



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA

**“EVALUACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA ACCIÓN
CARDITÓXICA INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE LA
SEMILLA HINDÚ® (*Thevetia peruviana*)” EN MODELO
EXPERIMENTAL DE EMBRIÓN DE POLLO**

Autora. Diana Carolina Sequera Valladares

Caracas, Octubre 2012.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA



**“EVALUACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA ACCIÓN
CARDITÓXICA INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE LA
SEMILLA HINDÚ® (*Thevetia peruviana*)” EN MODELO
EXPERIMENTAL DE EMBRIÓN DE POLLO**

FARMACÉUTICO: DIANA CAROLINA SEQUERA

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar el título de Magister
Scientiarum en Toxicología en la Universidad Central de Venezuela.

**TUTOR: DR. MSC DSC. PROFESOR TITULAR. MARCO ANTONIO ÁLVAREZ
OCHOA**



VEREDICTO

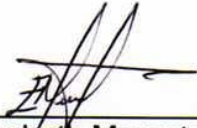
Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el **Trabajo de Grado** presentado por la **FARMACEUTICO DIANA CAROLINA SEQUERA VALLADARES** C.I. V- 14.444.339, bajo el título "**EVALUACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA ACCIÓN CARDIOTÓXICA INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE LA SEMILLA HINDÚ® (*Thevetia peruviana*) EN MODELO EXPERIMENTAL DE EMBRIÓN DE POLLO**", a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **MAGISTER SCIENTIARUM EN TOXICOLOGIA**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día **11 de octubre de 2012** a la **09:00 a.m.**, para que **la autora** lo defendiera en forma pública, lo que **la autora** hizo en el **aula 703**, del piso **7** de la Facultad de Farmacia, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual **respondió** a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

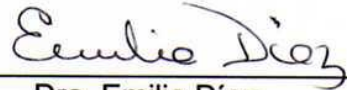
2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLO** por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por **la autora**, que **se ajusta** a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado: constituye un aporte experimental para la comprensión de la cardiotoxicidad vinculado con el consumo de la Semilla Hindú®. El jurado recomendó cambiar el título a: "**EVALUACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA ACCIÓN CARDIOTÓXICA INDUCIDA POR EL EXTRACTO ACUOSO DE LA SEMILLA HINDU® (*Thevetia peruviana*) EN MODELO EXPERIMENTAL DE EMBRIÓN DE POLLO**"

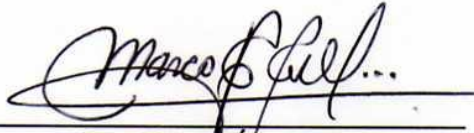
En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los **once** días del mes de **octubre** del año **2012**, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Tutor Coordinador del jurado el Doctor Marco Álvarez



Dra. Elizabeth Merentes
C.I. V 3.565.514
FACULTAD DE CIENCIAS U.C.V.



Dra. Emilia Díaz
C.I. V- 6.513.844
INSTITUTO DE MEDICINA
EXPERIMENTAL



Dr. Marco Álvarez
C.I. V- 4.585.859
FACULTAD DE MEDICINA U.C.V.
Tutor - Coordinador



ap. 11/10/2012.



“EVALUACIÓN MORFOFUNCIONAL DE LA ACCIÓN CARDITÓXICA INDUCIDA POR EL EXTRACTO DE LA SEMILLA HINDÚ® (*Thevetia peruviana*)” EN MODELO EXPERIMENTAL DE EMBRIÓN DE POLLO

Por: Ftco. Diana Carolina Sequera

Resumen

La Semilla Hindú®, ha sido empleada de manera indiscriminada para el control de peso, no existiendo evidencias que justifique su uso en terapéutica y garantice un margen de seguridad apropiado. Lo que conduce a realizar estudios experimentales con enfoques toxicológicos sistematizados, que permitan profundizar sobre la toxicidad en sistemas tisulares y celulares ligado a los cambios morfofuncionales ocasionados por el extracto de Semilla Hindú®. Se emplearon embriones de pollo de 4 1/2, 5, 8 y 12 días de desarrollo, de huevos fértiles de Gallina Rhodey Island. De acuerdo a los estudios taxonómicos se puede clasificar la Semilla Hindú® como la especie *Thevetia peruviana*, perteneciente a la familia Apocynaceae. Estudios a través de Espectrofotometría UV indican la presencia de banda de absorción a $216 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$, característica del oleandrina (glucósido cardíaco) además los análisis fotolorimétricos arrojaron la presencia de cianuro; inhibidor la cadena respiratoria a nivel mitocondrial. De acuerdo a los estudios realizados y empleando el método de Spearman & Karber se determinó que la dosis (DL50) corresponde a $37,5 \mu\text{g/ml}$ y la dosis tóxica a $47,8 \mu\text{g/ml}$ en peso promedio. Capaz de inducir la muerte celular a través de apoptosis, evidenciado con la tinción de TUNEL arrojando un resultado positivo en las células endocardiales. Con el Acustocardiograma (ACG) y Cardiovideograma (CVG) se evaluaron las señales de toxicidad: alteraciones en la frecuencia cardíaca y la actividad contráctil. Con el acustocardiograma se evidenció un cambio en frecuencia cardíaca al administrar el extracto acuoso de Semilla Hindú®. Mientras que con el Cardiovideograma se encontraron cambios vinculados con un mayor nivel sistólico en la porción ventricular (V) y con un menor nivel sistólico en la porción auricular (A) en comparación a la condición control. Se demostró la cardiotoxicidad inducida por el extracto acuoso de Semilla Hindú®.

Palabras claves: Embrión de pollo, cardiotoxicidad, glucósido cardíaco, cianuro, contractilidad miocárdica, Cardiovideograma (CVG), Acustocardiograma (ACG), Semilla Hindú®, *Thevetia peruviana*.



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE FARMACIA
POSTGRADO DE TOXICOLOGÍA



**MORPHOFUNCTIONAL EVALUATION OF THE CARDITOXIC ACTION
INDUCED BY THE HINDU SEED EXTRACT IN EXPERIMENTAL MODEL ®
(*Thevetia peruviana*).**

Por: Ftco. Diana Carolina Sequera

Summary

The Indian Seed ®, has been used indiscriminately to weight control, with no evidence to justify their use in therapeutic and ensure appropriate safety margin. The experimental studies leading to systematic toxicological approaches, to deepen toxicity in tissue and cell systems linked to morphofunctional changes caused by Hindu ® Seed extract. The Chicken embryos were used for 4 1/2, 5, 8 and 12 days of development, fertile hen eggs Rhodey Island. According to the taxonomic studies can be classified as Seed Hindu ® *Thevetia peruviana* species, belonging to the family Apocynaceae. Through spectrophotometry studies indicate the presence of UV absorption band at 216 nm + 1 nm, oleandrin feature (cardiac glycoside). Besides, the photolorimetrics analysis showed the presence of cyanide; inhibitor of the respiratory chain in mitochondria. According to studies, using the method of Spearman & Karber was determined that the dose (LD50) corresponds to 37.5 ug / ml and the toxic dose to 47.8 mg / ml in average weight. Able to induce cell death via apoptosis, evidenced by TUNEL staining throwing a positive endocardial cells. With Acustocardiograma (ACG) and Cardiovideograma (CVG) were evaluated the signs of toxicity: changes in heart rate and contractile activity. With acustocardiograma was evidenced a change in heart case when using the aqueous extract of Indian Seed ®. While the Cardiovideograma related changes were found with higher ventricular systolic portion (V) and a lower systolic level in the earpiece portion (A) compared to the control condition. It was shown that the induced cardiotoxicity aqueous extract of Hindu ® seed.

Keywords: chicken embryo, cardiotoxicity, cardiac glycoside, cyanide, myocardial contractility, Cardiovideograma (CVG), Acustocardiograma (ACG), Hindu ® seed, *Thevetia peruviana*.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios. Por darme la oportunidad de vivir y por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente, por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el período de estudio y por haberme permitido llegar hasta este punto y haberme dado salud para lograr mis objetivos.

A mis padres. Por su aporte, esfuerzo, amor y apoyo en cada una de mis metas.

A mis hermano. Por ser más que solo hermanos, por apoyarme y estar siempre conmigo.

Al Dr Marcos Alvarez. Por su dedicación, comprensión y compartir conmigo sus valiosos conocimientos.

A la Sra Lourdes y al Dr Ercolino. Por compartir sus conocimientos conmigo y ser un gran apoyo esta investigación.

A las instituciones que hicieron posible este estudio y al personal que labora en los mismos.

Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo”; Laboratorio Criminalístico de la Guardia Nacional Bolivariana de Venezuela. FONACIT. Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela.

A los profesores que marcaron la diferencia.

A la profesora Daniela. A quien considero una gran amiga, le agradezco por estar siempre preocupada por cada paso que he dado, tanto a nivel profesional como persona y capaz de brindarme consejos oportunos.

A mis grandes amigas. Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y personal: Viviana (cómplice es cada ocurrencia que teníamos para liberar stress, como nos divertimos), Mariana y Geraldine (conciencia, orden y apoyo incondicional) y Chela por estar en todo momento y apoyarme. Muchachas son lo máximo.

A la coordinadora del postgrado Gali. Por su gran esfuerzo, constancia y paciencia para que todos los estudiantes logren el objetivo.

INDICE GENERAL

Resumen Español	iii
Resumen Inglés	iv
Agradecimientos	v
Índice General.	vi
Índice Figuras.	ix
Índice de Tablas	xi
Índice de Grafica	xii
Introducción	1
Marco Teórico	6
1. Antecedentes.	6
1.1.Modelo experimental de embrión de pollo.	14
1.2.Patología celular por acción tóxica.	23
1.3. Justificación.	26
1.4.Hipótesis.	28
Objetivos	29
2.1. Objetivo General.	29
2.2. Objetivos Específicos.	29
Materiales y Métodos.	31
3.1 Modelo Experimental.	31
3.2. Identificar las características taxonómicas de la Semilla Hindú ®,	31
empleando como patrón de referencia la planta <i>Thevetia peruviana</i>	

ubicada en la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales (FACES) de la Universidad Central de Venezuela.

3.3 Determinar los elementos químicos presentes, en los extractos 33
alcohólicos y acuosos de la Semilla Hindú®, a través de las técnicas instrumentales Espectrofotometría UV Visible y Fotocolorimetría.

3.3.1. Método general de extracción en metanol. 33

3.3.2. Espectrofotometría de Ultravioleta – Visible. 33

3.3.3. Método general de extracción en solución salina®. 35

3.3.4. Fotocolorimetría. 35

3.4 Determinar la dosis tóxica (DT) y dosis letal cincuenta (DL₅₀) del 37
extracto acuoso de la Semilla Hindú®, en embriones de pollo de cuatro (04) y doce (12) días de desarrollo.

3.5 Determinar el efecto de las diferentes concentraciones del extracto 38
acuoso de Semilla Hindú®, sobre las células cardíacas embrionarias de cultivos primarios en gota pendiente..

3.5.1. Técnica del Órgano Aislado. 40

3.5.2. Tinciones Histoquímicas 42

3.5.3. Registro y Análisis de Imágenes 42

3.6. Evaluar con Acustocardiograma (ACG) y Cardiovideograma 43
(CVG) en embriones de pollo, la toxicidad experimental inducida por extracto acuoso de Semilla Hindú®.

3.6.1 Acustiocardiograma (ACG) 44

3.6.2 Cardiovideograma y Cardiotoxicidad 50

3.6.3 Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP) 52

3.6.4 Contractilidad Miocárdica.	52
3.7 Evidenciar “ <i>in vivo</i> ” e “ <i>in vitro</i> ” las señales de daños cardiacos tisulares y celulares inducidos por la acción del extracto acuoso de la Semilla Hindú®, a través de inmunohistoquímicas (TUNEL) y marcaje de organelos subcelulares mitocondrias (DiOC13) y lisosomas (naranja de acridina).	53
3.7.1 Tinción histoquímica para Microscopio de Luz.	54
Resultados	56
4.1 Clasificación de Botánica de la Semilla Hindú ®.	56
4.2 Espectrofotometría Ultravioleta.	58
4.3 Fotocolorimetría.	58
4.4 Población Embrionaria.	59
4.5 Dosis Letal Media (DL50) y Dosis tóxica	60
4.6 Acción toxica generalizada de la dosis letal 50 (DL50) en embriones tratados con extracto acuoso de Semilla Hindú®.	61
4.7 Acción toxica a nivel celular de la concentración letal 50 y dosis toxica, de la Semilla Hindú®.	62
4.8 Actividad cardiaca a través de métodos no invasivos tales como el Acustocardiograma (ACG) y el Cardiovideograma (CVG).	64
4.8.1 Acustocardiograma (ACG)	64
4.8.2 Cardiovideograma (CVG)	65
4.9 Señales de Daños Cardiacos Tisulares y Celulares.	80
Discusión	83
Conclusiones	87
Referencias	88

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	El Principio Central de la Histopatología Experimental.	4
Figura 2	“ <i>Thevetia peruviana</i> ”. Hojas, frutos y semillas.	9
Figura 3	Retorcimiento del esbozo del corazón de un embrión de pollo	17
Figura 4	Sistema circulatorio de un embrión humano de 20 somitas	19
Figura 5	Embrión de pollo, fase 15 (de 50 a 55 horas de vida)	20
Figura 6	Espectrofotómetro de UV-Visible marca HEWLETT PACKARD modelo 8453	35
Figura 7	Método de gota pendiente.	39
Figura 8	Diseño de incubadora	45
Figura 9	Marcado de huevo para seleccionar la ubicación de los sensores	45
Figura 10	Ubicación del sensor temperatura y micrófono sellado herméticamente con cera.	46
Figura 11	Registro de señales amplificadas.	47
Figura 12	Esquema de captura de señales	48
Figura 13	Espectro de frecuencias de las señales acústicas que son capturadas en un embrión de pollo de 14 días de incubación	49
Figura 14	Estación de trabajo para la medición de la frecuencia cardiaca mediante Cardiovideograma (CVG).	51
Figura 15	Fotograma con recuadro y delimitación del área cardiaca y patrón del registro de luminosidad en función del tiempo (s)	51
Figura 16	Espectrofotometría ultravioleta	58
Figura 17	Registro fotográfico de muestras representativas de monocapas de mioblastos cardiacos	63
Figura 18	Registro de las señales acústicas o acustocardiograma	65
Figura 19	Representación grafica de la variación de luminosidad expresada como una secuencia regular y homogénea de intervalos de puntos máximos de luminosidad	66
Figura 20	Representación grafica del patrón de actividad de las porciones contráctiles del corazón pre y post tratamiento.	68
Figura 21	Sección frontal de un corazón de embrión de pollo de 8 días de	80

	desarrollo	
Figura 22	Cultivo de mioblasto cardiaco en gota pendiente	81
Figura 23	Microfografía de mioblasto cardiaco	82

INDICE DE TABLAS

Tabla I	Información taxonómica de la <i>Thevetia peruviana</i> .	10
Tabla II	Desarrollo del feto humano	16
Tabla III	Datos referente a los aspectos taxonómicos de la Semilla Hindú ®	32
Tabla IV	Clasificación taxonómica de la Semilla Hindú	57

INDICE DE GRAFICOS

Grafico 1	Concentración de cianuro.	59
Grafico 2	Población Embrionaria	60
Grafico 3	Signos presentado por los embriones expuestos de forma aguda al extracto acuoso de Semilla Hindú	61

I. INTRODUCCIÓN.

El punto de inicio del presente trabajo de grado, se ubica a partir de una experiencia laboral en el Laboratorio Central de la Guardia Nacional Bolivariana de Venezuela, en el cual me desempeñé como Jefa del Departamento de Toxicología. En la mencionada institución, parte del personal femenino que allí laboraba, comenzó a consumir la conocida Semilla Hindú ® proveniente de la venta ilícita como tratamiento para adelgazar. Los resultados obtenidos por éstas, fue una disminución de peso corporal, aproximadamente diez kilogramos (Kg) en un mes. Este hecho me condujo a indagar sobre algunos aspectos relacionados con este recurso natural de gran disponibilidad en la población humana, como el origen de la mencionada semilla, su obtención, forma de administración y los síntomas consecuentes de su ingesta.

A través de dicha investigación, se pudo conocer que era obtenida en algunas casas naturistas por la vía de ventas ilícitas, con una posología de un cuarto de semilla ingerida todas las mañanas. Entre los efectos adversos se destacaron el aumento exagerado de la motilidad intestinal, micción y pérdida de peso con gran rapidez. Una de las afectadas presentó una acelerada disminución de peso, aproximadamente siete (07) Kg en un mes, acompañada con un aumento de la frecuencia cardíaca, rubor y calor. Cabe destacar, que paralelo a ello una estudiante de la Universidad Central de Venezuela perteneciente a la Escuela de Bibliotecología, falleció como consecuencia de la ingesta indiscriminada de estas semillas (Novoa, J., 2007).

Como producto de la información obtenida surge un informe preliminar de la problemática en cuestión, que fue entregado a la División donde me desempeño, el cual se resume a continuación:

*“¿Cuándo debe considerarse que una planta es tóxica? El axioma de Paracelso **Sola dosis facit venenum** (Sólo la dosis hace al veneno) es particularmente apropiado para el caso de las toxinas naturales; es decir, la toxicidad de una planta depende directamente de la **cantidad** de toxina ingerida en una unidad de **tiempo**. Algunas no deberían ser nunca ingeridas (como es el caso de **Cicuta maculata** o el tejo), mientras que otras pueden tener valor nutritivo e incluso se consideran buenas, en cuyo caso debería conocerse las condiciones en las que pueden resultar tóxicas. Estas condiciones pueden estar determinadas por muchos factores dependientes del ciclo de la planta, condiciones ambientales, así como del estado fisiológico del individuo o animal que la consume. **La Thevetia peruviana** es una planta de la familia de las **Apocynaceae**, cultivada en las zonas tropicales y subtropicales como un árbol ornamental de 3-5 m de altura el cual da un fruto pequeño, irregular y parecida a una manzana, algo comprimido lateralmente; semillas, de color gris claro, las cuales se encuentran protegidas por una cobertura gruesa, dura y resistente, que miden aproximadamente de unos 2 x 3,5 cm. Contiene en sus tejidos altas concentraciones de cardenólicos entre los que se incluyen *Thevetia peruviana* A, B y *neriifolia*, capaces de producir efectos inotrópicos positivos en el hombre y los animales.*

Los efectos clínicos se asemejan a la intoxicación por digitalicos, con síntomas gastrointestinales y cardíacos, produciendo irritación local de membranas mucosas y de la boca seguida por náusea y vómitos, posterior a varias horas de la ingesta. Otras características clínicas son: diarrea severa, dolor abdominal, pupilas dilatadas y en ocasiones convulsiones. Los efectos cardiovasculares reportados indican manifestaciones tales como: bradicardia, bloqueo de la función cardíaca, fibrilación ventricular, entre otros.

