulgar, rudimentario) y las posteriores, más largas, con cinco dedos.



Fig.13

5.5 Ratones albinos^(10,12,13)

El ratón de laboratorio es un roedor, usualmente de la especie *Mus musculus*, que se utiliza para la investigación científica. Su cariotipo está compuesto por 40 cromosomas¹ y su pelaje es albino.



Fig.14

Para cada experimento se escogen ratones de laboratorio que pertenezcan a una misma cepa pura o endogámica. Los individuos de una misma cepa llevan los mismos genes, por lo cual se facilita la comparación de los efectos de los diferentes tratamientos experimentales (fármacos, entorno físico, etc.), sin que se produzca confusión debido a las diferencias genéticas. La cepa más utilizada es la BALB/c (ratón albino), aunque existen otras disponibles, especialmente desde el desarrollo de técnicas de manipulación de genes que han provisto una gran cantidad de cepas con modificaciones genéticas particulares.

Algunas investigaciones particulares pueden requerir de una especie de ratón diferente a *Mus musculus*. Por ejemplo, en 2004, investigadores de la Universidad de Emory utilizaron ratones de las praderas (*Microtus ochrogaster*) y



ratones de los pantanos (*Microtus pennsylvanicus*) para estudiar un
gen relacionado con el comportamiento monógamo.



Las características que han hecho del ratón del laboratorio el modelo biológico y biomédico más utilizado en las investigaciones científicas son:

- Su fácil manejo.
- Su tamaño apropiado para la cría y manipulación.
- No requieren demasiados cuidados.
- Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos.
- Tienen un alto número de crías.
- Poseen un breve período de gestación (19-21 días), y su desarrollo es rápido.
- Las hembras producen un gran número de óvulos, los cuales al ser fecundados son muy resistentes.
- Al ser mamíferos euterios, poseen un genoma muy similar al de los seres humanos.⁽⁸⁾

5.6 Ratón knock-out⁽¹⁴⁾

Un ratón knock-out o ratón KO es un ratón modificado por ingeniería genética para que uno o más de sus genes estén inactivados mediante una técnica llamada *knock-out*. Su propósito es comprender el papel de un gen que ha sido secuenciado pero del que se desconoce su función o se conoce de forma incompleta.



Fig.15

Inactivando el gen y estudiando las diferencias que presenta el ratón afectado, los investigadores pueden inferir la probable función de ese gen. El ratón es el organismo modelo más próximo a los seres humanos en el que esta técnica se puede realizar con facilidad, de modo que es el sujeto favorito de los experimentos de *knock-out*, especialmente cuando se plantean cuestiones genéticas relacionadas con la fisiología humana.⁽⁹⁾

6. DISECCIÓN DE RATA

Disección anatómica de la rata, observación macroscópica de órganos linfoides secundarios.

- a) Fundamentación de la técnica.
- b) Equipamiento.
- c) Reactivos.
- d) Procedimiento.



Fundamentación de la técnica:

La disección de la rata o cualquier otro animal del laboratorio, tiene como objetivo, en esta práctica, la visualización macroscópica de los órganos linfoides secundarios: el bazo, ganglios linfáticos y sistema linfático así como el tejido linfoide asociado a las mucosas MALT.

Equipamiento:

- Animal del laboratorio
- Mesa o tablado de disección
- Gasas
- Guantes
- Suero fisiológico
- Jeringas
- Set de disección formado por:
 - o Pinzas simples y pinzas de dientes
 - o Mangochufo de bisturí o
 - Tijeras

Procedimiento:

Inicialmente se procede a sacrificar al animal, una vez realizado se coloca en posición decúbito ventral sobre el tablado de disección y realizamos una incisión toracoabdominal central, con el bisturí, y posterior apertura.

Tras la apertura de la pared toracoabdominal y la retirada de la grasa preperitoneal podemos observar: pulmones, hígado, intestino, bazo y ganglios linfáticos.

Para distinguir bien los órganos mencionados, podemos administrar por vía intravenosa de la rata una solución con partículas finas de carbón activado, las cuales a los pocos minutos de la administración (5-10 minutos), tienden a acumularse en los órganos con células fagocíticas mononucleares abundantes, permitiéndonos así la mejor visualización de los órganos.

La rata tiene 5 apéndices: 4 patas y una larga cola que le sirve para mantener el equilibrio. Como todos los mamíferos presentan mamas, en la rata son 6 pares ubicadas en el lado ventral a ambos lados de una línea media.