Rango Tóxico: Una o dos semillas puede ocasionar la muerte en niños; en adultos, la ingestión de ocho semillas puede ocasionar la muerte.

Conclusiones: *Para concluir tenemos que actualmente, no existen evidencias que justifiquen su uso en terapéutica y garanticen un margen de seguridad apropiado. Los artículos publicados están referidas a intoxicaciones accidentales (en niños) e intentos de suicidio que son considerados como un problema de salud pública en algunos países. En Venezuela, se han reportado casos de intoxicaciones por la ingestión de las semillas las cuales han conducido a la muerte de personas. Es de interés destacar, la importancia que tiene la educación de la población y la información oportuna a la comunidad científica en relación al consumo de preparaciones medicinales de dudosa procedencia, que no están debidamente registradas ni autorizada por los entes pertinentes para su debido uso, y que pueden ocasionar graves daños a la salud del individuo, ya que de acuerdo con la revisión bibliográfica realizada y a los resultados obtenidos por esta unidad Técnico- Científica, se considera que las semillas que están siendo comercializadas de manera indiscriminada posee efectos tóxicos que podrían causar desde síntomas leves hasta la muerte de quienes la consumen.” (Sequera y González., 2007).*

De las conclusiones surge la inquietud de abordar y profundizar la evaluación de la Semilla Hindú proveniente de la venta ilícita, con el objeto de indagar acerca de las propiedades tóxicas, así como también, de otras características físico-químicas que pudieran permitir interpretar las características tóxicas de la misma. Para ello el presente trabajo de grado se enmarcó en la línea de investigación que se lleva a cabo en la Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo”, a cargo del Dr. Marco A Álvarez O., y que tiene como objetivo general el estudio de señales de daño a nivel celular y tisular, inducido por la acción de diferentes agentes tóxicos. Dicha línea de investigación, hace uso del embrión de pollo como modelo experimental y está basada, en lo que en el laboratorio, se ha denominado “El Principio Central de la Histopatología Experimental”. Dicho principio, consiste en que un agente tóxico de

naturaleza química, física o biológica es capaz de traspasar una barrera física, como la membrana plasmática, e inducir diferentes tipos de señales intracelulares que activan blancos específicos dentro de las células, generándose de esta manera una respuesta a nivel morfológico y funcional en el órgano o sistema afectado (Fig. 1).

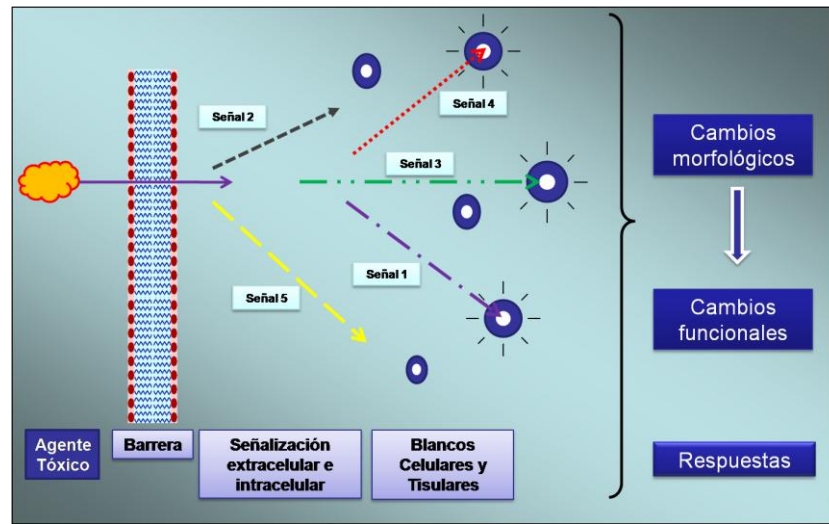


Figura 1. “El Principio Central de la Histopatología Experimental”. Müller y col, 2008.

En base a este principio, cabe resaltar que el estudio de los cambios morfofuncionales del tejido y las células que constituyen un órgano en particular; permite dilucidar los posibles mecanismos de acción por medio de los cuales el agente tóxico ejerce cambios en la homeostasis de las células, que conducen al daño celular vinculado al deterioro funcional del órgano blanco. Cabe destacar, que a pesar que han sido reportados efectos a nivel cardíaco por parte de la planta *Thevetia peruviana*, dicha característica no ha sido claramente establecida para la semilla, siendo esta parte de la planta la que es ingerida como alternativa para adelgazar. No obstante se conoce que la semilla ha sido empleada para intentos de suicidio y se han reportado casos de intoxicación producto de su ingesta

en países como México y Venezuela, con consecuencia a nivel cardiovascular (Aular y col, 2003).

De lo antes expuesto, se deduce la pertinencia de los estudios experimentales con enfoques toxicológicos sistematizados, que permitan profundizar sobre la toxicidad en sistemas tisulares y celulares expuestos a la Semilla Hindú®. De allí que proponer una evaluación, a nivel morfofuncional, de la acción cardiotóxica inducida por la Semilla Hindú ® en modelo experimental de embrión de pollo resulta prioritario.

MARCO TEORICO

1.1 ANTECEDENTES.

El conocimiento del recurso vegetal ha sido una meta del hombre desde que éste aparece en la escala zoológica; así la relación planta-hombre es tan antigua como éste mismo. Dicha relación es notable por la gran diversidad de usos que han sido revelados a través de los estudios etnobotánicos, como por ejemplo: alimento, medicina, defensa, construcción, vestido y colorantes. Siendo el término natural un concepto que resulta seductor en muchos sentidos; suelen elogiarse sus ventajas en distintos niveles, entre ellos la salud, ofreciéndose como una opción terapéutica casi milagrosa en el tratamiento de diversas enfermedades. Resulta común haber oído o recibido alguna recomendación de los denominados “remedios natural”, sea este comercial o no. Sin embargo, las plantas también pueden contener sustancias nocivas que ocasionan trastornos en el ser humano, los cuales van desde irritación, comezón y quemaduras en la piel, hasta vómitos, diarreas, coma e incluso la muerte.

Se les llama plantas tóxicas, a todas aquellas plantas que contienen algunas sustancias químicas capaces de producir algún tipo de trastorno en la salud del ser humano o animal que la ingiera; las cuales se encuentran dispersas, en cuanto a su hábitat y a sus relaciones botánicas.

En general, las plantas contienen más de veinte especies tóxicas entre alcaloides, glucósidos, saponinas, resinoides, oxalatos, compuestos fotosensibilizadores y ciertos minerales, que toman del suelo y se van acumulando. Los compuestos tóxicos per se,

pueden estar en un vegetal distribuidos por todas las partes de la planta o acumularse más en unos lugares que en otros, como la raíz, las hojas o semillas.

La importancia de la ingestión de una planta determinada, dependerá de diversos factores, tales como: la toxicidad potencial de la planta ingerida, parte que utilizó (hoja, fruto, raíces, semillas, etc.), cantidad y forma de preparación (cruda o cocida, molida o no). Así como también, de la cantidad de toxina ingerida en una unidad de tiempo, siendo estas determinadas por muchos factores entre los que destacan, el ciclo de la planta, condiciones ambientales, así como el estado fisiológico del individuo o animal que la ingiera. Cabe destacar, que existen plantas que contienen sustancias que al penetrar en el organismo provocan reacciones nocivas que causan lesiones leves o graves como la muerte (Bruneton, 2001).

Ahora bien, las plantas peligrosas gozan de una amplia distribución en bosques, campos, pantanos, regiones secas, bordes de caminos y parques, estas crecen tanto de manera silvestres como cultivadas. Muchas plantas ornamentales comunes, tales como: la apocináceas, campanita, belladona, linaza, tártago, son muy conocidas por sus efectos ya que han causado cuadros clínicos de interés toxicológico en individuos, que van de leves a severos, dependiendo fundamentalmente de la cantidad de sustancia ingerida. Así mismo, las semillas o infusiones de hierbas que consumen algunas personas para bajar de peso, en otras regiones constituyen un método habitual de autointoxicación con fines suicidas y con un elevado índice de mortalidad. Este es el caso particular de la *Thevetia peruviana*, perteneciente esta a la familia de la Apocynaceae, planta de gran belleza con fines ornamentales y con elevados riesgos a su exposición con otros fines (Singh y col. 2012).

La apocinácea pertenece a una numerosa familia, con más de 180 géneros y 1.300 especies es característica de la zona intertropical. En Europa se encuentra representada por dos especies comunes, pervincas (*Vinca minor* L., *V. mayor* L.), por una especie mediterránea adelfa planta ornamental que se refiere a dos especies de plantas, *Nerium oleander* (adelfa común) y *Thevetia peruviana* (adelfa amarilla). (Bruneton, 2001).

Esta última, conocida comúnmente como retama, cultivada en zonas tropicales y subtropicales, originaria de América tropical. Es considerada como un árbol ornamental con una altura promedio de 2 a 5 metros de altura, sus hojas son de color verde, más oscuras en la cara superior, varían de linear a lanceoladas, miden 15 centímetros con nerviaciones secundarias pinnada y densa estrechas (8-14x 0.5-0.8 cm), posee flores solitarias amarillas a naranja, de formas campanulada y de él se obtiene un fruto carnoso pequeño de color verde y al madurar se torna negro, del tamaño de una ciruela, tiene un hueso muy duro de color amarillento; triangular que se encuentra comprimido lateralmente en forma de almeja, en cuyo interior hay de dos a cuatro semillas con cotiledones oleoso (las hojas primordiales constitutivas de la semilla y se encuentran en el germen o embrión). (Fig. 2). (Bruneton; 2001; Ravindra y col., 1990; Eddleston y col., 2000; Martínez y col., 2002; Morales, F., 2005; Villar y col., 2006; Torres, 2009, Singh y col, 2012). La *Thevetia* ha sido introducida y aclimatada en la mayor parte de las regiones tropicales de Asia y África.

En África del Sur se ha vuelto una planta de la comúnmente denominada maleza y ha sido extensamente distribuida a través de las regiones de climas más templados (Bruneton, 1999; Van y col., 2002). Se encuentra naturalmente en México y en las partes nortañas de América del Sur; al igual que en algunas zonas de Australia. (Henderson,

2001). El origen de esta planta es incierto y se conoce que se adapta bien a los climas donde hay sequías, es un arbusto que se puede encontrar en jardines y parques públicos.



a. Hojas y flor.



b. Hojas y fruto.



c. Corte transversal del fruto.



d. Semilla.

Figura 2. “*Thevetia peruviana*”. a. Hojas y flor; b. Hojas y fruto; c. Corte transversal del fruto; d. Semilla. Fotografías tomadas por Sequera Diana. 2008.

La información taxonómica de la *Thevetia peruviana* ha sido descrita por (Pers.) K. Schum, tabla I.

Información taxonómica de la *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum.

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida (Dic.)
Orden:	Gentianales
Familia:	Apocynaceae
Nombre científico:	<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum.
Nombres comunes:	Chirca.
Referencia de publicación de la especie:	Nat. Pflanzenfam 4(2): 159. 1895.
Historia taxonómica:	Cerbera thevetia L., Sp. Pl. ed. 2. 304. 1762. Cerbera peruviana Pers., Syn. Pl. 1: 267: 1805. Thevetia thevetia (L.) Millsp., Field Mus. Bot. 2: 83. 1900.
Descripción diagnóstica:	Arbusto de 2 a 5 m de alto, tronco corto, ramas glabras. Hojas membranosas, linear-lanceoladas, de 3 a 15 cm de largo por 4 a 11 mm de ancho, agudas, atenuadas en la base, glabras, venación secundaria escasa o inconspícua, pecíolo de 3 a 9 mm de largo, glandular en las axilas. Inflorescencia cimosa, terminal o axilar, de 1 a 5 flores, pedúnculo menor a 1.2 cm de largo, pedicelo de 2 a 3.5 cm de largo, bracteolas deltoides, de 3 a 4 mm de largo; lóbulos del cáliz ovados o elongado-deltoides, de 6 a 9 mm de largo, con muy pocas glándulas de (3 a 7); corola infundibuliforme, amarilla, tubo de 1 a 1.8 cm de largo, esparcidamente piloso en el interior, cerca de los estambres, lóbulos obovado-dolabriformes, de 3 a 4.5 cm de largo, más o menos erectos; estambres insertos, anteras de 1.5 a 2 mm de largo, nectario de más o menos la mitad de la longitud del ovario.

Tabla I. “Información taxonómica de la *Thevetia peruviana*.” Tomado de *Thevetia peruviana* (Pers) K. Schum. por Morales, y col ., (2001).

En algunas regiones del mundo, las plantas son las principales causantes de grandes problemas clínicos capaces de causar una gran tasa de mortalidad. Estudios químicos y farmacológicos, (Langford y col., 1996; Aular y col., 2003) han demostrado que la *Thevetia*, particularmente la hoja contiene alta concentración de cardenólidos (glucósido cardíaco), compuesto parecido estructuralmente y de acción similar a los digitálicos, capaces de inhibir la bomba de Na^+/K^+ del plasmalema en fibras cardíacas y producir efectos inotrópicos positivos en hombres y animales. (Langford y col., 1996; Aular y

col., 2003; Eddleston y col 2003; Villar y col., 2006). Así como también, toxicidad a nivel gastrointestinal y uterino, cambios en Electrocardiograma (ECG), bradicardia y bloqueo Aurículo-Ventricular (A-V) en humanos, mientras que en animales de experimentación solo se ha observado la presencia de retención urinaria y cambios en ECG (Martínez y col., 2002). Entre los signos y síntomas se incluyen diarreas, dolor abdominal y palpitaciones. (Saravanapavananthan y Ganeshamoorthy, 1988).

Los efectos clínicos presentados por la ingesta de mencionada semilla, se asemejan a la intoxicación por digitálicos, como los síntomas gastrointestinales y cardíacos de intensidad variable, produciendo irritación local de las mucosas y de la boca seguida por náuseas y vómitos, posterior a varias horas de la ingesta (Brewster, 1986; Eddleston y col., 1999; Eddleston y col., 2000).

En resumen, las manifestaciones clínicas por la ingesta de la semilla de la *Thevetia peruviana* se pueden sintetizar de la siguiente manera: vómito (68.2%), cambios en el ECG (61.8%), Bloqueo A-V (52.4%), bradicardia (49.5%), desvanecimiento y mareos (35.9%). Las manifestaciones menos comunes incluyen: depresión de la curva ST (23.8%), diarrea (22.3%), dolor abdominal (5.9%), palpitaciones (7.0%). Aproximadamente un 13% de los casos son asintomáticos. La misma posee una acción estimulante directa en los músculos lisos del intestino, útero y las paredes de los vasos sanguíneos (Watt, 1962; Eddleston y col., 2000).

Entre otros casos reportados de gran relevancia se encuentra que las intoxicaciones fatales producto de la ingesta de la *Thevetia peruviana* (Brewster, 1986; Saraswat, 1992), se remonta a los años de 1981 y 1983 donde se produce el primer caso de intoxicación en Jaffna, Sri Lanka (Eddleston y col., 2003). Así mismo, varias

intoxicaciones accidentales han sido reportadas en Australia durante los años de 1972-78, al igual que en Texas en el año de 1994 (Martínez y col., 2002).

Otros estudios indican, que la ingesta de una o dos semillas causarán sólo dolor gastrointestinal; mientras que tres o más semillas llevarán a un dolor cardíaco severo que podría conducir a la muerte de quien la ingiera (Bruneton, 1999; Langford y col., 1996; Mallick, 1984). Debido a su potente acción, en algunos países del mundo es empleada para intentos de suicidio, homicidios y abortos (Eddleston y col., 1999). Así mismos, se ha reportado la muerte de personas que han utilizado la semilla para suicidio, se produce por un bloqueo (A-V) precedido de vómitos y mareos (Eddleston y col., 1999; Eddleston y col., 2000).

Sin embargo, las semillas de *Thevetia*, se utilizan extensamente en México y Venezuela para reducir el peso corporal de personas. En Venezuela se han reportado algunos casos de intoxicaciones, los cuales han sido abordados desde el punto de vista clínico, por la ingestión de las referidas semillas, particularmente un estudio sobre la intoxicación por la administración de tabletas de *Thevetia peruviana* como tratamiento para bajar de peso, el cual describe el caso clínico de una paciente femenina de 32 años de edad, quien ingirió tabletas de “Semilla Hindú proveniente de la venta ilícita” indicadas como tratamiento para bajar de peso y dos horas tras la administración, la paciente presentó parestesia generalizada, náuseas, vómitos, hipocalemia, alteraciones electrocardiográficas, bradicardia, diferentes grados de bloqueo A-V, reacción anafiláctica y edema de glotis (Aular y col., 2003).

La sintomatología presentada por esta paciente, después de dos horas de la administración de las tabletas (alteraciones de la conducción nodal y A-V, náuseas, vómito y diarrea) son similares a las referidas por otros investigadores.

(Saravanapavananthan y Ganeshamoorthy, 1988; Eddleston y col., 2000; Maringhini y col., 2002).

Ahora bien cabe destacar que, son pocos los estudios toxicológicos sistematizados en animales expuestos a la semilla de la *Thevetia peruviana*. Sin embargo, se han realizado experimentaciones donde la administración oral de la semilla, se acompaña por síntomas como: temblores, inquietud, relajación muscular, taquipnea, retención urinaria, alteraciones a nivel cardíaco como arritmia, cambio de voltaje, fibrilación cardíaca (Martínez y col., 2002). Otros estudios, han reportado: taquicardia, arritmias, parálisis, ataxia y desorientación (Oji y col 2000).

A pesar de los numerosos reportes encontrados que vinculan la acción tóxica de la planta de la *Thevetia peruviana* con el mecanismo de acción de los conocidos glucósidos cardíacos, hasta donde conocemos, no está claramente establecida la etiología de la disfunción cardíaca, tisular y celular, de la acción toxica producida por la mencionada semilla proveniente de la planta.

1.2 Modelo Experimental de Embrión de Pollo.

El embrión de pollo ha sido utilizado en innumerables investigaciones, como modelo experimental, desde la época de los antiguos egipcios hasta la actualidad. A través de este modelo experimental se han demostrado importantes teorías y procesos biológicos en diferentes áreas, tales como: la biología del desarrollo, la bioquímica, la inmunología, la teratología, la toxicología, la virología, la genética y la oncología (Stern, 2005). Ha sido empleado para evaluar los efectos farmacológicos y toxicológicos de diversas drogas (Sugiyama y col., 1996). Las principales características, que han hecho al embrión de

pollo un excelente modelo experimental son: su fácil obtención y mantenimiento en condiciones de laboratorio, la obtención rápida de respuestas celulares y su rápido desarrollo embrionario (Stern, 1997).

Debido al tamaño y a el desarrollo temprano del embrión de pollo este ha sido utilizado en los estudios de biología del desarrollo, ya que es relativamente sencilla la identificación y disección de órganos para el establecimiento de cultivos celulares específicos. Adicionalmente, posee una alta tasa de proliferación de células embrionarias de pollo, el establecimiento de cultivos primarios es relativamente sencillo y efectivo (Freshney, 2004).

En 1913 Carrel demostró la posibilidad de mantener en cultivo células extraídas de un animal, embrión de pollo, durante un período de tiempo superior de la vida de éste.

El pollo es una especie que merece la atención en cuanto a la fisiología de desarrollo del sistema cardiovascular (Sugiyama y col., 1996). El atractivo del embrión del pollo como un modelo experimental para estudiar la angiogénesis (Adair y col., 1990), formación del corazón (Haring y col., 1970) y el desarrollo neurohumoral del sistema cardíaco (Higgins y col., 1981) se ha reconocido durante mucho tiempo. Estudios recientes han mostrado que el embrión del pollo, puede usarse para estudiar los cambios de desarrollo en el tono vascular local y el mando hemodinámico (Ruitjtenbeeh y col., 2002).

Siendo el corazón un órgano principal del sistema circulatorio, propulsor de la sangre en el interior del organismo a través de un sistema cerrado de vasos los sanguíneos. (Gayton y Hall, 2011). El corazón de pollo al igual que el de mamíferos está compuesto por cuatro cavidades, estas son las aurículas derechas e izquierdas y los ventrículos derecho e izquierdo, a través de los cuales la sangre es bombeada. En el embrión de pollo, este órgano se encuentra histológica y morfológicamente desarrollado desde los 3 días de

desarrollo; encontrándose además que los electrocardiogramas a partir de este estadio son iguales a los del adulto (Balinsky, 1978; Carlson, 1990; Gilbert, 2000). Desde el punto de vista histológico el corazón humano se divide en: 1) El epicardio, que consiste en una capa de células mesoteliales en la superficie externa del corazón y su tejido conjuntivo subyacente. Es aquí donde se encuentran los vasos sanguíneos y los nervios que irrigan e inervan al corazón. 2) El Miocardio, está conformado principalmente por tejido muscular. En los ventrículos el miocardio es más grueso que en las aurículas, debido a que son los ventrículos las cavidades cardíacas que se encargan del bombeo de la sangre hacia el resto del organismo. 3) El endocardio, consiste en una capa interna de endotelio y tejido conectivo subendotelial, una capa media de tejido conectivo y células musculares lisas y una capa externa de tejido conectivo, también llamada capa subendocárdica (Ross y col., 2005).

Una vez descritas las divisiones del corazón, es conveniente explicar el desarrollo del corazón en el feto humano y del embrión de pollo para ver sus similitudes. El corazón se origina en la fusión de la vena y arteria principal del embrión, en la cavidad torácica. Su formación se produce por etapas como se muestra en la tabla II.

El desarrollo embrionario del corazón se inicia en la tercera semana de vida. Durante el período somático, que concluye a fines del primer mes, el esbozo cardíaco se mantiene como un órgano tubular. En las dos semanas siguientes aparecen todas las estructuras septales, que forman un sistema discontinuo, de manera que el corazón durante esta fase es un órgano parcialmente tabicado. La septación se completa en la última semana y media del desarrollo (Moore y Dalley., 2007).

Desarrollo del feto humano

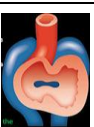
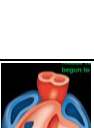
Representación Gráfica	Características
	Tercera semana luego de la concepción los tubos se unen.
	Luego de Fusionarse se forma una sola cámara continua.
	A la cuarta semana de embarazo, la diminuta bolsa de músculo se ha plegado y ha comenzado a latir.
	Al iniciarse la quinta semana, la cámara superior, la aurícula se divide en dos. Cada aurícula se conecta con el ventrículo del mismo lado para crear dos bombas
	A las ocho semanas, luego de formarse el tabique del centro, el corazón consta de cuatro cámaras separadas. Además bombea sangres desde y hacia la placenta por el cordón umbilical, recogiendo oxígeno y botando los desechos.

Tabla II. “Desarrollo del feto humano.” Disponible en: <http://www.icarito.cl> revisión realizada enero (2009).

La reorganización que experimenta el tubo cardíaco consiste básicamente en tres procesos, que tienen lugar en el extremo venoso, en el arterial y en el segmento ampular. Estos procesos se realizan después que el tubo cardíaco ha adoptado la forma de un asa dispuesta en el plano frontal.

Con respecto al desarrollo del corazón del embrión de pollo, al principio el corazón es un tubo casi recto y no se encuentra subdividido en sus diversas cámaras. Luego, se curva de una manera característica. Comenzando por detrás, primero está dirigido hacia adelante, luego se curva hacia abajo y hacia la derecha, y por último hacia arriba y hacia

adelante. De esta manera el corazón se arrolla en forma de S (Fig. 3). El esbozo tubular del corazón se constriñe en algunos lugares y se dilata en otros, subdividiéndose así en sus cuatro partes principales, el atrio que se desarrolla en el extremo de la primera inflexión de corazón, la parte descendiente, situado entre la inflexión primera y la segunda, se convierte en el ventrículo, y la parte situada delante de la segunda inflexión forma el cono arterial (Balinsky, 1978).

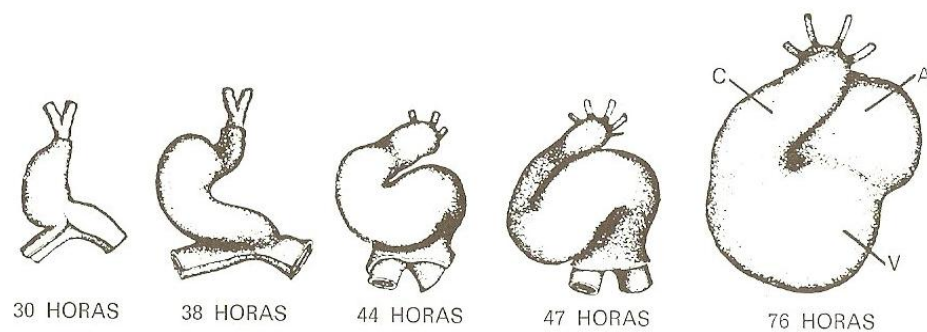


Figura 3. “Retorcimiento del esbozo del corazón de un embrión de pollo (vista ventral)”. A, atrio; V, ventrículo; C, cono arterioso. (Balinsky, 1978)

En conclusión, tanto el desarrollo del corazón del embrionario humano con del pollo presentan las siguientes características:

1. El corazón se forma a partir de un esbozo par, que se une en la línea media, secundariamente.
2. Cada mitad del esbozo del corazón puede diferenciarse incluso antes de que fusionen las dos mitades.
3. Dos esbozos del corazón pueden fusionarse dando un órgano de estructura normal.
4. El funcionamiento del corazón se inicia en una fase temprana del desarrollo.

Siendo el corazón un músculo hueco, que actúa como bomba doble de succión y presión, autoajustables, cuyas partes trabajan al unísono con el fin de propulsar sangre a todas las partes del cuerpo (Moore y Dalley., 2007). Se encuentra ubicado prácticamente en medio del tórax (mediastino), entre los dos pulmones, encima del diafragma, delante de la columna vertebral separado de las vértebras por el esófago y la aorta, por detrás del esternón, así como también, de los cartílagos costales (Latarjet y col., 1983; Moore y Dalley., 2007; Fox., 2003). El corazón se fija por medio de los grandes vasos que salen y llegan a él. Está formado por un músculo con propiedades muy particulares el miocardio, tapizado interiormente por el endocardio y exteriormente por el epicardio. Así mismo, se encuentra envuelto por el pericardio, donde la capa externa del pericardio rodea el nacimiento de los principales vasos sanguíneos del corazón encontrándose unida a la espina dorsal, al diafragma y a otras partes del cuerpo por medio de ligamentos (Latarjet y col., 1983; Moore y Dalley., 2007).

El corazón se divide en dos mitades laterales, que son el corazón derecho, en la que circula la sangre venosa y el corazón izquierdo, en la que circula la sangre arterial. Este posee cuatro cámaras, aurículas y ventrículos derechos e izquierdos respectivamente; su acción de bombeo crea el frente de presión necesario para impulsar la sangre a través de los vasos sanguíneos a los pulmones y las células del organismo (Fox, 2003; Moore y Dalley., 2007). La acción de bombeo sincronizado del corazón es realizada por las dos bombas auriculoventriculares que producen el ciclo cardíaco (Moore y Dalley., 2007).

Ciclo que se inicia cuando el corazón se distiende (diástole) atrayendo hacia él la sangre que corre por las venas y cuando se contrae (sístole), este expulsa la sangre hacia las arterias: aorta o arteria pulmonar (Latarjet y col., 1983). Es importante destacar, que los sonidos del corazón son producidos por el golpeteo de cierre de las válvulas

unidireccionales que normalmente evitan que la sangre refluya durante las contracciones del corazón (Moore y Dalley., 2007).

Debido a su complejidad el análisis del sistema cardiovascular, es una rama de la ingeniería por la cual puede predecirse y comprenderse el comportamiento de sistemas complejos, cuantificando la función de cada componente y la relación entre las partes del sistema, el sistema circulatorio de un embrión humano de 20 somitas (Fig. 4), está reconstruido de los vasos sanguíneos de un embrión joven.

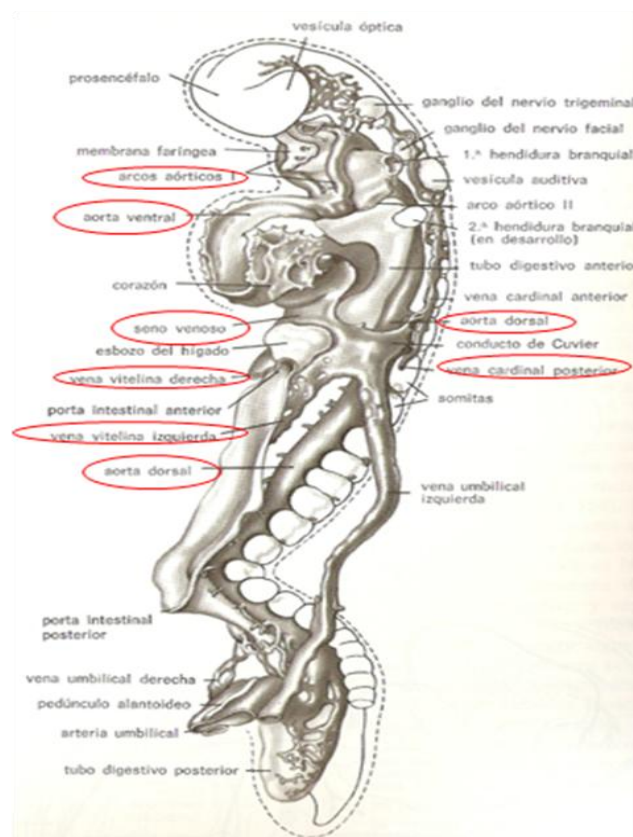


Figura 4. “Sistema circulatorio de un embrión humano de 20 somitas” (Balinsky, 1978).

La determinación del corazón tiene lugar en una fase temprana del desarrollo y por tanto, presenta un alto grado de autonomía en su diferenciación ulterior. Los vasos sanguíneos que forman la continuación (par) del tubo del corazón se desarrollan también

anterior y posteriormente, junto con las partes endodérmicas. Siendo los dos vasos posteriores las venas vitelinas, que recoge la sangre de la red existente en la superficie del intestino y, en los amniotas, forman la red del saco vitelino (Balinsky, 1978).

Las prolongaciones anteriores del tubo del corazón son las aortas ventrales, que se comunican con las aortas dorsales que son un par de vasos sanguíneos (Balinsky, 1978).

En cuanto al desarrollo embrionario del pollo se presentan características similares en la fase 15 que va de 50 a 55 horas de edad (Fig. 5).

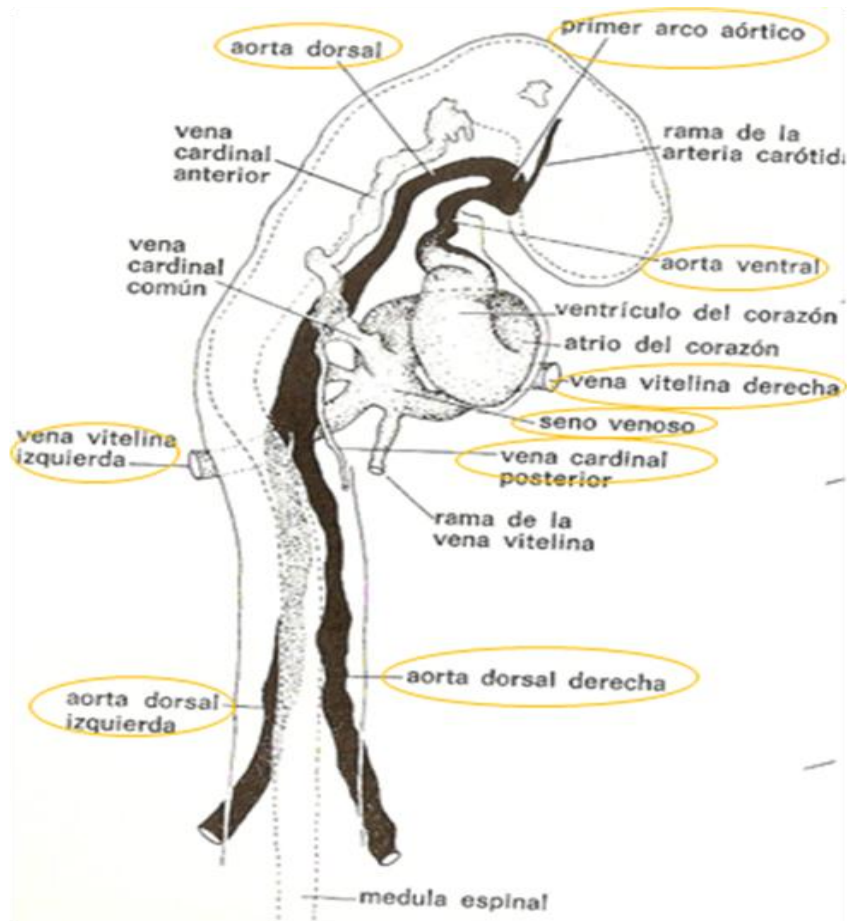


Figura 5. “Embrión de pollo, fase 15 (de 50 a 55 horas de vida)” (Balinsky, 1978).

En la fase 15 el sistema de los vasos sanguíneos ha experimentado un marcado desarrollo. El corazón es un órgano grande y prominente situado debajo de la cabeza. Una aorta ventral par conduce la sangre hasta el primer par aórtico, que son todavía los únicos que transportan la sangre. Las aortas dorsales son pares en su parte anterior y en su parte posterior, pero están fusionadas en la región media. Las venas cardinales anteriores están bien desarrolladas, pero las venas cardinales posteriores son pequeñas. La circulación en el saco del vitelino se realiza mediante grandes venas vitelinas que unen el seno venoso y las arterias vitelinas, las cuales en esta fase son continuaciones directas de las aortas dorsales (Balinsky, 1978). Realizando una observación detallada de las figuras 4 y 5, desde el punto de vista estructural el desarrollo embrionario es similar, al igual que el funcionamiento del sistema cardiovascular, en estas etapas embrionarias. Ahora bien, el músculo cardíaco posee los mismos tipos y organizaciones de filamentos contráctiles que el músculo esquelético. En consecuencia, las células musculares cardíacas y las fibras que forman poseen estriaciones transversales que son evidentes con cortes histológicos de rutina. Además, las fibras musculares cardíacas exhiben bandas cruzadas bien teñidas, a las cuales se les denominan discos intercalares, los cuales son sistemas de unión que asocian a las células musculares cardíacas para formar las fibras del miocardio, estos discos también atraviesan las fibras en forma lineal (Gayton, 1976; Ross y col., 2005). Dichos discos son sitios de adhesión muy especializados entre células contiguas. Esta adhesión célula-célula lineal de las células musculares cardíacas produce “fibras” de longitudes variables, las cuales están compuestas por muchas células cilíndricas unidas extremo con extremo (Ross y col., 2005).

Es importante destacar, que el corazón es el órgano que más oxígeno extrae de la sangre y trabaja en condiciones basales prácticamente al máximo de su capacidad extractora. Cualquier aumento en las necesidades de oxígeno del miocardio sólo puede ser satisfecho con un aumento paralelo en el aporte de flujo a través de las coronarias. En diástole, cuando se cierra la válvula aórtica los senos de Valsalva funcionan como reservorios y permiten la perfusión del miocardio. Las grandes arterias epicárdicas ofrecen muy poca resistencia al flujo y se comportan como vasos de conducción. De las arterias epicárdicas salen vasos que penetran la pared muscular, produciendo en las arteriolas una caída de presión, por lo que son vasos de resistencia. La red de arteriolas es muy densa, con aproximadamente 4.000 capilares/mm los esfínteres precapilares permiten la regulación del flujo según las distintas necesidades; siendo una de las variables de gran importancia la presión de perfusión (Fox, 2003; Moore y Dalley., 2007).