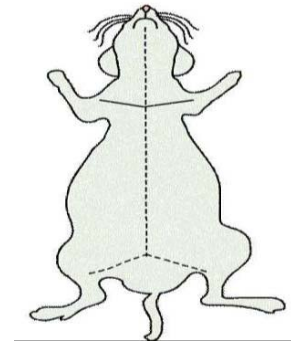


Fig.16



Lo primero que haremos es colocar la rata con el vientre hacia arriba, decúbito ventral, sobre una plancha de corcho recubierta con papel y sujetarle las 4 patas a la plancha con alfileres. Antes de proseguir debemos conocer la utilización correcta del material de cirugía. Las tijeras se toman con el pulgar y el anular colocando la yema del dedo índice sobre la cruz de la tijera. El dedo mayor ayuda a la estabilidad de la tijera ubicándose sobre el anular. Hay diferentes tipos de tijeras: con puntas redondas, con puntas agudas o con una punta redonda y una aguda. También pueden ser chatas o curvas. Cualquiera de ellas puede utilizarse siempre y cuando la punta aguda esté alejada del sujeto de disección al momento de realizar el corte. Para utilizar el bisturí lo sujetamos con el filodela hoja hacia arriba y apoyándolos sobre una sonda acanalada.



HIPOTESIS



La acción hipoglucemiante de los extractos acuosos de *Lantana camara* muestran resultados satisfactorios para un intervalo de confianza del 95% en el test aplicado a los animales de experimentación en comparación a estándares de referencia



DISEÑO METODOLOGICO



TipodeEstudio:

Experimental

Universo

26 Especies vegetales reportadas etnomedicamente con actividad sobre la glicemia
Lantanacamara, *foenum-graecum*, *Cyamopsistetragonolobus*, *Momordicacharantia*,
Trigonellafoenum-graecum, *Anemarrhenaasphodeloides*, *Gymnemasylvestre*, *Aconitumcarmichaeli*, *Alliumcepa*,
Alliumsativum, *Amorphophalluskonjac*, *Anemarrhenaasphodeloides*, *Atractylodesjapónica*, *B
ighliasápida*, *Catharanthusroseus*, *Coccinia
indica*, *Cyamopsistetragonolobus*, *Dioscoreajapónica*, *Eleutherococcussenticosus*,
Emericellaquadrilineata, *Ephedradistachya*, *Ficus bengalensis*, *Galegaofficinalis*,
Ganodemalucidum, *Gymnemasylvestris*, *Cainitopomiferum* Tussac, *Chrysophyllum bicolor*

Muestra:

Extractos acuosos de *Lantanacamara*

ÁreadeEstudio:

Laboratorios de histología animal y Bioteriología de Facultad de Agroveterinaria

Unidaddeanálisis

Animales de experimentación ratones wistar

Variables aestudiar:

- DL₅₀ de extractos acuosos de *Lantanacamara*
- glicemia en sangre de ratones wistar
- tejido histológico de páncreas de ratones Wistar

Tabla 2 Operacionalización de Las Variables

Variable	Conceptualización	Indicadores	Unidad de medida
DL ₅₀	indica la toxicología de los miligramos de una sustancia necesarios por kilogramo de peso de un animal para matar al 50% de la población	muerte del animal de experimentación	ppm
Glicemia	Es la medida de concentración de glucosa libre en sangre.	Hipoglicemia Hiperglicemia	µg/dl
Tejido histológico	Material constituido por un conjunto organizado de células, con un comportamiento fisiológico coordinado y origen embrionario común	Células normales Células anormales	µm



Procedimiento:

1. Preparación de Extractos

Procedimiento

1. Las tinturas confines de investigación deberán ensayarse en relación 1:5, 1:10, para lo cual considerare el peso del drogase ensayar anal 35,50y 70% respectivamente, posteriormente se determinaran los sólidos totales afin de definir la mejor relación droga solvente considerando el poder extractivo del grado alcohólico.
2. La cantidad pesada de la materia vegetal se depositara en un recipiente grande (barril plástico), donde posteriormente se le agregará el volumen de aguay alcohol previamente mezclados.
3. Una vez obtenida la mezcla, hidroalcohólica se transferirá al barril que contiene la droga vegetal utilizando un piche plástico.
4. Posteriormente se removerá con una pala de madera para lograr que la mezcla y el agua se incorpore con la droga vegetal.
5. Tapar y rotular especificando el nombre de la planta, macerada, fecha de maceración, fecha de salida.
6. Dejar reposar por un periodo de 10 días; removiendo cada día con la pala de madera, deberán anotarse en la bitácora de tinturas observaciones organolépticas a fin de garantizar la calidad de la tintura en mención.
7. Una vez transcurrido el periodo de los diez días se procede al prensado de la droga vegetal.

2. Evaporación del solvente por rotavapor

Consiste en eliminar un disolvente orgánico de una mezcla de solventes, El motor eléctrico produce el giro de un tubo que tiene ajuste esmerilado al cual se acopla la matraz de fondo redondo que contiene la disolución.

1. El matraz debe estar parcialmente sumergido en un baño de aguay girando
2. la temperatura del baño debe oscilar entre 35 y 40 °C acoplado al sistema de refrigerante.
3. Las revoluciones por minuto deben oscilar a 100 rpm aproximadamente
4. Vigilar la temperatura de tener la evaporación hasta la eliminación del solvente alcohólico



3. Determinación de sólidos totales.

Para la determinación de sólidos totales se procederá inicialmente con una tarade prensa de filtro posteriormente se adiciona un ml de extracto de *Lantana cámara* 1:5 y 1:10 a las concentraciones hidroalcohólicas del 35, 50 y 70% respectivamente, posteriormente se determinó la mejor relación droga a concentración basándose en el porcentaje más alto obtenido según supeso.