Debido a lo anteriormente planteado se puede concluir, que la función fundamental de la circulación es servir como sistema de perfusión. Casi todas las formas de enfermedad cardiovascular producen, en última instancia, sus importantes efectos limitando la perfusión y, en consecuencia, el transporte, ya sea en reposo o durante actividades que aumenten la demanda de perfusión. En algunos casos ocurre una perfusión reducida a nivel local o regional. Mientras que en otros, el volumen mínimo cardíaco y su capacidad están limitados a la volemia insuficiente, enfermedades valvulares o congénitas, alteraciones del ritmo, enfermedades del miocardio relacionadas con la hipertrofia del mismo (Smith y col., 1998).

1.2 Patología Celular Por Acción Tóxica.

La célula normal está limitada a un abanico bastante estrecho de función y estructura por sus programas genéticos de metabolismo, diferenciación y especialización; por las restricciones de las células de la vecindad o por la disponibilidad de sustratos metabólicos. Sin embargo, es capaz de responder a las demandas fisiológicas normales, manteniendo un estado estable. La perturbación de la homeostasis normal de la célula hace que se produzcan diversos acontecimientos (Trump y col., 2001).

La alteración de la homeostasis se puede desencadenar como producto del estrés fisiológico y algunos estímulos patológicos dando lugar a un gran número de adaptaciones celulares fisiológicas y morfológicas, durante los cuales se alcanzan nuevos, pero alterados, estados estables, que preservan la viabilidad de la célula y modulan su función según responde a tales estímulos (Trump y col., 2001; Sharon y col., 2004).

En caso de que los límites se sobrepasen de la respuesta adaptativa a un estímulo, o en ciertas situaciones cuando la célula está expuesta un agente lesivo o a estrés, se genera la lesión celular reversible hasta cierto punto, pero si el estímulo persiste o es lo suficientemente intenso, las células alcanzan un punto de no retorno sufriendo una lesión celular irreversible lo que conlleva a la muerte celular (Trump y col., 2001; Mitchell y col., 2003).

Diferentes tipos de estrés pueden inducir cambios celulares y tisulares distintos. Tales como las referidas a los procesos de adaptación celular de crecimiento y diferenciación entre las que destacan la hiperplasia e hipertrofia (Mitchell y col., 2003).

La hiperplasia se encuentra relacionada con aumento en el número de células en un órgano o tejido que resulta de un aumento de la división celular, dando lugar habitualmente a un aumento del volumen del órgano o tejido (Sharon y col., 2004). Mientras que la hipertrofia se refiere a un aumento en el tamaño de las células sin división celular, lo que da lugar a un aumento en el tamaño del órgano (Sharon y col., 2004). El aumento del tamaño de las células se debe a la síntesis de más componentes estructurales producida por un aumento de la demanda funcional o por estimulación hormonal específica. Este mecanismo implica muchas vías de transducción de señal, dando lugar a la inducción de un número de genes que, a su vez, estimulan la síntesis de numerosas proteínas celulares.

Cabe destacar, que en el corazón existen dos grupos de señales: los desencadenantes mecánicos como la distensión, y los desencadenantes tróficos, tales como los factores de crecimiento polipeptídicos y los agentes vasoactivos.

En este mismo orden de ideas, la lesión celular es el resultado de un estrés celular tan intenso que las células ya no son capaces de adaptarse o de una exposición celular a agentes inherentemente lesivos y puede progresar a través de un estadio reversible y culminar con la muerte celular (Mitchell y col., 2003).

Con el daño continuado, la lesión se hace irreversible, en cuyo momento la célula no puede recuperarse, sufren invariablemente cambios morfológicos que se reconocen como muerte celular. Existen dos tipos de muerte celular, la necrosis y la apoptosis.

Es importante destacar, que existen diversas causas por las cuales un órgano o tejido puede sufrir una lesión a nivel celular entre las que encontramos:

1. Privación de oxígeno. La hipoxia es una deficiencia de oxígeno que produce lesión celular reduciendo la respiración aeróbica oxidativa (Mitchell y col., 2003; Mindan, 1998).
2. Agentes físicos, incluyen el traumatismo mecánico, las temperaturas extremas (quemaduras y frío intenso), cambios súbitos en la presión atmosférica, radiación, entre otros (Sharon y col., 2004).
3. Agentes químicos y fármacos. Los productos químicos simples como la glucosa o la sal en concentraciones hipertónicas pueden producir lesión celular directamente o alterando la homeostasia electrolítica de las células. Incluso el oxígeno, en concentraciones altas, es altamente tóxico. Sustancias tóxicas como el arsénico, cianuro o sales de mercurio. Contaminantes ambientales, insecticidas o herbicidas, riesgos industriales u ocupacionales, como el monóxido de carbono, asbesto, alcohol, narcóticos y la variedad de drogas terapéuticas (Mindan, 1998; Florez y col., 2004).

Ahora bien, una vez planteada las diversas causas a través de las cuales se puede desencadenar una lesión celular es necesario hacer referencia a los mecanismos de lesión celular.

La respuesta celular a los estímulos lesivos depende del tipo de lesión, su duración, intensidad y sus consecuencias dependen fundamentalmente del tipo, estado y adaptabilidad de la célula lesionada. Así, dosis pequeñas de una toxina pueden inducir una lesión reversible, mientras que dosis grandes podrían dar lugar a muerte, o la exposición de dos individuos a la misma dosis, puede no producir efecto en uno y muerte celular en el otro.

1.3 Justificación.

El deseo de utilizar remedios vegetales se traduce generalmente en recurrir a los productos comerciales disponibles en las farmacias, en los comercios de productos dietéticos, en los mercados o en las ventas por correspondencia. En algunas ocasiones el consumidor, utiliza la planta que colecta incurriendo en ciertos errores, como los son equivocarse sobre su identidad o ignorar el peligro que corren.

Siendo el error de identidad de la planta una de las causas más frecuente de las intoxicaciones, bien sea, por parte del consumidor o por alguna persona de su entorno que la ha colectado. Así mismo, puede deberse a las recomendaciones realizadas por curanderos o personal que vende productos naturales.

El otro factor de interés, es la ignorancia del peligro, en este caso la víctima es capaz de identificar la planta y las propiedades que se le atribuyen, pero ignora que puedan ser peligrosas. En el caso de los productos comercializados, el primer problema es el de los efectos secundarios que presenta su consumo más o menos regular. Este problema de los efectos no deseados de producto a bases de plantas es objeto de revisiones y acuerdos, así como de publicaciones.

Los efectos adversos de las plantas medicinales es un riesgo difícil de apreciar, este no es de la misma naturaleza con las especialidades a base de extractos que han sido objetos de evaluaciones toxicológicas y clínicas o con fitomedicamentos. Otra cosa son las plantas enteras y los extractos, lo que dependerá de la vía y forma de administración.

Es frecuente que se utilicen la tradición y el conocimiento acumulado durante generaciones con el fin de justificar la actividad y la inocuidad de algunas plantas. Claro está, que parte de ese conocimiento se justifica con propiedades farmacológicas y

clínicas, lo que no garantiza la ausencia de la toxicidad, siendo la diferencia entre un medicamento o tóxico, la dosis.

El mayor problema que se plantea es, sin duda, el de su origen y el de su distribución, ya que es procedente de medios no farmacéuticos, pueden estar mal identificados, contaminados o falsificados. En general su contenedor no presenta ninguna precisión en cuanto a su exacta composición, a su modo de empleo, a las precauciones a observar y a las dosis recomendadas. Además de las posibles interacciones por el consumo de medicamentos convencionales.

En Venezuela el consumo de la Semilla Hindú ®, ha sido empleada de manera indiscriminada por la población femenina para el control de peso, no existiendo evidencias que justifique su uso en terapéutica y garantice un margen de seguridad apropiado, ya que el mismo no posee registro sanitario, que avale el consumo de ésta en la población representando a la vez un problema de salud pública.

Es importante destacar, que el mencionado producto penetra en el mercado venezolano de manera ilegal, aunado a esto posee gran publicidad lo que ha incrementado su venta y consumo. Existe una gran cantidad de publicidad donde se presentan innumerables beneficios, como consecuencia del consumo de ésta, entre los que destacan: la reducción de peso a través de la eliminación de la grasa del cuerpo; control del estreñimiento, el control de comer y de fumar; disminución considerable de la celulitis y colesterol; limpia los intestinos, baja el ácido úrico; es un excelente diurético, purifica el organismo en general; tonifica la piel; regulador de la tensión y controlador de la diabetes. Debido a las propiedades anteriormente mencionadas, la conocida Semilla Hindú ® proveniente de la venta ilícita, ha sido consumida por una gran parte de la población venezolana,

reportándose hasta ahora varios casos de intoxicación sobre todo en la población femenina.

1.4 Hipótesis.

Si el consumo de Semilla Hindú® se encuentra vinculado con efectos colaterales demostrados a nivel clínico, particularmente comprometiendo el sistema cardiovascular. Entonces, el abordaje experimental de la acción cardiotóxica, hasta el momento poco entendida, podría arrojar señales de daño tisular, celular y funcional del órgano cardíaco, que permita entender los posibles mecanismos de dicha acción tóxica.

OBJETIVOS

2.1 Objetivo General.

Evaluar a nivel morfofuncional la acción cardiotóxica inducida por el extracto acuoso de la Semilla Hindú® (*Thevetia peruviana*), en modelo experimental de embrión de pollo.

2.2. Objetivos Específicos.

1. Identificar las características taxonómicas de la Semilla Hindú®, empleando como patrón de referencia la planta *Thevetia peruviana* ubicada en la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales (FACES) de la Universidad Central de Venezuela.
2. Identificar los elementos químicos presentes en diferentes extractos de la Semilla Hindú®, a través de las técnicas instrumentales Ultravioleta Visible y Fotocolorimetría.
3. Determinar la dosis tóxica (DT) y dosis letal cincuenta (DL50) del extracto acuoso de la Semilla Hindú®, en embriones de pollo de cuatro (04) y doce (12) días de desarrollo.
4. Evaluar la toxicidad aguda del extracto acuso de la Semilla Hindú®, en un bioensayo en embriones de pollo con dosis estimadas, en función al peso promedio.

5. Determinar el efecto de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de Semilla Hindú®, sobre las células cardíacas embrionarias de cultivos primarios en gota pendiente.
6. Evaluar con Acustocardiograma (ACG) y Cardiovideograma (CVG) en embriones de pollo, la toxicidad experimental inducida por extracto acuoso de Semilla Hindú®.
7. Evidenciar “*in vivo*” e “*in vitro*” las señales de daños cardíacos tisulares y celulares inducidos por la acción del extracto acuoso de la Semilla Hindú®, a través de inmunohistoquímicas (TUNEL) y marcaje de organelos subcelulares mitocondrias (DiOC13) y lisosomas (naranja de acridina).

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1 Modelo Experimental.

Con el fin de analizar la posible función de cardiotoxicidad ocasionada por el extracto acuoso de la Semilla Hindú®, fueron utilizados embriones de pollo de 41/2, 5, 8 y 12 días de desarrollo, obtenidos luego de incubar huevos fértiles de Gallina Rhodey Island, provenientes de la granja avícola, M. Alfonso, de la región de San Antonio de los Altos, Estado Miranda. Los mismos fueron incubados a 38 °C y 85 % de humedad, en una incubadora Heraeus con ventilación.

3.2 Identificar las características taxonómicas de la Semilla Hindú ®, empleando como patrón de referencia la planta *Thevetia peruviana* ubicada en la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales (FACES) de la Universidad Central de Venezuela.

Con el fin de realizar la identificación botánica de la Semilla Hindú proveniente de la venta ilícita, se contó con el apoyo técnico - científico del personal del Herbario Dr. Víctor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia, Universidad Central de Venezuela. Para lo cual me trasladé a FACES de la Universidad Central de Venezuela, donde colecté de la planta *Thevetia peruviana* silvestre, muestras de sus hojas, frutos y semilla, esta última con el fin de ser comparada física y químicamente con la Semilla Hindú de venta ilícita. Así mismo, se llevó un registro fotográfico de la ubicación y obtención de las hojas, frutos y semillas. Para clasificar la planta y sus semillas, se utilizaron los taxos

básicos y otras características que permiten evidenciar la correspondencia del producto de venta ilícita en estudio con la planta *Thevetia peruviana* silvestre:

Tabla para recolectar los datos referentes a los aspectos taxonómicos de la Semilla Hindú®.

Aspectos Taxonómicos de la Semilla Hindú ®

Reino:	
División:	
Clase:	
Orden:	
Familia:	
Género:	
Especie:	
Nombre común:	
Descripción diagnóstica:	
Frutos:	
Ubicación geográfica:	

Tabla III. Datos referentes a los aspectos taxonómicos de la Semilla Hindú proveniente de la venta ilícita.

3.3 Determinar los elementos químicos presentes, en los extractos alcohólicos y acuosos de la Semilla Hindú ®, a través de las técnicas instrumentales Espectrofotometría UV Visible y Fotocolorimetría.

Para la identificación de las características químicas de la semilla, se utilizaron las siguientes técnicas instrumentales: Espectrofotometría de UV visible y Fotocolorimetría. Con el objetivo de obtener los componentes químicos la semilla tanto del producto de venta ilícita como la del patrón de comparación o semilla silvestre, se utilizaron dos métodos generales de extracción.

3.3.1 Método general de extracción en metanol.

La Semilla Hindú proveniente de la venta ilícita al igual que las semilla silvestre, fue sometidas a un proceso de extracción alcohólica con metanol, en temperatura ambiente y en agitación constante por un tiempo de 45 min, empleando el método recomendado por Omolara y col., 2007.

3.3.2 Espectrofotometría de Ultravioleta – Visible.

La espectrofotometría Ultravioleta – Visible es un método óptico de análisis, que tiene como principio de medición la absorción y/o transmisión de la energía radiante emitida por una fuente de luz, que atraviesa una sustancia. Este método se basa en la medida de la intensidad y de la longitud de onda de la energía radiante (Skoog y col.; 2008).

Este método posee una amplia aplicabilidad, ya que un gran número de especies inorgánicas, orgánica y bioquímicas absorben radiaciones ultravioleta o visible y, por tanto, son aptas para una determinación cualitativa y cuantitativa (Skoog y col.; 2001).

En cuanto a la región ultravioleta, hay que indicar que la zona de mayor interés en la práctica analítica ordinaria es la denominada como ultravioleta cercano (longitud de onda entre 200 y 400 nm), es de gran utilidad en la determinación estructural de insaturación conjugada, aromaticidad o de ciertos grupos insaturados con pares electrónicos libres (carbonilo, nitro, etc.), pues el ultravioleta lejano (de 10 a 200 nm) (Skoog y col.; 2001).

Cabe destacar, que la cuantificación de este método se basa en que cuando un haz de radiación UV-Vis atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz (I_0) es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra es denominada transmitancia (T) ($T = I/I_0$). Por aspectos prácticos, se utilizará la absorbancia (A) en lugar de la transmitancia ($A = -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la Ley de Beer-Lambert: $A = \epsilon \cdot l \cdot c$ (ϵ : coeficiente de absorptividad molar, l : camino óptico, c : concentración de la especie absorbente) (Skoog y col.; 2001; Skoog y col.; 2008; Pino y Pérez.; 1983).

Se empleó un Espectrofotómetro de UV-Visible marca HEWLETT PACKARD modelo 8453 (Fig. 6), para determinar la presencia de bandas de absorción en la región de longitud de onda de 200 nm a 300 nm realizando un barrido en estas longitudes. La muestra en estudio proviene del extracto alcohólico se empleó para realizar análisis por triplicado, por tres días de análisis, para un total de nueve determinaciones en total.



Figura 6. “Espectrofotómetro de UV-Visible marca HEWLETT PACKARD modelo 8453”. Fotografía tomada por Sequera Diana.

3.3.3. Método general de extracción en solución salina ®.

La Semilla Hindú ® al igual que las semilla silvestre, fueron sometidas a un proceso de extracción con solución salina ®, a temperatura ambiente y con agitación constante por un tiempo de 45 min. El cual se denomino extracto acuoso.

3.3.4. Fotocolorimetría.

Se empleo el método de fotocolorimetría, utilizando para tal fin un fotocolorímetro, instrumento que tiene la particularidad de tener celdas fotoeléctricas y un circuito

potenciométrico, además consta de un foco de 110 volts. La colorimetría es un procedimiento de análisis químico basado en la intensidad de color de las disoluciones.

La intensidad del color de un líquido coloreado contenido en un tubo de vidrio depende de la disolución y de la concentración de la sustancia colorante en la disolución.

Con el fin de determinar la concentración de cianuro disponible en la Semilla Hindú proveniente de la venta ilícita y de la semilla silvestre, se utilizó el método fotocolimétrico, empleando un FOTOCOLORIMETRO, marca MERCK, modelo SQ-118, con la siguiente técnica: Determinación de Cianuros Fácilmente Liberables; en primer lugar se comprobó el valor del pH 2-8. En los casos que fuesen necesarios se corrigió el valor de pH (con Hidróxido de Sodio o Ácido Sulfúrico). Se colocó 10 ml de la muestra a analizar en un tubo de ensayo y 10 ml de agua destilada (blanco) en otro tubo de ensayo. A ambos tubos de ensayo se les agregó las siguientes sustancias: 02 microcucharadas del reactivo CN^- 1A y disolver. Luego se añadieron 02 microcucharadas del reactivo 2A y se disolvieron. Posteriormente se añadieron 06 gotas del reactivo 3A en ambas muestras y se mezclaron. Se esperó el tiempo de reacción que corresponde a 5 min y posteriormente se midió la muestra en el fotocolorímetro. Los análisis se realizaron en semillas enteras, divididas en cuartos y a la mitad de la semilla esta última triturada, de las cuales un lote fue sometido a procesos de maceración y otro lote no, para así comparar el contenido de cianuro liberado en éstos, se empleó como patrón de referencia cianuro a concentración conocida. La muestra en estudio proveniente del extracto acuoso se empleó para realizar análisis por triplicado, por tres días de análisis, para un total de nueve determinaciones en total.

3.4 Determinar la dosis tóxica (DT) y dosis letal cincuenta (DL₅₀) del extracto acuoso de la Semilla Hindú®, en embriones de pollo de cuatro (04) y doce (12) días de desarrollo.

Existen muchas formas de determinar la toxicidad, y aunque los efectos bioquímicos, fisiológicos, reproductivos y de comportamiento son de gran utilidad, el indicador comúnmente más utilizado es la muerte del organismo de prueba, los ensayos de toxicidad se usan ampliamente en estudios de toxicología (Fotakis y col., 2006). La mayoría de las pruebas de toxicidad suministran una estimación de la dosis que produce una respuesta tóxica a un nivel del 50%; por ejemplo, la dosis letal media (DL₅₀) es la dosis o concentración que mata al 50% de la población. (Díaz y col., 2004).

Se utilizaron para el bioensayo embriones de pollo de 12 días de desarrollo, obtenidos luego de incubar huevos fértiles de Gallina Rhodey Island, provenientes de la granja avícola, M. Alfonzo, de la región de San Antonio de los Altos, Estado Miranda. Los mismos fueron incubados a 38 °C y 85 % de humedad, en una incubadora Heraeus con ventilación; con pesos que oscilan entre 63 y 68 gramos.

Con el fin de conocer las concentraciones en función al peso promedio de los embriones a utilizar en el experimento, se realizó un bioensayo preliminar, incrementando gradualmente las concentraciones en función al peso promedio en porción geométrica, estableciendo un intervalo de concentraciones relativamente grandes. De acuerdo, con el ensayo preliminar se ajustaron las concentraciones a la dosis letal y tóxica.

Para los ensayos preliminares se preparó una solución madre de la Semilla Hindú ®, en una concentración (1:1) µg/ml en solución de Solución salina al 0,9%. Se realizaron seis

diluciones siguiendo una progresión geométrica sin espaciamentos constantes. Cada dosis fue ensayada en lotes de 5 embriones inoculando 0,5 ml de la solución en estudio en la cámara de aire del huevo.

La dosis letal media (DL₅₀) se determinó mediante el método de Spearman & Karber, es un método aproximado, no paramétrico, propuesto por la OMS en 1981, inoculando en la cámara de aire de huevo un volumen de 0,5 ml de diluciones seriadas del extracto acuoso de Semilla Hindú® cercanas a la dilución de trabajo encontrada en los ensayos preliminares.

Se evalúa la mortalidad cada 1 hora y hasta el término del bioensayo (3 horas), haciendo anotaciones sobre el número de organismos afectados (que se observan como falta de movilidad, determinada con el empleo de un ovoscopio, el cual posee un haz de luz que atraviesa el huevo y permite visualizar el movimiento del mismo). A su vez esta observación permite determinar la toxicidad aguda causada en los embriones tratados.

3.5 Determinar el efecto de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de Semilla Hindú®, sobre las células cardíacas embrionarias de cultivos primarios en gota pendiente.

El método de cultivo celular “*in vitro*”, consiste en la obtención de una monocapa celular a partir de un fragmento de tejido (explante) en oposición a la fuerza de gravedad (Fig. 7). La monocapa se produce por la migración de las células del tejido, hacia el sustrato (vidrio con plasma) y por la división de las mismas (Álvarez y col., 2004).

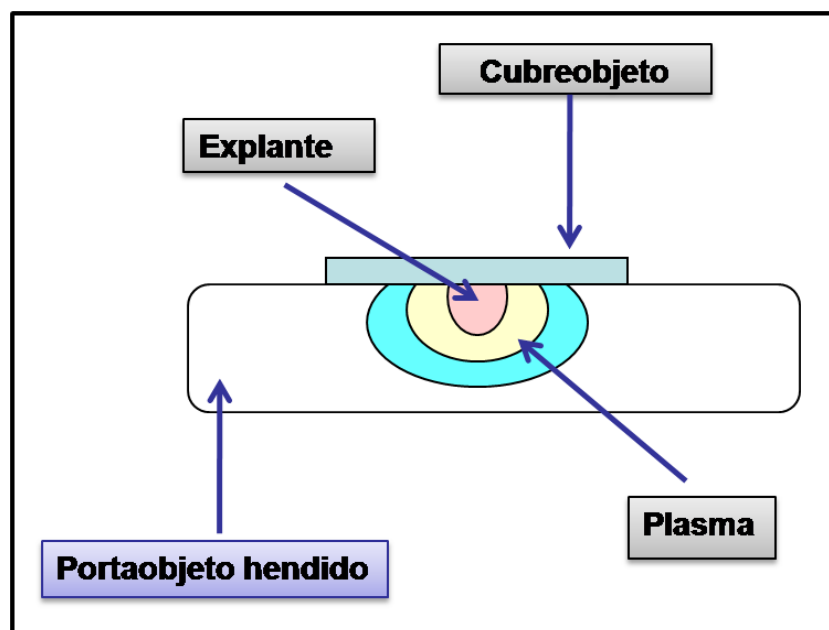


Figura 7. Método de gota pendiente. Elaborado por Álvarez y col., 2004.

Extracto de Embrión de pollo: este es un medio nutritivo que proporciona a los cultivos celulares todos los nutrientes necesarios para su desarrollo. Para la preparación del extracto se utilizan embriones (entre 6 y 8 embriones) de 8 días de desarrollo, ya que estos producen un extracto de mayor calidad (Urbaneja y col., 1975).

Para la obtención del extracto utilizaron, huevos fertilizados de gallina RI Red X Colombian Rocklos cuales fueron esterilizados con agua destilada y etanol al 70%. Posteriormente los huevos fueron incubados por 8 días, a 37 °C con una humedad relativa de 70% y ventilación adecuada, en una incubadora Heraeus.

Una vez cumplido el período de incubación los huevos embrionados, fueron nuevamente esterilizados en su superficie externa (cáscara) con etanol al 70%, seguidamente se procedió a realizar una perforación sobre la zona de la cámara de aire, con una aguja estéril. Posteriormente, se abrió una ventana en la cáscara usando una pinza estéril. Con la finalidad de extraer el embrión, se usaron pinzas estériles y se separó el embrión de sus

membranas extraembrionarias. Al realizar los procedimientos anteriormente descritos, se extrajo el embrión usando una pinza curva estéril con la cual se tomó el embrión para la región cervical. Por último, se colocó el mismo en una cápsula de Petri con solución Tyrode.

A través de un microscopio estereoscópico, se procedió a observar al embrión, con la finalidad de extirpar los globos oculares y el tejido hepático, lo cual se debe a la presencia de enzimas proteolíticas y pigmentos que pueden afectar negativamente el desarrollo del cultivo celular. A continuación se homogenizaron los embriones. Dicho homogéneo, fue centrifugado a 2000 rpm durante 15 min, siendo el sobrenadante el Extracto embrionario.

3.5.1 Técnica del Órgano Aislado.

Los huevos fertilizados de Gallina Rhodey Island, provenientes de la granja avícola, M. Alfonzo, de la región de San Antonio de los Altos, Estado Miranda, fueron esterilizados con agua destilada y etanol al 70% e incubados por 8 días, a 37 °C con una humedad relativa de 70% y ventilación adecuada, en una incubadora Heraeus.

Una vez cumplido el período de incubación los huevos embrionados, fueron nuevamente esterilizados en su superficie externa (cáscara) con etanol al 70%, seguidamente se procedió a realizar una perforación sobre la zona de la cámara de aire con una aguja estéril. A continuación se abrió una ventana en la cáscara usando una pinza estéril. Con la finalidad de extraer el embrión, se utilizaron pinzas estériles y se separó el embrión de sus membranas extraembrionarias. Al realizar los procedimientos anteriores, se extrajo el

embrión usando una pinza curva estéril con la cual se tomó el embrión por la región cervical. Por último, se colocó al mismo en una cápsula de Petri con solución Tyrode.

A través de un microscopio estereoscópico, se procedió a observar al embrión, con la finalidad de identificar, disectar y aislar el órgano de interés, que en el caso del presente trabajo es del corazón.

Montaje de los cultivos: este procedimiento se realizó siguiendo los procedimientos descritos en la técnica del órgano aislado, con la variante de que el tiempo de incubación utilizado en este caso fue de 5 días. Seguidamente los corazones extraídos se colocaron en un portaobjetos hendido, donde fueron disectados en fragmentos pequeños (aprox. 1 mm³). Colocando fragmentos de tejido sobre un cubreobjeto estéril, sobre este se agregaron en proporciones 1:1 extracto de embrionario y plasma de pollo. Una vez, realizado dicho procedimiento, se añadió vaselina en los vértices del cubreobjeto; posteriormente se colocó un portaobjeto hendido sobre el cubreobjeto y se volteó. De esta manera, el explante se encontraría dentro de una cámara sellada, totalmente adherido en oposición a la gravedad. Por último, el montaje anterior fue sellado con parafina, evitando así la deshidratación, y se introdujo a la incubadora a 37 °C y 70% de humedad donde permanecieron durante 24 horas.

Tratamientos: luego de las 24 horas de incubación, se procedió a retirar la parafina del cubreobjeto, se agregó el tratamiento respectivo (solución salina ®; extracto acuoso de Semilla Hindú ®) dentro de la hendidura del portaobjeto y se colocó de nuevo el cubreobjeto sobre la hendidura (de forma tal que el explante se encontraría embebido en la solución de tratamiento). Posteriormente se incubó durante 1 hora a 37 °C y 70 % de

humedad relativa. Al finalizar el período de tratamiento, las muestras fueron fijadas en solución buffer fosfato durante 1 min.

3.5.2. Tinciones Histoquímicas

Se utilizó el Azul de Toluidina. Este colorante, es capaz de contrastar el núcleo y el citoplasma, tiñéndolos en diferentes tonos de azules y púrpuras. El procedimiento de tinción con este colorante consiste en la adición de 2 o 3 gotas del mismo sobre el cultivo celular, previamente fijado, seguidamente se sometió a elevadas temperaturas de 100 a 120 °C por un corto período de tiempo, hasta observar un aro plateado sobre el área del colorante. Finalmente, se lavó con abundante agua destilada y se realizó el montaje en un portaobjeto.

3.5.3. Registro y Análisis de Imágenes

La observación de las muestras de tejido se realizó a través de un Microscopio NIKON. Luego se registró las imágenes a través de una cámara digital Olympus U-CMAD-2, conectada a un computador marca Toshiba ®.

Las imágenes fueron procesadas tomando en consideración los aspectos morfométricos e histomorfológicos; obteniendo así resultados cuantitativos (estadísticos) a partir de la imagen (García., 1993).

3.6 Evaluar con Acustocardiograma (ACG) y Cardiovideograma (CVG) en embriones de pollo, la toxicidad experimental inducida por extracto acuoso de semilla hindú®.

Cabe destacar que el corazón necesita energía para mantener sus estructuras y funcionalidad basal y para cumplir con su función, bombear sangre a los tejidos. El corazón debe realizar un cierto trabajo para empujar ese volumen de sangre hacia los tejidos en contra de una presión. En la fórmula del trabajo cardíaco se encuentran las variables que pueden hacer que aumenten las necesidades de oxígeno del miocardio. En primer lugar, el volumen de sangre bombeado, que no es otro que el volumen minuto (VM), y en segundo lugar, la presión arterial sistólica. El VM depende del volumen de cada latido y de la frecuencia cardíaca. El VM es el volumen al final de la diástole menos el volumen al final de la sístole. El volumen al final de la diástole depende principalmente del retorno venoso (precarga) y de la rigidez de la pared ventricular (estrés de la pared). El volumen al final de la sístole depende de la capacidad de contracción del músculo cardíaco (contractilidad). Por tanto, las cuatro variables que influyen directamente en el trabajo y el consumo de oxígeno del corazón son: frecuencia cardíaca, presión sistólica, estrés o tensión de la pared del ventrículo y contractilidad miocárdica lo cual será evaluado empleando técnicas como el Acustiocardiograma (ACG) y el Cardiovideograma (CVG), en el modelo cardíaco “*in vivo*” de embrión de pollo.

3.6.1 Acustiocardiograma (ACG)

La técnica de acustiocardiograma (ACG), se ha usado en embrión de pollo como un animal experimental, para estudiar la fisiología del desarrollo (Burggren y col., 1997). Unas de las ventajas principales de este método es que se puede medir de manera no invasiva e instantánea la frecuencia cardíaca, la medida es a largo plazo, además es una técnica que permite medir las funciones fisiológicas del embrión dentro de una cáscara de huevo (in ovo), como el latido del corazón del embrión (Akiyama y col., 1997 y Tazawa, 2005).

Para el desarrollo de esta técnica se empleará una incubadora constituida por un recipiente de forma rectangular fabricado en acero inoxidable de doble pared parcialmente lleno de agua en el espacio entre ambas paredes. El calor es suministrado al agua mediante una resistencia eléctrica inmersa entre las dos paredes inferiores. La temperatura es controlada mediante un termopar que mide la temperatura del aire que ocupa la cámara interior de la incubadora y que está conectada a un controlador electrónico encendido-apagado (on-off) marca Caho, modelo SR-T4 que su vez se encarga de controlar la potencia suministrada a la resistencia para mantener la temperatura del aire en la cámara en un margen previamente determinado mediante los ajustes del controlador (Fig. 8).

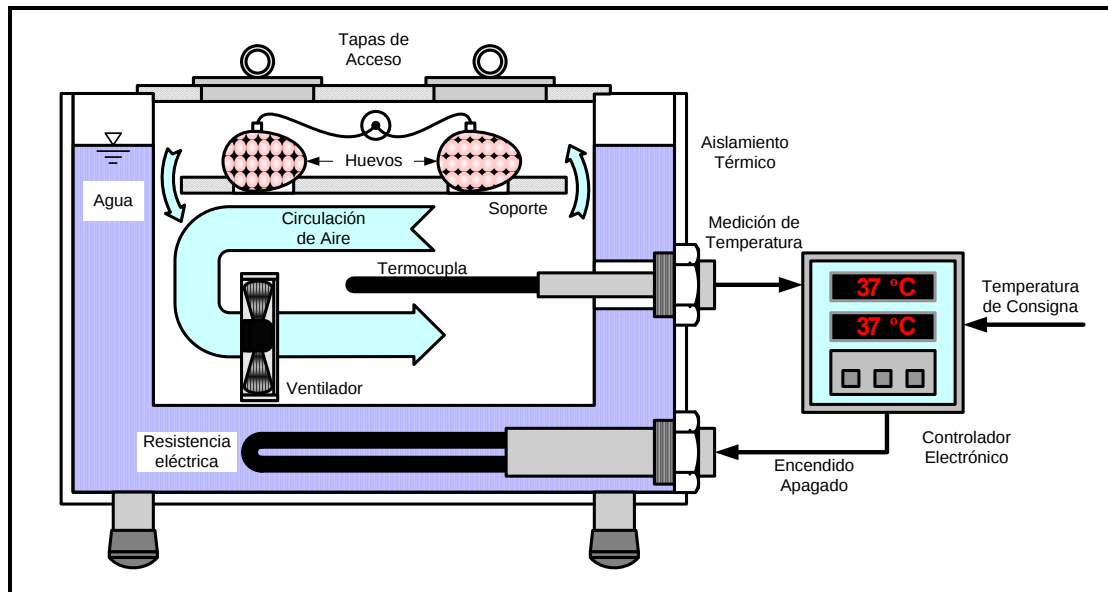


Figura 8. “Diseño de Incubadora”. Dr José Ercolino. Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo” Modificado 2008.

Los huevos fertilizados de gallina RI Red X Colombian Rocklos en estudio serán marcados con un lápiz, en las zonas donde estará ubicado el sensor de temperatura, el micrófono y el catéter para la administración del extracto acuso de semilla hindú (Fig.9).

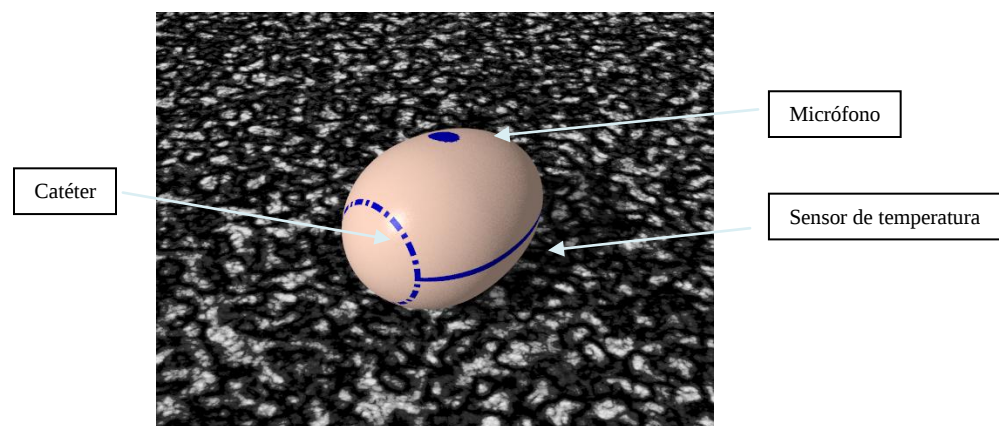


Figura 9. “Marcado de huevo para seleccionar la ubicación de los sensores”. Dr José Ercolino. Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo” Modificado 2008

La temperatura de los huevos será medida mediante un sensor fabricado a partir de un diodo de silicio calibrado y adosado a un costado del huevo sobre la línea ecuatorial y fijado con cera. (Fig. 10).