4. Test toxicológico⁽¹⁴⁾

4.1 Técnica

Toxicidad aguda clásica (determinación de DL_{50})

El estudio toxicológico en ratones tiene como objetivo corroborar la toxicidad de la decocción de una especie vegetal evaluada previamente en un ensayo primario de *Artemisa salina*. Se empleará el método de las clases de toxicidad aguda (TAC), administrada a dosis única a una especie. Este procedimiento permitirá la identificación de la TAC como medida de toxicidad aguda por vía oral. La sustancia será evaluada usando un procedimiento por paso; cada uno emplea 5 animales del mismo sexo. El resultado de cada etapa de determinación es necesario continuar los ensayos que se realicen con la misma dosis pero con animales de otro sexo y según los resultados, el próximo paso deberá ser realizado con la dosis siguiente mayor o siguiente menor.

El estudio se llevó a cabo en ratones de la línea *Wistar* sanos y con un peso promedio entre 25-30 gramos. Los animales se mantuvieron a una temperatura de $22 \pm 3^\circ\text{C}$ y 12x12 horas luz-oscuridad.

La alimentación consistió en pellets de concentrado porcino, el suministro de agua fue de botellas según necesidad del animal. Posteriormente en la segunda fase se emplearon ratones de la línea *Wistar*, con peso que oscila entre 25-30 g. con dosis prefijadas de 25, 200 y 2000 mg/Kg. de peso corporal; se utilizó la dosis límite, 2000 mg/Kg. PC, calculada sobre la base de los sólidos totales.



Se emplearán grupos experimentales con 5 animales cada uno, los cuales serán distribuidos aleatoriamente de la siguiente forma:

Tabla 3 Distribución de grupos de estudio para el test toxicológico

Grupos de estudio	Muestra	Cantidad de ratones
Grupo A	0.2 cc extracto de dosis de 25 mg/kg/p.c. de <i>Lantana camara</i>	5
Grupo B	0.2 cc extracto de dosis de 200 mg/kg/p.c. de <i>Lantana camara</i>	5
Grupo C	0.2 cc extracto de dosis de 2000 mg/kg/p.c. de <i>Lantana camara</i>	5
Grupo D	0.2 cc extracto de agua (vehículo)	5
Grupo E	0.2 cc a razón de placebo	5

5. Cálculo del DL_{50}

Diversos son los métodos cuantitativos que pueden utilizarse en el tratamiento de los datos de una serie, el método logarítmico Probit de Finney, el de Miller & Tainter, el procedimiento de Beer, el método Reed - Muench, etc. (Meyer, *Op. cit.*). Encontramos conveniente la utilización de este último debido a que detecta de manera gráfica e inmediata la dosis letal media, además de poder ser utilizado con datos que no presenten una distribución normal. Así también, en caso de que los datos sean insuficientes, la relación acumulativa de organismos vivos como muertos se crea una línea recta (por efectos de la transformación logarítmica) fácil de interpretar, la cual nos aproxima a la LC_{50} teórica, cuestión que agiliza el tiempo al buscarla LC_{50} de manera práctica (Hafner, 1977). Graficando así el porcentaje de muertos versus el logaritmo de la concentración. Los datos se expresan como la LC_{50} de un experimento triplicado.

6. Test glicémico

6.1 Técnica

La administración se realiza por vía oral. Los roedores serán observados constantemente durante las primeras 24 horas, y diariamente por un período de 14 días, durante el cual se seguirán los signos clínicos. Se controlará el peso a los 7 y 14 días. Terminado el período de observación los animales serán sacrificados,



6.2 Animales de experimentación

Se usaron ratones *swistar* con un peso promedio de 28 gramos y 2 meses de edad; Los ratones se mantuvieron en cajas de 11,5 cm, alto por 19 cm ancho y 25 cm de largo, 5 animales en cada una; fueron manejados bajo los condicionamientos éticos, y la Guía para el uso de animales de laboratorio⁽²²⁾.

Grupos de estudio:

6.3 Animales normoglicémicos

Tabla 4 grupos de ensayo o concentración de estándares:

Grupos	Muestra	Cantidad de ratones
Grupo A	agua y alimentación estándar	5
Grupo B	0.2 cc razón de dosis de 5 mg/kg/p.c. de glibenclamida	5
Grupo C	0.2 cc razón de dosis de 150 mg/kg/p.c. de aloxano	5
Grupo D	0.15 cc razón de dosis de 15 mg/kg/p.c.	5
Grupo E	0.2 cc razón de dosis de 20 mg/kg/p.c.	5
Grupo F	0.3 cc razón de dosis de 30 mg/kg/p.c.	5
Grupo G	0.2 cc razón de placebo (vehículo)	5
Grupo H	Animales sin dieta ni agua por 48 horas	5

6.4 Diabetes experimental

Se indujo mediante la administración de aloxano en dosis de 150 mg/kg. entre las 48 horas para un día total de 450 mg/kg; 7 días después de la última administración los animales se mantuvieron en ayunas por 12 horas y se determinaron los niveles de la glucosa en sangre. Los animales con glicemias superiores a 150 µg/dL, se consideraran diabéticos aptos para el experimento.