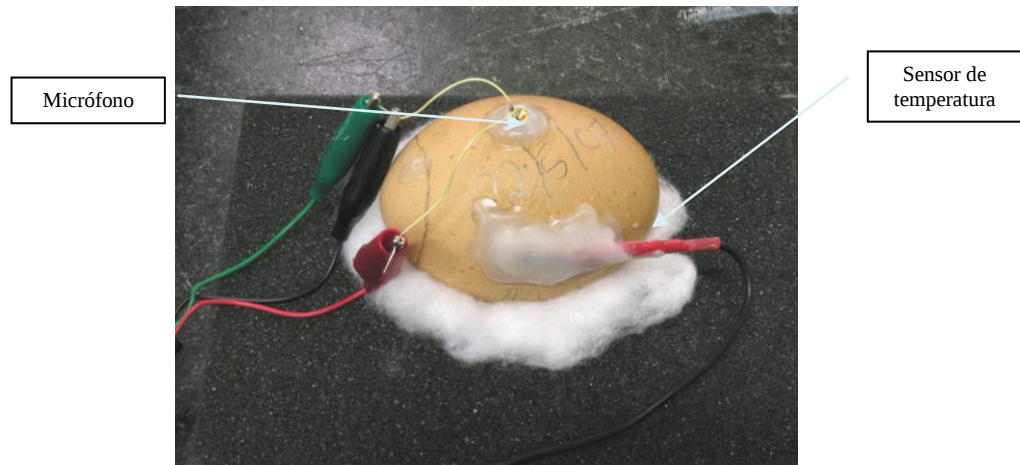


Figura 10. “Ubicación del sensor temperatura y del micrófono sellado herméticamente con cera”. Dr José Ercolino. Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo” Modificado 2008

Las señales acústicas provenientes del huevo serán medidas mediante un micrófono de condensador el tipo “electret” de unos 5mm de diámetro, que también será fijado a la cáscara del huevo de manera hermética con el fin de disminuir los cambios de presión acústicos fuera de la cáscara de huevo es por tal razón que se le recubrirá con cera. (Tazawa, 2005) (Fig. 10).

El micrófono será alimentado mediante un circuito de polarización de 12 V con una resistencia de 43 k Ω . Las señales capturadas por el micrófono serán tratadas mediante un amplificador de 43 dB y ancho de banda desde 0,1 Hz hasta 30 Hz y pendientes de 12 dB/oct.

El gráfico de la respuesta en frecuencia del conjunto filtro-amplificador se muestra a continuación.

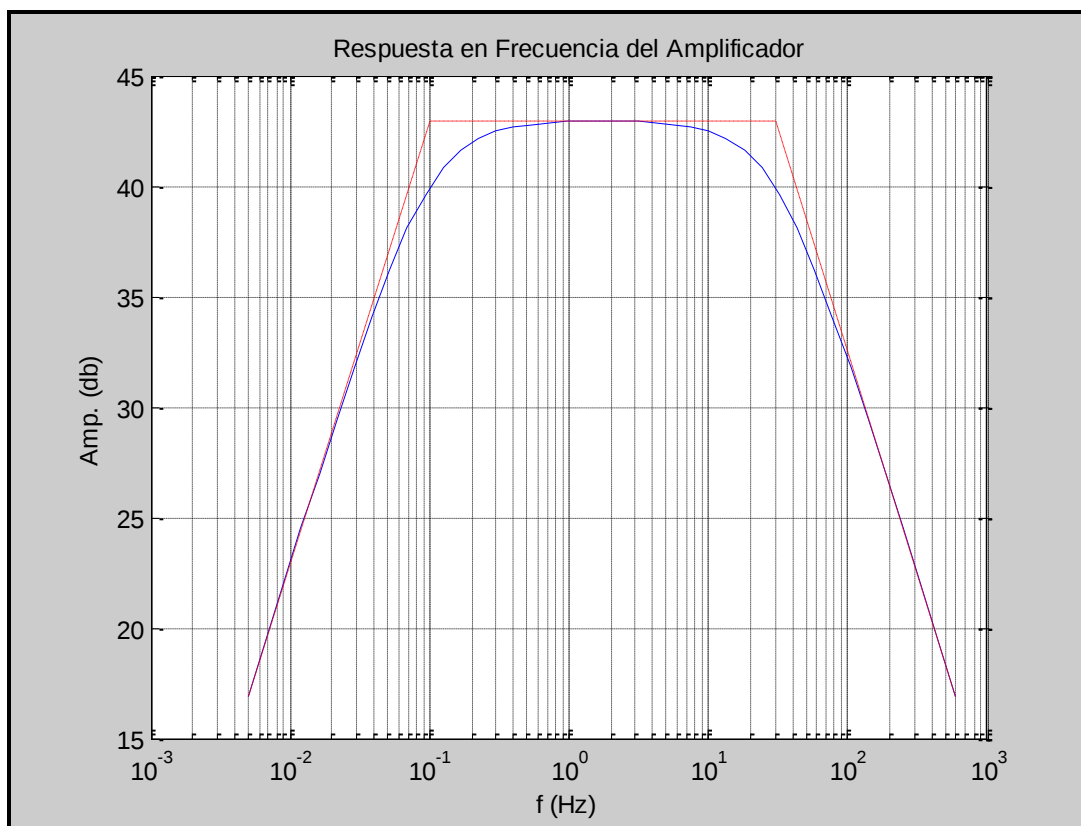


Figura 11. “Registro de señales amplificadas”. Dr José Ercolino. Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo” Modificado 2008

El registro de las señales amplificadas se efectuará mediante un módulo de adquisición de datos de la firma National Instruments, modelo NI USB-6008, con una frecuencia de 40 muestras por segundo para la temperatura y la señal acústica. Las señales serán adquiridas y tratadas bajo el control de un programa desarrollado en el ambiente Matlab 2006 de la compañía Mathworks este programa es una potente herramienta de cálculo numérico y visualización gráfica de uso muy difundido entre los científicos para el desarrollo de su tarea de investigación. Tiene la gran ventaja de ser un lenguaje de alto nivel que integra, en un único ambiente software, rutinas de cálculo, visualización y programación (Azevedo J y col., 2002). El programa es de fácil uso ya que los problemas se pueden formular usando una notación matemática standard. La

representación básica de los datos en Matlab es en forma matricial, es un sistema abierto al cual el usuario puede incorporar nuevas funciones para su uso en aplicaciones particulares. El esquema de la captura de la señales (Fig. 12).

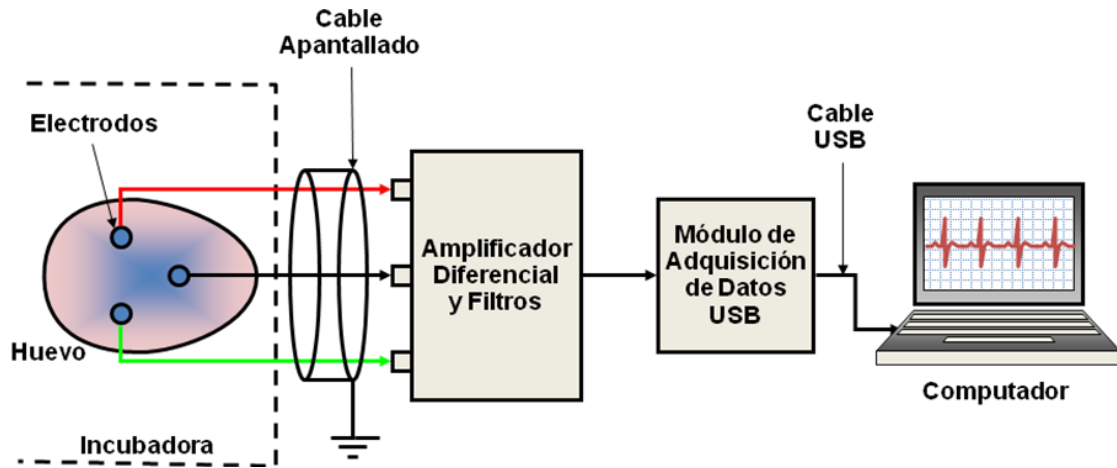


Figura 12. “Esquema de captura de señales”. Dr José Ercolino. Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo” Modificado 2008

Se empleará un intervalo de muestreo de 51,2 S lo que, junto a la frecuencia de muestreo anterior equivale a 2048 muestras y una resolución en frecuencia de 0.01953 Hz. Las señales acústicas serán analizadas en frecuencia mediante la transformada rápida de Fourier (FFT) para lo que se empleará una función de ventana de Hanning de la misma longitud de la serie registrada (Brigham, 1988). Espectro de frecuencias de las señales acústicas (Fig. 17), se muestra en el espectro de frecuencias de las señales acústicas que podrán ser capturadas en un embrión de pollo de 12 días de incubación (embrión A) donde se podrá observar un máximo correspondiente a la frecuencia fundamental de los latidos del corazón del embrión (4,15 Hz). Igualmente, se observará claramente el segundo máximo correspondiente al primer armónico de la frecuencia cardíaca (8,3 Hz).

El valor máximo del espectro de frecuencias de cada serie muestral de datos será detectado automáticamente en el programa de control, registrado y almacenado para su análisis posterior.

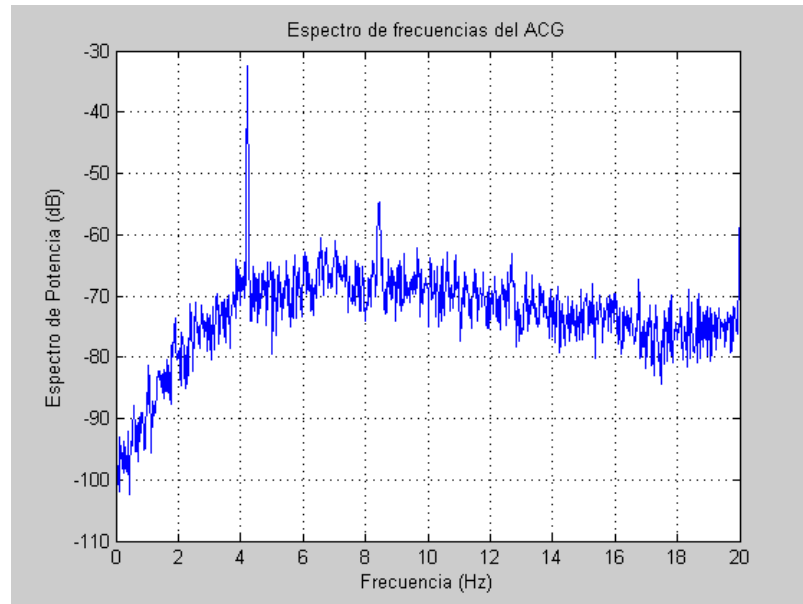


Figura 13. “Espectro de frecuencias de las señales acústicas que son capturadas en un embrión de pollo de 12 días de incubación”. Dr José Ercolino. Sección de Microscopia Electrónica del Instituto Anatómico “José Izquierdo” Modificado 2008.

Tratamientos.

Los huevos embrionados serán divididos en dos grupos, los tratamientos consisten en realizar una pequeña apertura en la cámara de aire del huevo e inocular 0,5 ml de cada una de las siguientes soluciones: 1) solución salina ®, 2) extracto acuoso de Semilla Hindú ® a una concentración de 37,5 µg/ml. Cabe destacar que la apertura se realizará antes de

colocar el huevo en la incubadora y se le colocará un catéter para la administración de los tratamientos.

Posterior a la aplicación del tratamiento y el registro de la actividad cardíaca, se procederá a aislar el corazón de los embriones de pollo. Y a continuación, se realizará el procesamiento histológico para microscopía de luz que será descrito más adelante.

3.6.2 Cardiovideograma y Cardiotoxicidad.

La cardiotoxicidad inducida por el extracto acuoso de la semilla de *Thevetia peruviana*, fue evaluada a través de la determinación de cambios en los valores de la frecuencia cardíaca y sobre el patrón de contracción cardíaca. Se hizo uso del método semi-invasivo, denominado por nosotros, Cardiovideograma (CVG) y basado en un sistema de grabación de video descrito por otros autores (Nishibatake M, y col., 1990). Para ello, los embriones, una vez ubicados dentro de huevo, haciendo uso de un ovoscopio, fueron expuestos a través de las técnicas convencionales de manipulación embrionaria (Hodach R, y col., 1974) y colocados bajo una estación de trabajo constituida por una incubadora de precisión, con registro de temperatura, un microscopio estereoscópico (Nikon-SMZ800), una cámara de video (Nikon, 200 cuadros/seg), módulo de adquisición de datos y un computador (Fig.14).

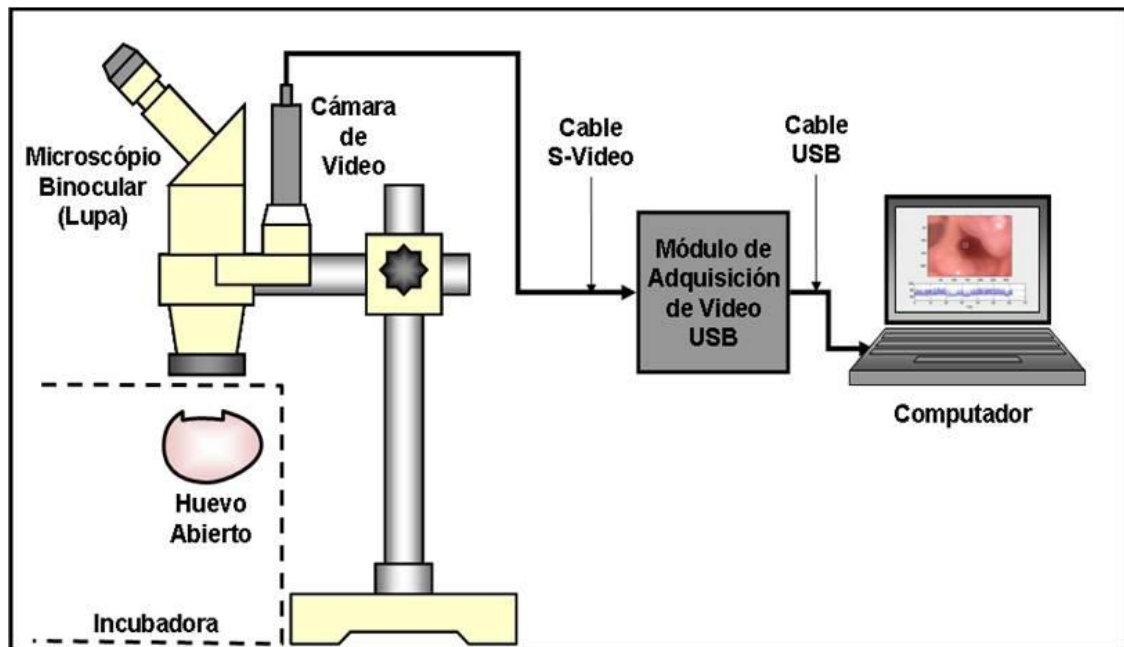


Figura 14. A) Estación de trabajo para la medición de la Frecuencia Cardíaca mediante Cardiovideograma (CVG).

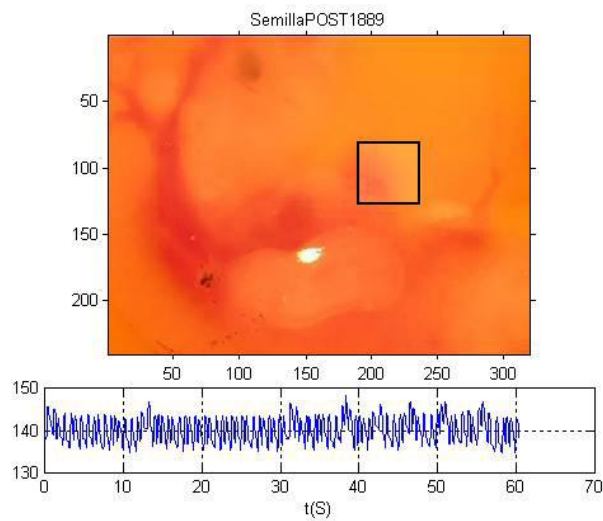


Figura 15. Fotograma con recuadro y delimitación del área cardíaca y patrón del registro de luminosidad en función del tiempo $t(s)$.

3.6.3 Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP).

Una vez expuestos los embriones y ubicado el corazón, fueron realizadas grabaciones de video durante una hora (1h), en intervalos de 15 min, antes y después de realizado el tratamiento. El procesamiento de los respectivos videogramas fue realizado en el computador mediante un programa desarrollado bajo el ambiente MATLAB® (Azevedo y col., 2002). Este programa permitió calcular los valores de la Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP), mediante las variaciones de luminosidad de las áreas cardíacas seleccionadas, midiendo los intervalos entre los puntos máximos de ésta variación y calculando el número de pulsaciones promedio por minuto (P/min) (Sequera y col., 2010).

3.6.4 Contractilidad miocárdica.

El análisis de imágenes realizado sobre los fotogramas obtenidos de los respectivos videos, permitió estimar la contractilidad cardíaca a través de la cuantificación del patrón de contractilidad del miocardio. Para ello, se realizaron mediciones de la anchura máxima de las regiones contráctiles durante el ciclo cardíaco embrionario. La ubicación de cada una de las porciones cardíacas (V, TA, A), sobre los respectivos fotogramas, permitió medir la extensión máxima de los contornos de cada región, en cada sístole y diástole (Wagner y col., 1972) antes y después del tratamiento. Se estimó el punto de máxima sístole para cada una de las porciones contráctiles. La actividad contráctil fue registrada en intervalos de 15 min, durante una hora (1h), a una temperatura constante de 37°C (Sequera y col., 2010).

Para lo cual se hizo uso de embriones de 4½-5 días de desarrollo, St 25. Los embriones fueron obtenidos a partir de la incubación, 37°C y 85% humedad relativa, de huevos fértiles de Gallinas Rhode Island, seleccionados de la granja avícola M. Alfonso, ubicada en la región de San Antonio, estado Miranda. El estadio 25 (St 25) de desarrollo en cuestión permite, fácilmente, visualizar tres áreas cardíacas contráctiles: la Ventricular (V), el Tronco Arterioso (TA) y el Atrio (A), que se hacen accesibles para evaluar el patrón de contracción cardíaca del miocardio embrionario durante la sístole y diástole del ciclo cardíaco. No se presenta aún influencia vagal sobre la actividad cardíaca en esta etapa del desarrollo (LeGrande M,y col., 1996).

3.7 Evidenciar “*in vivo*” e “*in vitro*” las señales de daños cardíacos tisulares y celulares inducidos por la acción del extracto acuoso de la semilla hindú®, a través de inmunohistoquímicas (TUNEL) y marcaje de organelos subcelulares mitocondrias (DiOC13) y lisosomas (naranja de acridina).