6.5 Extracción de sangre para la valoración de glicemia en sangre

Para la extracción de sangre en los animales de experimentación se procederá a realizar por punción en un tubo de ensayo previamente esterilizado conteniendo cristales de heparina para evitar la coagulación de la misma, las muestras deberán ser analizadas tan pronto sea posible, los análisis se realizarán en el dpto. de bioquímica de la facultad de medicina.



6.6 Técnica de disección de los animales de experimentación

Una vez nebulizado cada lote se procedió a realizar los cortes histológicos de tejido de ratón para su valoración histológica la que consistió en sacrificar al animal de experimentación y seccionar el tejido para su valoración histológica de tejido alveolar el cual se hizo de la siguiente manera:

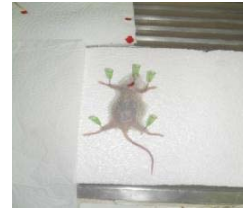


Figura 17

- o Inicialmente se coloca el ratón con el vientre hacia arriba, decúbito ventral, sobre un trozo de proplasto recubierto con papel.
- o Se sujetan las 4 patas a la plancha con alfileres.
- o Realizado lo anterior se toman las tijeras de disección para realizar unojalillo (pequeña abertura) por encima de la zona urogenital levantando la piel con una pinza para cortar las adherencias entre la piel y los músculos para separar la piel.
- o Posteriormente al retirar la piel se realizó un corte en los músculos de la pared abdominal (los cuales se encuentran adheridos al hoja parietal del peritoneo). Allí se realizan cortes en el esternón y partes de las costillas y se retiran los músculos hacia los lados para extraer los pulmones del animal.

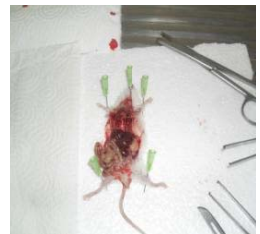


Figura 18

6.7.1 Procedimiento para fijación de tejido diseccionado (dehidratación y fijación).

Una vez extraídos los pulmones se procede a la fijación de la manera siguiente:

- Se colocan en un cassette de fijación buscando la posición del corte deseado; estos se envasan en frascos conformalina al 10% con el objetivo de mantener la estructura del tejido, este proceso debe durar 24 horas de lo contrario el tejido podría desintegrarse.
- Transcurrido las 24 horas se ponen los cassettes de fijación en la máquina de deshidratador de tejido (WAX BATH Type E7606) contenidos en una canastilla que con movimiento vaivén se sumerge en cada recipiente con un lapso de tiempo determinado para cada beaker; estos contienen diferentes sustancias entre ellas alcohol a diferentes grados así mismo xilol puro y parafina este proceso dura 18 horas consecutivas.



Figura 19



- Una vez deshidratado el tejido, los cassette de fijación se sumergen en el incluidor de parafina (TESPA PEC3003-D), luego estos se incluyen en los moldes procurando que el tejido se coloque en la posición deseada para facilitar el posterior corte,
- los moldes se rellenan de nuevo con parafina a 70°C ejerciendo presión en este paso para luego ser enfriado en el área llamada Campo Frio contenida en el aparato. Se refrigera por 10 min para retirar el molde del tejido fijado.

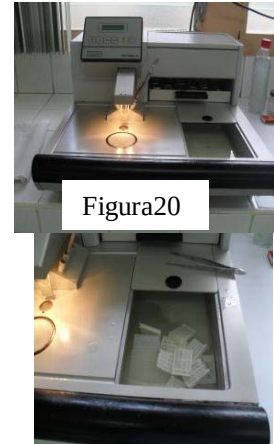


Figura 20

6.7.2 Procedimientos para corte en micrótomos

Teniendo el tejido fijado se coloca el cassette de fijación en posición horizontal en el micrótomos (cortador de tejido SHANDONAS 325 ^{figura 12}), para realizar el corte con cuchillas de acero inoxidable con un grosor de 3 micras, antes de cada corte se frota con un pedazo de hielo la parte de parafina que contiene el tejido con el fin de mantener la consistencia de la parafina y evitar la ruptura de la lámina cortada.



Figura 21

- Una vez cortada la lámina se sumerge en baño maría (TERMOFIN 60°C-65°C ^{figura 13}) a 60°C para fijar la lámina a la portaoobjetos, posteriormente estos se llevan a un horno por 20 min a una temperatura de 80°C todo esto con el objetivo de eliminar la parafina del tejido.