Los huevos fertilizados de gallina RI Red X Colombian Rock serán esterilizados con agua destilada y etanol al 70%. Posteriormente los huevos serán incubados por 8 días, a 37 °C con una humedad relativa de 70% y ventilación adecuada, en una incubadora Heraeus. Luego de cumplir el período de incubación los huevos embrionados, serán nuevamente esterilizados en su superficie externa (cáscara) con etanol al 70%, seguidamente se procederá a realizar una perforación sobre la zona de la cámara de aire con una aguja estéril. A continuación se abrirá una ventana en la cáscara usando una pinza estéril. Con la finalidad de extraer el embrión, se usará otra pinza estéril y se separará el embrión de sus membranas extraembrionarias. Al realizar los procedimientos anteriores, se podrá extraer

el embrión usando una pinza curva estéril con la cual se tomará el embrión para la región cervical. Por último, se colocará al mismo en una cápsula de Petri con solución Tyrode.

A través de un microscopio estereoscópico, se procederá a observar al embrión, con la finalidad de identificar, disectar y aislar el órgano de interés, que en el caso del presente trabajo es del corazón.

Tratamiento

Los órganos aislados serán agrupados y colocados en viales con el fin de aplicar a cada grupo un tratamiento diferente: 1) solución salina ®, 2) extracto acuoso de semilla hindú ®. Todos los tratamientos tendrán un tiempo total de exposición de 1 hora a 37 °C, después de lo cual se realizará el tratamiento histológico.

Una vez tratados se procederá a fijar el tejido, usando la solución buffer fosfato, por un período mínimo de 3 minutos. Posteriormente se someterá el tejido a una batería creciente de alcoholes, para luego el aclaramiento y la inclusión en parafina. Los bloques de tejido serán cortados usando un micrótomos MR2. Una vez realizados los cortes, entre 4 y 5 µm de grosor, se procede al montaje en una lámina portaobjeto y la tinción de las muestras.

3.7.1 Tinción histoquímica para Microscopio de Luz.

Coloración Inmunohistoquímica T.U.N.E.L: esta tinción permite monitorear procesos apoptóticos a través de la detención “in situ” de la fragmentación del ADN por la incorporación de nucleótidos marcados al terminal libre 3'OH de los fragmentos, en secciones de tejido fijados en parafina. Presenta como ventaja la detección de las células

de apoptosis en estadios precoces, es la más ampliamente utilizada para cuantificar células apoptóticas ya que permite identificar también al tipo celular afectado.

La valoración de apoptosis a través de esta técnica se pone de manifiesto en los extremos 3'OH libres que se generan en la fragmentación del ADN, incorporando nucleótidos marcados a dichos extremos mediante la acción de la enzima deoxinucleotidil transferasa terminal (Tdt). Para llevarla a cabo, se utilizarán únicamente en tejido cardíaco de embrión de ocho días de desarrollo tratados con el extracto de la semilla en estudio.

Otro grupo de muestras, controles y tratadas fueron incubados con sondas fluorescentes selectivas, Naranja de Acridina (NA) (5 µg/mL) y b) 3,3'-dimetil-oxacarboxcianide (DiOC1(3)) (5 µg/mL). Los fluorocromos catiónicos (ambos marca SIGMA, St Louis, MO, USA), fueron usados en volúmenes de 0,1 mL de 10⁻³ M en solución Tyrodes. Cada cultivo fue incubado durante 2 min en el caso de NA y 1 min en el caso de (DiOC1(3)). Inmediatamente transcurrido el tiempo de incubación los cultivos fueron lavados 3x con solución Tyrodes, montado al microscopio invertido Olympus-IX71, con lámpara de mercurio y cubos para luz de excitación azul (460-490 nm, para (DiOC1(3)) y excitación verde (510-550 nm, para NA) y observadas 40x. Los registros fueron realizados con una cámara digital Olympus-DP71.

RESULTADOS.

4.1 Clasificación de Botánica de la Semilla Hindú ®.

Una vez realizada la colección de semillas provenientes de las plantas patrones encontradas en la Facultad de Ciencias Económicas y Sociales (FACES) de la Universidad Central de Venezuela, se pudo evidenciar que las semillas antes mencionadas, presentan características físicas similares a las de la semilla hindú ®, entre las cuales destacan color, tamaño, diámetro y forma. Lo que permite clasificarla taxonómicamente a la semilla hindú ® como la especie *Thevetia peruviana*, siendo esta examinada en el herbario Dr. Victor Manuel Ovalles de la Facultad de Farmacia de Universidad Central de Venezuela.

Este es el caso particular de la *Thevetia peruviana*, perteneciente a la familia de la Apocynaceae. La apocinácea pertenece a una numerosa familia, con más de 180 géneros y 1.300 especies es característica de la zona intertropical. En Europa se encuentra representada por dos especies comunes, pervincas (*Vinca minor* L., *V. mayor* L.), por una especie mediterránea adelfa planta ornamental que se refiere a dos especies de plantas, *Nerium oleander* (adelfa común) y *Thevetia peruviana* (adelfa amarilla). (Bruneton, 2001).

Es considerada como un árbol ornamental con una altura promedio de 2 a 5 metros de altura, sus hojas son de color verde, más oscuras en la cara superior, varían de linear a lanceoladas, miden de 15 centímetros con nerviaciones secundarias pinnada y densa

estrechas (8-14x 0.5-0.8 cm), posee flores solitarias amarillas a naranja, de formas campanulada y de él se obtiene un fruto caroso pequeño de color verde y al madurar se torna negro, del tamaño de una ciruela, tiene un hueso muy duro de color amarillento; triangular que se encuentra comprimido lateralmente en forma de almeja, en cuyo interior hay de dos a cuatro semillas con cotiledones oleoso (las hojas primordiales constitutivas de la semilla y se encuentran en el germen o embrión).

Tabla IV. Clasificación taxonómica de la Semilla Hindú ®.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Gentianales
Familia:	Apocynaceae
Género:	Thevetia
Especie:	<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum
Nombre común:	Semilla hindú, semilla de la india, retama, pájaro bobo, huapariu, tama raho.
Descripción diagnóstica:	Fruto turbinado, algo comprimido lateralmente, de 2,0 a 2,7 x 2,8 a 3 cm, negruzco en la madurez; semillas 2 (-4), de color gris claro, lenticulares, de unos 2 x 3,5 cm.
Ubicación geográfica:	Jardín de la Facultad de Farmacia de la Universidad Central de Venezuela y en áreas cercana a la Iglesia San Pedro, ubicada en la Avenida Victoria, en la Ciudad de Caracas. Semilla de venta libre en casas naturistas y en la economía informal.

4.2 Espectrofotometría Ultravioleta.

El espectro obtenido para la muestra colectada proveniente del extracto alcohólico de la Semilla Hindú ®, presenta banda de absorción a $216 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$ (Fig. 16), característica del oleandrina el cual pertenece a la familia de los Apocynaceae (glucósido cardíaco).

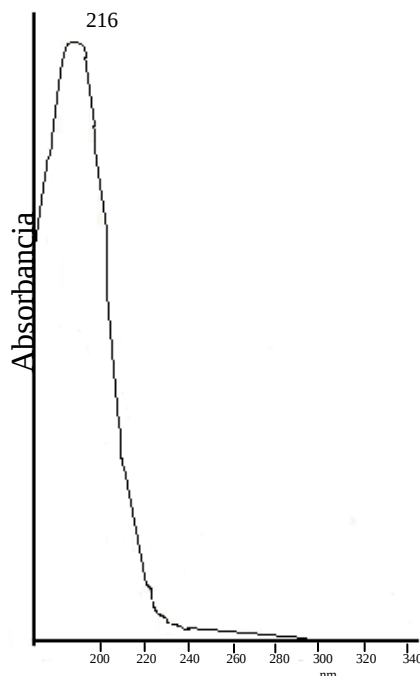
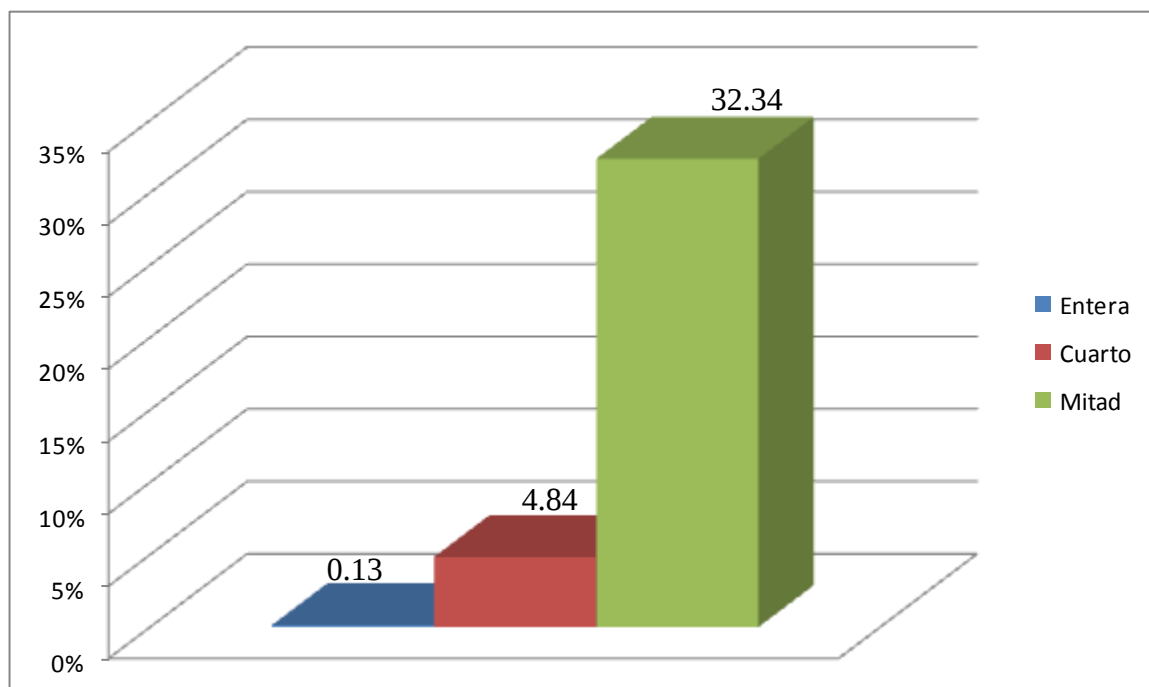


Figura (16). Espectrofotometría Ultravioleta. Espectro del extracto alcohólico de la semilla hindú ®.

4.3 Fotocolorimetría.

La muestra control denominada semilla silvestre como semilla hindú ® enteras, arrojaron concentraciones de cianuro de $0,013 \text{ ppm} \pm 0,05\%$, lo que corresponde a un 0,13%. Con respecto al cuarto de semilla, las concentraciones arrojadas fueron de $0,484 \text{ ppm} \pm 0,05\%$ lo que corresponde a un 4,84%. Mientras que las concentraciones de cianuro, pertenecientes a la mitad de la semilla, corresponde a $3,234 \text{ ppm} \pm 0,05\%$ lo que

se traduce en un 32,34%, indicando de esta manera que las concentraciones de cianuro aumentan de manera significativamente al ser sometidas procesos de molienda (gráfica 1), debido a que la sustancia de interés se encuentra más expuesto y es fácilmente liberable.



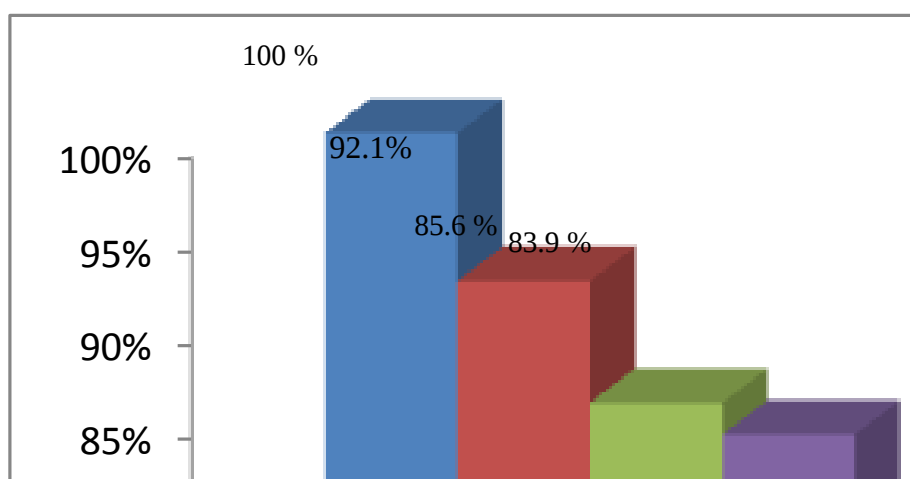
Gráfica 1. Concentración de Cianuro. Porcentaje de Cianuro Fácilmente Disponible en el extracto acuso de Semilla Hindú bajo diversos tratamientos.

4.4. Población Embrionaria.

En este trabajo de investigación se emplearon un total de 180 huevos fértiles. De esta población total 158 huevos resultaron embrionados. De los cuales solo 139 sobrevivieron a los 8 días de incubación, y de estos huevos viables, se utilizaron 135 en la investigación. De esta población ensayada, 120 embriones se utilizaron para la

determinación de frecuencia cardíaca y posterior estudio morfológico, 29 empleados para cultivo celular (9 para cultivo de gota pendiente, 10 para cultivo de disgregación enzimática y 10 para preparación de extracto), 60 para ajuste de dosis y 31 para estudios morfológicos solamente. Para un total de 6 experimentos por grupo de análisis.

Relación porcentual de la Población Embrionaria.



Gráfica 2. Población Embrionaria. Porcentaje de los huevos viables para la realización de los experimentos.

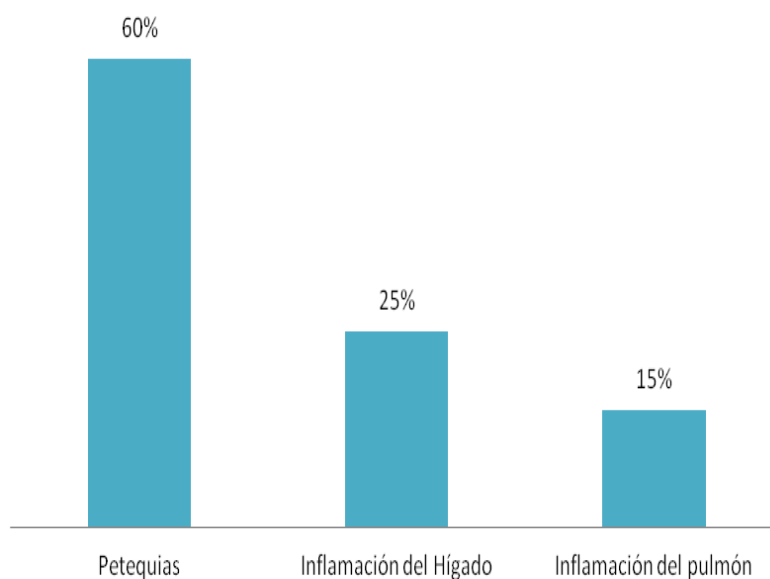
4.5 Dosis Letal Media (DL50) y Dosis tóxica.

Para determinar la dosis letal media (DL50) se realizaron varios ensayos preliminares los cuales sirvieron para establecer una dosis de trabajo, para el extracto acuoso de semilla hindú ®. De acuerdo a los estudios realizados y empleando el método de Spearman & Karber propuesto por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Se determinó que la dosis (DL50) corresponde a 37,5 µg/ml en peso promedio. Cabe destacar, que la dosis tóxica de la misma es de 47,8 µg/ml en peso promedio.

4.6 Acción toxica generalizada de la dosis letal 50 (DL50) en embriones tratados con extracto acuoso de semilla hindú ®.

Con respecto a los efectos encontrados como consecuencia de la aplicación de la DL50, cabe destacar efectos generalizados; tales como: la presencia de petequias en un 60% de la población embrionaria tratada, así como la presencia de inflamación hepática en un 25% e inflamación pulmonar en un 15%, (Grafica. 3).

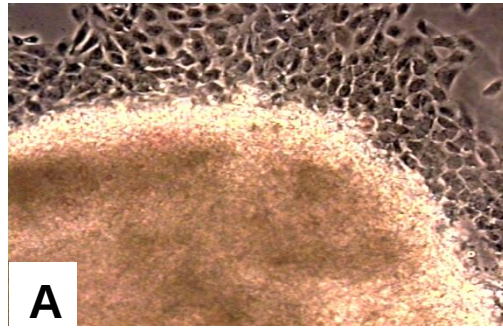
Porcentaje de efectos generalizados expresados en embriones de pollo tratados con la dosis letal 50 de extracto acuoso de semilla hindú ®



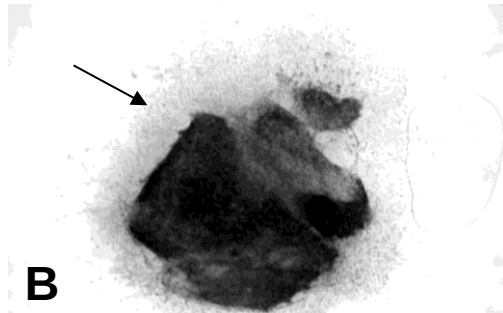
Grafica 3. Signos presentados por los embriones expuesto de forma aguda al extracto acuoso de semilla hindú ®. Donde se observa que el mayor porcentaje de signos corresponde a la formación de petequias, la misma asociada a anormalidades de las plaquetas o de los capilares, seguida de la inflamación de hígado. N= 30 p< 0,005

4.7 Acción tóxica a nivel celular de la concentración letal 50 y dosis tóxica, de la semilla hindú®

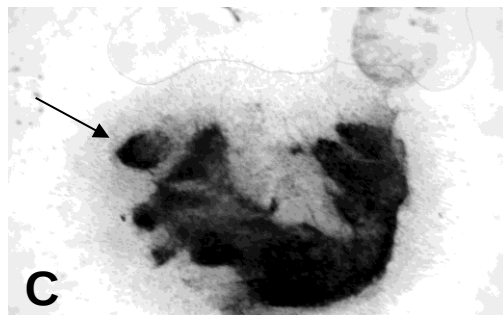
Registros fotográficos de una muestra representativa de monocapa control de mioblastos cardiacos “*in vivo*” (Fig 17.A) fijada y coloreada con azul de toluidina (Fig 17. B). Se destaca en esta última, el alo de crecimiento (flecha), la porción de explante sembrado (ex); la población de mioblastos tratadas con extracto acuoso de semilla hindú ® 6µg/ml (Fig.17C) y la población de mioblastos tratadas con extracto acuoso de semilla hindú ® 100µg/ml (Fig.17D). Al comparar, la población de mioblastos cardiacos controles y tratados con semilla hindú ® 6µg/ml (Fig.17C), se observó que en las controles hay proliferación celular y crecimiento homogéneo en el cultivo. Mientras que en las tratadas con la dosis más baja se observo pérdida del arreglo de la monocapa y pérdida de células en la periferia del explante. Al incrementar la dosis del extracto acuoso de semilla hindú ® se observó muerte celular lo cual se refleja en una pérdida total de la proliferación celular.