Figura 22

6.7.3 Tinción de tejidos

En este proceso se utilizan diferentes contenedores con distintas sustancias entre ellas xilol, alcohol metílico, hematoxilina y Eosina, el proceso es el siguiente:

- Una vez calentado los portaobjetos en el horno se procede a sumergirlos en los primeros tres recipientes que contienen xilol concentrado en un lapso de tiempo de 5 minutos en cada uno con el objetivo de eliminar los últimos residuos de parafina del tejido.



Figura 23

Figura 24



- Luego se sumergen nuevamente en 4 recipientes que contienen alcohol metílico al 98% para retirar del tejido el xilol restante en un lapso de 1 minuto en cada recipiente, seguidamente se sumergen en un recipiente que contiene hematoxilina de Harris con el objetivo de teñir el núcleo de las células de los tejidos por un lapso de 8 minutos.
- Posteriormente se enjuaga en agua y se sumerge posteriormente en hidróxido de amonio al 5% con el propósito de resaltar el color azul de la hematoxilina (de 2 a 3 sumersiones)
- Seguidamente se incluyen en Eosina por 5 minutos con el fin de teñir el citoplasma de la célula de los tejidos, pasado este tiempo se enjuaga 3 veces con agua y finalmente se limpian los últimos residuos de Eosina incluyendo los tejidos en 3 frascos diferentes de alcohol al 98% obteniendo de esta manera el tejido fijado y teñido de manera adecuada.

6.7.4 Valoración histológica de tejidos

Realizados los procesos anteriormente mencionados se procede a la valoración de los tejidos en un microscopio OLYMPUS BX41 Modelo U-SD03 utilizando resoluciones 4x0.10 hasta 100x1.25 mm pretendiendo encontrar de manera detallada parámetros (hallazgos histopatológicos a nivel de páncreas) como son:

- Pancreatitis
- alteraciones de los islotes de Langerhans

6.8 Todos los animales posteriores al ensayo deberán ser sacrificados de acuerdo a las normas internas del bioterio

Para el sacrificio de los animales de experimentación se procede a dar muerte por desnucamiento, posteriormente se procede a desecharlos en una jaula de incineración para su completa eliminación



RESULTADOS Y ANALISIS DE RESULTADOS



Tabla 5 Test toxicológico Bioensayo Toxicidad de extractos de *Lantana camara* in vivo en Ratones Wistar

Grupos de estudio	Muestra	Animales vivos 6hrs de exposición	Animales vivos 12hrs de exposición	Animales vivos 96hrs de exposición	Animales muertos 6hrs de exposición	Animales muertos 12hrs de exposición	Animales muertos 96hrs de exposición
Grupo A*	0.2cc arazón de dosis de 25 mg/kg/p.c. de extracto de <i>Lantana camara</i>	5	5	5	0	0	0
Grupo B*	0.2cc arazón de dosis de 200 mg/kg/p.c. de extracto de <i>Lantana camara</i>	5	5	5	0	0	0
Grupo C*	0.2cc arazón de dosis de 2000 mg/kg/p.c. de extracto de <i>Lantana camara</i>	5	5	5	0	0	0
Grupo D*	0.2cc arazón de agua (vehículo)	5	5	5	0	0	0
Grupo E*	0.2cc arazón de placebo	5	5	5	0	0	0

*: Grupos conteniendo 5 animales de experimentación

La presente tabla evidencia los resultados obtenidos para la valoración de la respuesta toxicológica de *Lantana camara* en animales de experimentación para lo cual tras la administración de los extractos de arazón de 25, 200 y 2000 mg/kg no se evidencia muerte en los grupos descritos, en comparación con los grupos control y la fracción activa evaluada en el bioensayo de *Artemia salina* de 600 ppm, para lo cual se puede considerar que la dosis letal 50 (DL₅₀) de los extractos acuosos de *Lantana camara* es superior a 2000 mg/kg.

No obstante en los grupos de experimentación se observaron cambios en el pelaje y cornea del animal, esto podría significar efectos adversos tras la administración del extracto acuosos de *Lantana camara*.



Tabla 6 Test Glicémico

Grupos de estudio	Muestra	X Valor inicial	Valor final
Grupo A 5 animales de experimentación	agua y alimentación estándar	128 mg/dl	128 mg/dl
Grupo B 5 animales de experimentación	Animales sin dieta ni agua por 48 horas	106 mg/dl	*
Grupo C 5 animales de experimentación	0.2 cc a razón de dosis de 5 mg/kg/p.c de glibenclamida	115 mg/dl	117 mg/dl
Grupo D 5 animales de experimentación	0.2 cc a razón de dosis de 150 mg/kg/p.c de aloxano	120 mg/dl	220 mg/dl
Grupo E 5 animales de experimentación	0.15 cc a razón de dosis de 15 mg/kg/p.c. de extracto de <i>Lantana camara</i>	117 mg/dl	136 mg/dl
Grupo F 5 animales de experimentación	0.2 cc a razón de dosis de 20 mg/kg/p.c. de extracto de <i>Lantana camara</i>	131 mg/dl	178 mg/dl
Grupo G 5 animales de experimentación	0.3 cc a razón de dosis de 30 mg/kg/p.c de extracto de <i>Lantana camara</i>	123 mg/dl	175 mg/dl

*: No se indica valores finales, los animales fueron sacrificados posterior a la medición de la glicemia

La presente tabla 6 evidencia los resultados obtenidos para la valoración de la respuesta glicémica de ratones *wistar* tras la administración de extractos acuosos de *Lantana camara*, para lo cual inicialmente el grupo control (grupo A) muestra un valor inicial de 128 mg/dl y final durante el estudio de 130 mg/dl, los valores anteriores se consideran normales según valores de referencia 134 ± 6.4 mg/dl₍₁₅₎; a su vez el grupo al cual fue inducido un estado hipoglicémico (grupo B) tras la suspensión de dieta y agua por 48 horas mostraron un valor de 106 mg/dl, de este último no se consideraron valores finales tras la conclusión del estudio, ya que ambos grupos A y B se utilizaron únicamente como criterio de comparación de los restantes grupos de estudio.

Los animales de experimentación de los grupos C al G se les administró el estándar de glibenclamida y mostraron valores iniciales de 115 mg/dl y 117 mg/dl y valor final tras la conclusión del estudio, de lo anterior se evidencia que tras la administración del estándar estos presentaron una reacción hipoglicémica, con la alimentación habitual del grupo control.



Los animales de experimentación grupos D a los cuales se les administró aloxano mostraron valores iniciales de 120 mg/dl y 220 mg/dl valor final tras la conclusión del estudio, de lo anterior se evidencia que el estándar indujo un estado de hiperglicemia en comparación a los valores obtenidos del grupo control de 128 mg/dl y grupo al cual se le suprimió la alimentación de 106 mg/dl

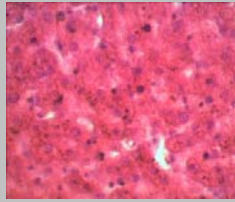
Los animales de experimentación grupos E a los cuales se les administró 0.15 cc de extracto de *Lantanacamara* administrados a razón de dosis de 0.48 mg, mostraron valores iniciales de 117 mg/dl y finales de 136 mg/dl tras la conclusión del estudio, de lo anterior, en comparación con valores de grupo control inicial de 128 mg/dl y final de 130 mg/dl, y valores de referencia de 134 ± 6.4 mg/dl₍₁₅₎ no se evidencia un valor significativo de variación de glucemia aplicando la prueba de turkey para $p < 0.05$

Los animales de experimentación grupos F a los cuales se les administró 0.20 cc de extracto de *Lantanacamara* administrados a razón de dosis de 0.64 mg mostraron valores iniciales de 131 mg/dl y finales de 178 mg/dl tras la conclusión del estudio, de lo anterior, en comparación con valores de grupo control inicial de 128 mg/dl y final de 130 mg/dl, y valores de referencia de 134 ± 6.4 mg/dl₍₁₅₎ se evidencia un valor significativo de variación de glucemia aplicando la prueba de turkey para $p < 0.05$.

Los animales de experimentación grupos G a los cuales se les administró 0.3 cc de extracto de *Lantanacamara* administrados a razón de dosis de 0.96 mg mostraron valores iniciales de 123 mg/dl y finales de 175 mg/dl tras la conclusión del estudio de lo anterior, en comparación con valores de grupo control inicial de 128 mg/dl y final de 130 mg/dl, y valores de referencia de 134 ± 6.4 mg/dl, se evidencia un valor significativo de variación de glucemia aplicando la prueba de turkey para $p < 0.05$.



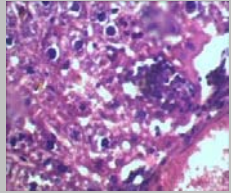
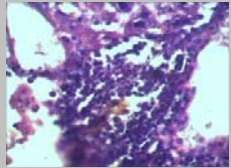
Tabla 7 histología de animales de experimentación

Grupos de Estudio	Valoración de los especímenes de estudio	Imágenes
Grupo A Animales de experimentación agua y alimentación estándar	Condición inicial: animales sanos, sometidos a dieta de pellets de concentrado y agua, no muestran signos de patología alguna previo al ensayo. Observaciones Histológicas:	

En la imagen 1 de tejido hepático se observa una arquitectura lobulillar y espacios porta constituidos por estructuras vasculares y canaliculares biliares. Los lobulillos hepáticos no presentaron una forma poligonal característica y sus límites no estaban bien definidos. En estas estructuras se observaron cordones de una sola célula hepática, que formaban columnas rodeadas por sinusoides vasculares de orientación radial, las cuales se dirigían a la vena centrolobulillar. Estas venas forman generalmente, espacios ópticamente vacíos en los que con dificultad se observó su revestimiento endotelial. Los cordones parenquimatosos estaban constituidos por hepatocitos de aspecto cuboide apoligonal con un núcleo redondeado de cromatina laxa. Todo lo anterior establecía la condición sana del tejido de animal de experimentación.



Tabla 8 histología de animales de experimentación

Grupos de Estudio	Valoración de los especímenes de estudio	Imágenes
Grupo A Animales de experimentación a los cuales se les administró aloxano	Condición inicial: animales sanos, sometidos a dieta de pellets de concentrado y agua, no muestran signos de patología alguna previo al ensayo. Observaciones Histológicas: .	 

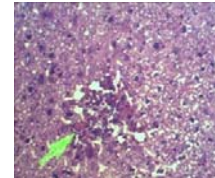
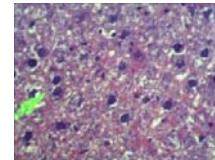
Se observan pérdida de la estructura celular y órgano tras la administración de aloxano en comparación a tejido sano de animales de experimentación, lo anterior basado en la acción necrosante específica y selectiva sobre las células β de los islotes de Langerhans. Identificadas por la característica pignótica de los núcleos de las células. En relación con la acción de este compuesto a nivel pancreático, esto en virtud de la interacción del Aloxano con el zinc pancreático, responsables de la destrucción de las células beta,



Tabla 9 histología de animales de experimentación

Grupos de Estudio	Valoración de los especímenes de estudio
Grupo A	Condición inicial: animales sanos, sometidos a dieta de pellets de concentrado y agua, no
Animales de experimentación	muestra signos de patología alguna previo al ensayo.
30mg/kg/p.c de extracto de	
<i>Lantana camara</i>	

Imágenes



Tras la valoración en base a la histología de las muestras de análisis de páncreas e hígado muestran necrosis y formación de micro abscesos los cuales evidencian valores próximos a 200 mg/dl de glucosa en sangre característico de pacientes diabéticos, lo cual se asocia a la retinopatía que puede evidenciarse en fotos de animales de experimentación así como la condición poco sana de los mismos disminución del brillo en el pelaje



CONCLUSIONES



En lo concerniente a la comprobación de la respuesta toxicológica en animales de experimentación tras la administración de los extractos de la especie *Lantana camara* a razón de 600 ppm concentración obtenida en *Artemisia salina*, así como concentraciones de 25,200 y 2000 mg/kg, posterior a las 96 horas de exposición, no se mostró toxicidad inicial a las 6 horas que corresponden a la toxicidad aguda; por lo cual se considera la toxicidad de los extractos acuosos de la especie superior a 2000 mg/kg en los animales de experimentación. No obstante, no se recomienda la utilidad fitomedicinal de la especie por encima del beneficio-riesgo.

En cuanto a la valoración del test glicémico tras la administración de los extractos de *Lantana camara* en ratones normoglicémicos. El análisis de los resultados demostró que la administración del extracto en ratones normoglicémicos no produce una disminución estadísticamente significativa de los niveles de glucosa sanguínea; sólo la glibenclamida tuvo este efecto a la hora 24. En ratones hiperglicémicos, observándose una disminución con significancia estadística ($p < 0,016$) de los niveles de glicemia con la administración de *Lantana camara* y glibenclamida, en relación al grupo control que recibió agua y alimentación estándar.

Por lo tanto se concluye que en nuestras condiciones experimentales los extractos de *Lantana camara* no son efectivamente hipoglucemiantes en ratones de experimentación.



RECOMENDACIONES



- En las investigaciones de evaluación biológica de especies con potencial medicinal recolectar las muestras vegetales en el tiempo indicado en la bibliografía. Según la parte de la especie utilizada para garantizar el contenido máximo posible de metabolitos secundarios
- Utilizar siempre estándares que garanticen la actividad fitomedicinal en las especies de acuerdo a la evaluación realizada en extractos o muestras de ensayo.
- Efectuar posteriores estudios como aislamiento biológico para separar moléculas tóxicas de moléculas con potencial fitomedicinal presentes en la planta *Lantana camara*
- A las autoridades correspondientes velar por el acondicionamiento del área de ensayos del Bioterio como climatización de las áreas, que permitan evitar estrés en los animales de experimentación, para garantizar la calidad de los resultados obtenidos en estudios de esta índole.
- A futuros investigadores que garanticen que los animales de experimentación pertenezcan a la misma especie y reúnan los requisitos de edad, peso corporal y tallas similares para que se asegure la autenticidad de los resultados obtenidos durante la investigación.



BIBLIOGRAFIA



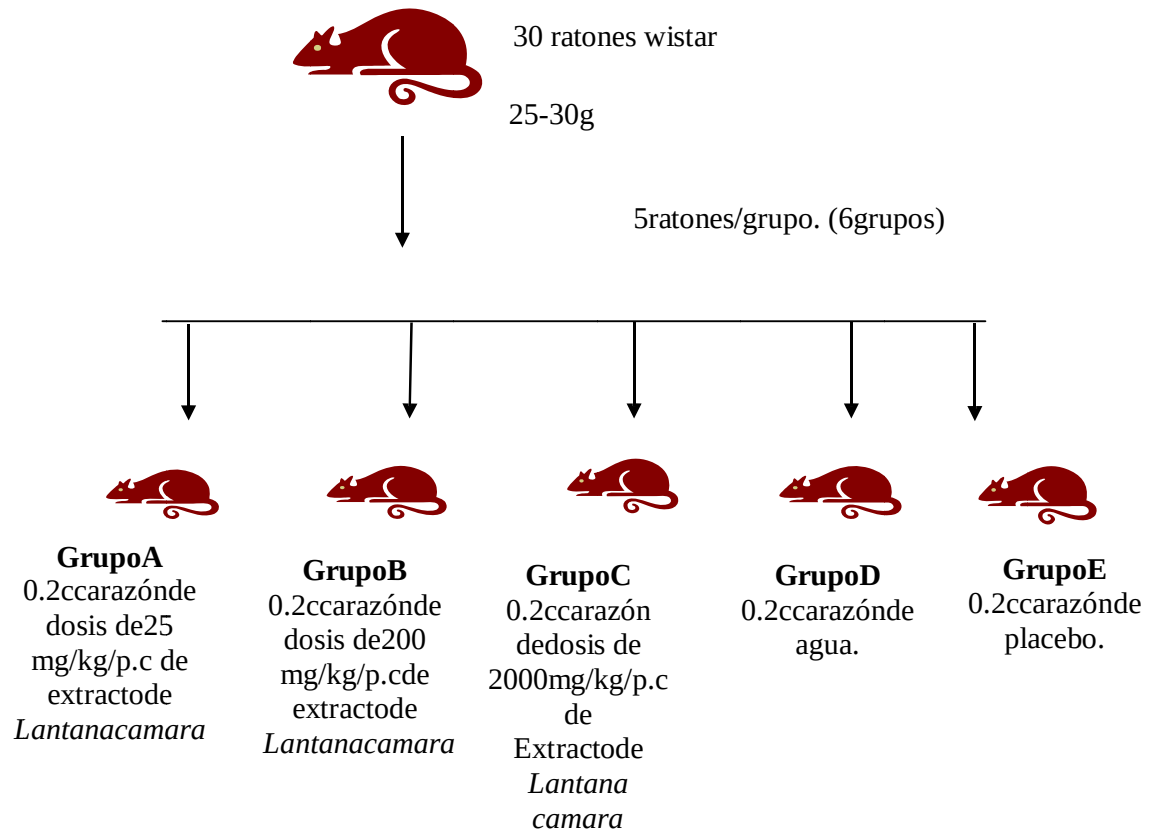
1. Wikipedia. Diabetes mellitus. http://es.wikipedia.org/wiki/Diabetes_mellitus
2. N'guessan Koffi^{1*}, Amoikon Kouakou Ernest³, Tiébré Marie-Solange¹, Kadja Beugré² and Zirihi Guédé Noël. Effect of aqueous extract of *Chrysophyllum cainito* leaves on the glycaemia of diabetic rabbits African Journal of Pharmacy and Pharmacology Vol.3(10) pp. 501-506, October 2009. Available online <http://www.academicjournals.org/ajpp>
3. FitzPatrick (1996). Diabetes and hormone center of the Pacific. <http://www.endocrinologist.com/Espanol/diabetes.htm#3>
4. *Chrysophyllum mexicanum* | Gwannon.com Copyright Gwannon.com. <http://www.gwannon.com/species/Chrysophyllum-mexicanum>
5. Floradigital de la selva. *Chrysophyllum cainito*. http://sura.ots.ac.cr/local/florula3/list_images_etno.php?key_species_code=LS001735&key_kingdom=&key_phylum=&key_class=&key_order=&key_family=&key_genus=&specie_name=cainito
6. Sharapin, N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. CYTED (Organización). Sub programa de química fina farmacéutica, Convenio Andrés Bello (organización).
7. Grupo de modelos experimentales para ciencias zoológicas de la universidad del tomi laderechos reservados (s.f). <http://neurocienciaut.jimdo.com/bioterio>
8. F.A.Q. Animales de experimentos. <http://www.altarriba.org/viviseccion/faq.htm#vivisección>
9. Wikipedia. ratón de laboratorio. http://es.wikipedia.org/wiki/Rat%C3%B3n_de_laboratorio
10. Wikipedia. Rattus. <http://es.wikipedia.org/wiki/Rattus>
11. Wikipedia. Ratón knockout. http://es.wikipedia.org/wiki/Rat%C3%B3n_knockout
12. Wikipedia. Artemia Salina. http://es.wikipedia.org/wiki/Artemia_salina
13. Badilla Baltodano Beatriz (2011). Plantas medicinales y su estandarización. <http://www.semanario.ucr.ac.cr/index.php/component/content/article/1076Crisol/3360-plantas-medicinales-y-su-estandarizacion.htm>
14. Revista internet/Hematological and biochemical parameters in Laboratory rats CENPALAB, Cenp: SPRDREDVET-Revista electrónica de Veterinaria-ISSN 1695-7504 2011 Volumen 12 N° <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n111111>



ANEXOS



Esquema del test toxicológico en ratones





Esquema del test glicémico en ratones