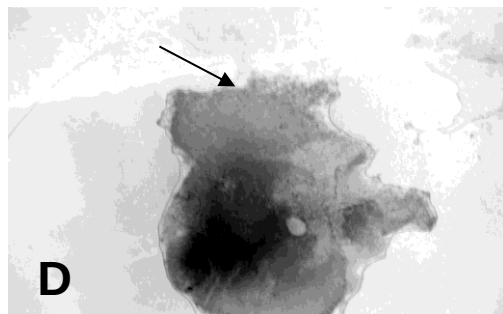
Monocapa de mioblastos en vivo: Microscopia de contraste de fase. Objetivo de inmersión. 100x



Monocapa de mioblastos cardiacos, control, fijada en formalina y contrastada con azul de Toluidina. Objetivo estereoscopio Nikon 4x



Monocapa de mioblastos cardiacos, tratada con Semilla 0,006g/l, fijada en formalina y contrastada con azul de Toluidina. Objetivo estereoscopio Nikon 4x



Monocapa de mioblastos cardiacos, tratada con Semilla 0,1g/l, fijada en formalina y contrastada con azul de Toluidina. Objetivo estereoscopio Nikon 4x

Figura 17. Registros fotográficos de muestras representativas de monocapas de mioblastos cardiacos, control A y B. Tratadas con extracto acuoso de semilla hindú ® 6µg/ml (Fig.C) y las tratadas con extracto acuoso de semilla hindú ® 100µg/ml (Fig.D).

4.8 Actividad cardíaca a través de métodos no invasivos tales como el

Acustocardiograma (ACG) y el Cardiovideograma (CVG)

4.8.1 Acustocardiograma (ACG)

Registro de las señales acústicas o acustiocardiograma (ACG) para un embrión de pollo de 12 días, en el valor de la abscisa (tiempo) expresado en horas, mientras que la ordenada (pulsaciones por minutos). Se presenta a nivel de frecuencia cardíaca, un carácter aproximadamente periódico de 0 a 2,5 h (Fig. 18), situación que varía al administrar la solución salina (control) donde existe una disminución la frecuencia cardíaca debido al cambio osmótico del sistema en estudio, la misma es restablecida a la hora post tratamiento (Fig. 18.A). Una vez estabilizada la frecuencia cardíaca y evaluada por un lapso de 17 horas, se administró el extracto acuoso de semilla hindú ® lo que produjo un aumento considerable en la frecuencia cardíaca hasta alcanzar un máximo de 270 pulsaciones por minuto (p/m) con un intervalo de confianza de $\pm 3,50$ p/min para tres desviaciones estándar figura (18.B).

Registro de las señales acústicas o acustiocardiograma (ACG)

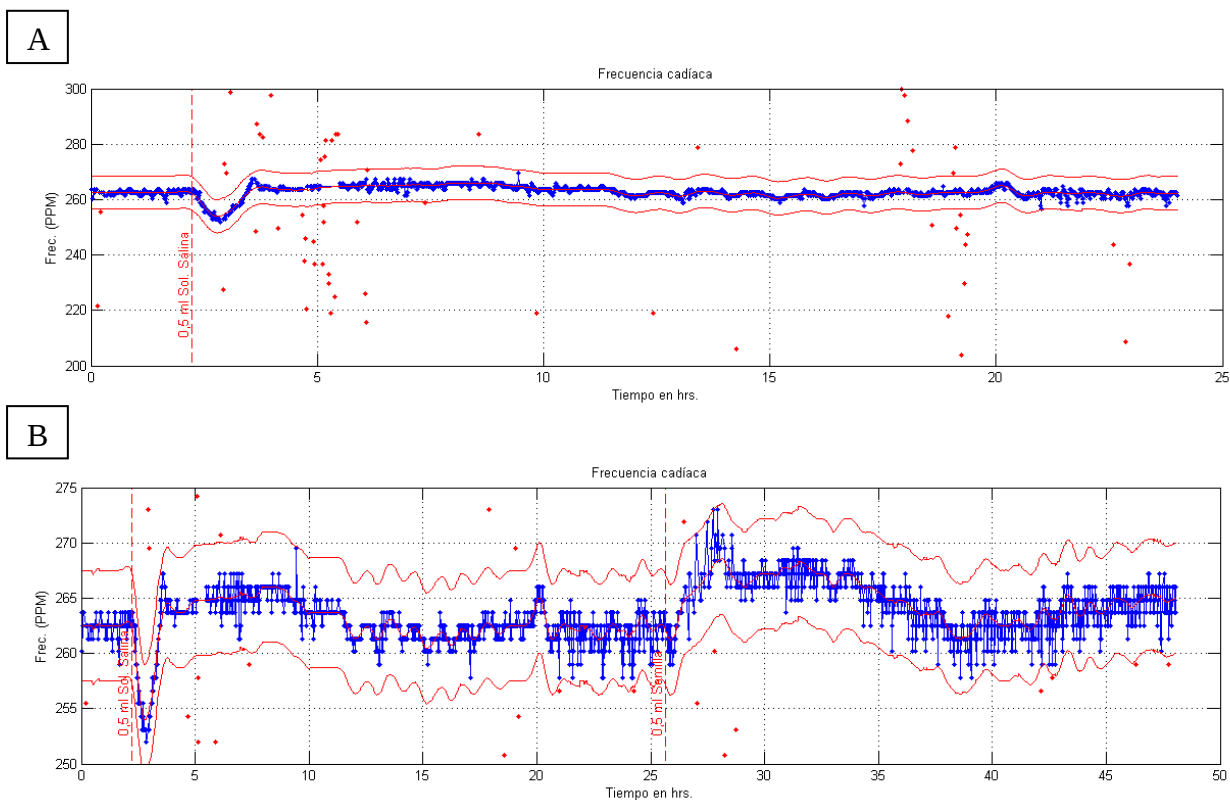


Figura 18. Registro de las señales acústicas o acustiocardiograma (ACG) para un embrión de pollo de 12 días, en el valor de la abscisa (tiempo) expresado en horas, mientras que la ordenada (pulsaciones por minutos).

4.8.2 Cardiovideograma (CVG)

Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP).

El valor del período promedio de los intervalos entre los puntos máximos de luminosidad en función del tiempo, permitió estimar la Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP) antes y después del tratamiento (Fig.19). El registro gráfico de CVG antes del

tratamiento (Fig.19 A), muestra una secuencia regular y homogénea de intervalos de puntos máximos de luminosidad (a) en función del tiempo. Se estimaron valores de FCP alrededor de $203 \pm 4,784$ P/min (b). En contraste, la variación de luminosidad luego del tratamiento (Fig.21B), registró una secuencia de puntos máximos homogénea pero irregular, con señales de puntos de arritmia (flechas). En este caso los espacios entre los puntos máximos fueron mayores (a). Se registró un valor menor de FCP, particularmente alrededor de $143,1 \pm 2,534$ P/min (b). Los valores de FCP que se estimaron, presentaron una reducción significativa, del 70,49% en P/min, con respecto al control.

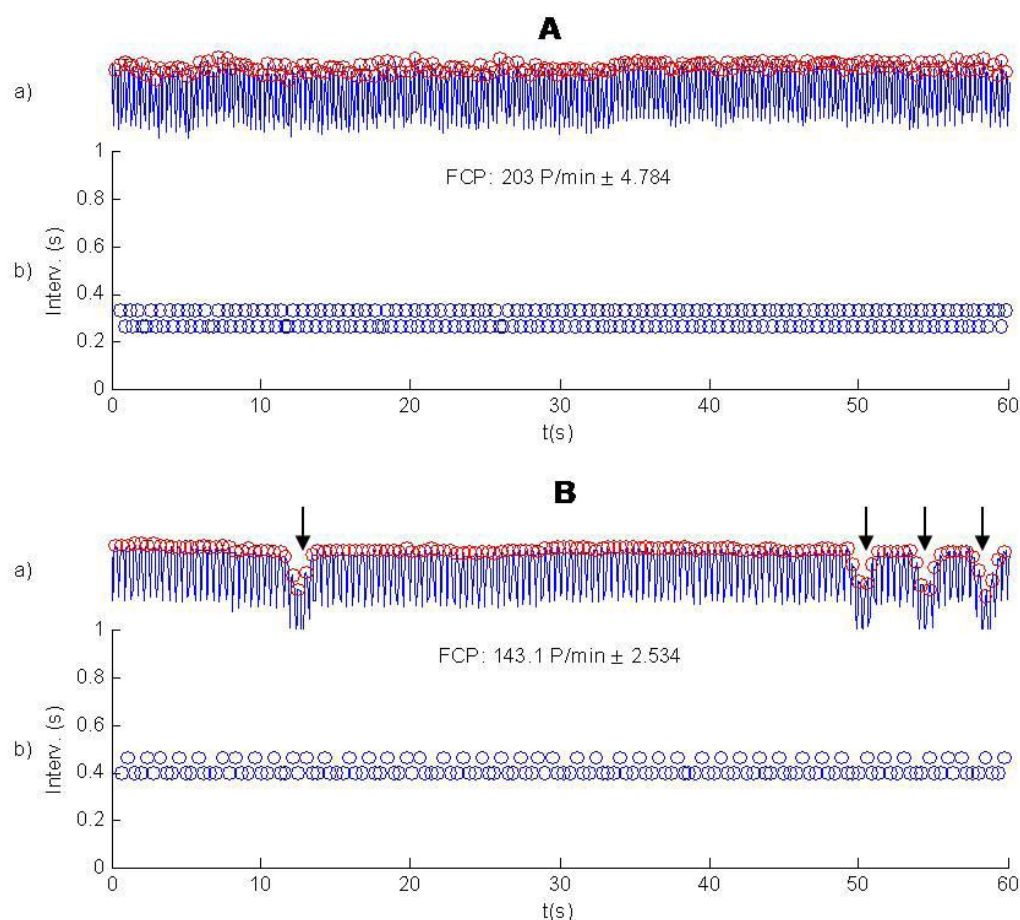


Figura 19. Representación gráfica de la variación de luminosidad expresada como una secuencia regular y homogénea de intervalos de puntos máximos de luminosidad (a) en función del tiempo. Frecuencia Cardíaca Promedio (FCP).

Contractilidad Miocárdica.

El análisis del ciclo cardíaco, sobre los respectivos fotogramas, permitió determinar las variaciones en la contractilidad del miocardio embrionario en función de los cambios en el valor de anchura máxima y estimación del vaciado o máxima sístole de las distintas porciones cardíacas antes (Pre) y después de tratamiento (Post) (Fig.20). La anchura máxima ventricular (V), antes del tratamiento (Pre), fue mayor que la anchura máxima ventricular (V), posterior al tratamiento (Post).

Esta situación se encontró vinculada con un mayor vaciado o mayor sístole ventricular (1) posterior al tratamiento. Por otra parte, la anchura máxima de la región del Tronco Arterioso (TA), antes del tratamiento (Pre), fue mayor que la anchura máxima del TA, posterior al tratamiento (Post). Esta situación se encontró vinculada con un mayor vaciado o mayor sístole de la porción TA (2) posterior al tratamiento.

Por último, la anchura máxima de la porción auricular (A), antes del tratamiento (Pre), fue menor que la anchura máxima de la porción Auricular (A), posterior al tratamiento (Post). Esta situación estuvo vinculada con un menor vaciado o menor sístole auricular posterior al tratamiento (Hamburger y col., 1992).

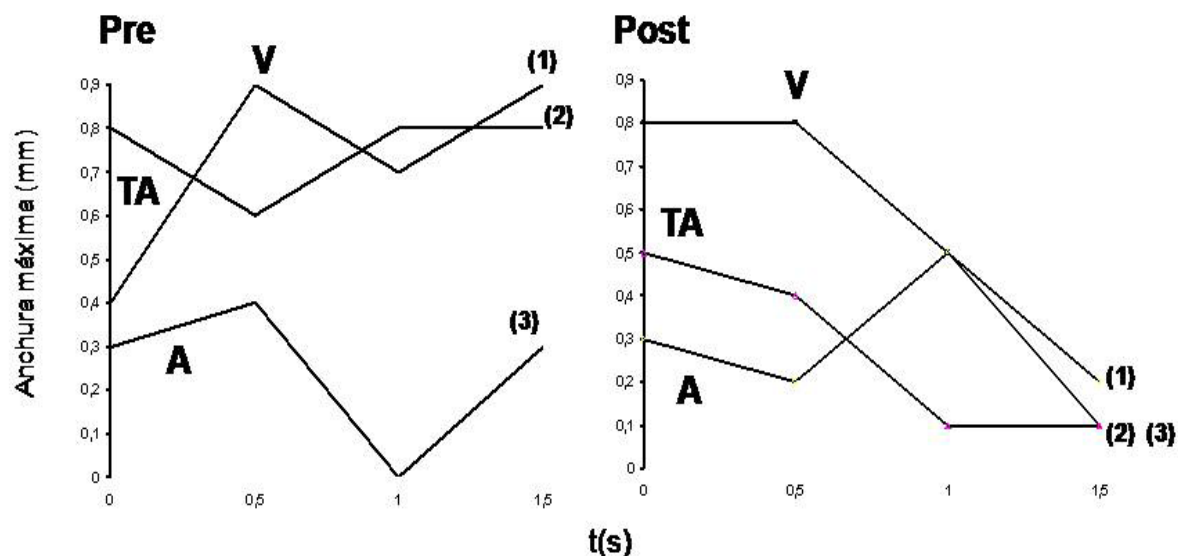


Figura 20. Representación gráfica del patrón de actividad de las porciones contráctiles del corazón Pre y Post tratamiento: Ventrículo (V), Tronco Arterioso (TA) y Aurícula (A).(1),(2),(3): puntos de estimación del nivel de sístole de la cada una de las porciones contráctiles.

4.9 Señales de Daños Cardíacos Tisulares y Celulares.

Registros fotográficos muestran el corte frontal del corazón, donde se observó un ensanchamiento del ventrículo derecho y una disminución del ventrículo izquierdo post tratamiento, con una hiperplasia del ventrículo. Así mismo, arrojo con la tinción de TUNEL un resultado positivo en las células endocardiales en el corazón tratado (Fig. 21).

Morfología de un corazón normal y uno tratado con extracto acuoso de semilla

hindú ®.

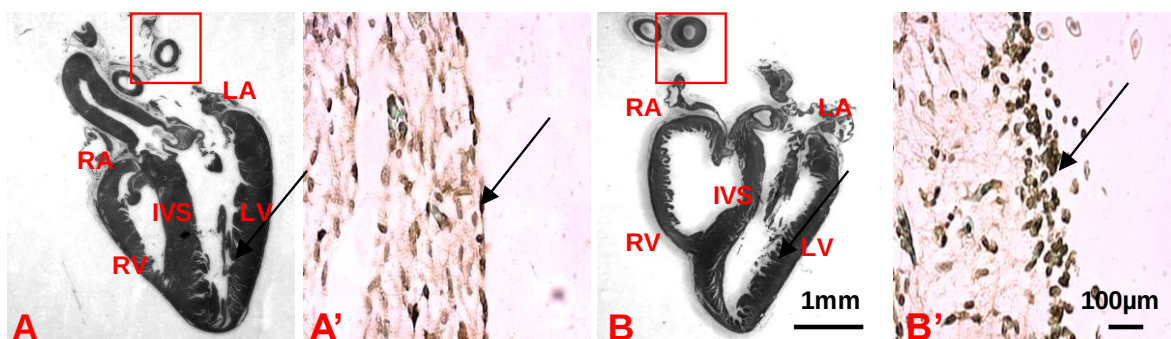


Figura 21. Sección frontal de un corazón de embrión de pollo de 8 días de desarrollo control (A) y tratado (B). 21 A', 21 B'. TUNEL positivo.

El cultivo de células mioblásticas de corazón tratadas con extracto de semilla hindú ® a la concentración de 0,6 µg/ml, presentan una reducción del citoplasma que equivale al 30,42% con respecto al control (Fig. 22)

Células mioblasto cardíaco en gota pendiente, control y tratado con extracto acuoso de semilla hindú ®.

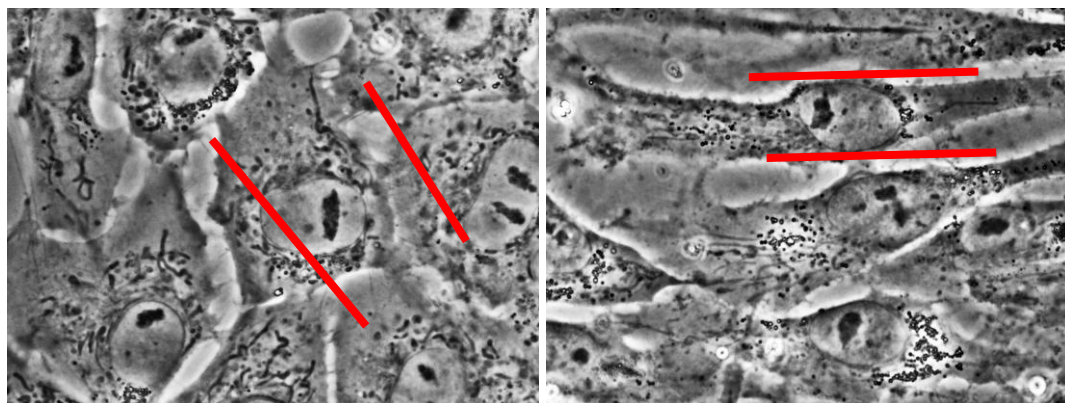


Figura 22. Cultivo de mioblastos cardíacos en gota pendiente, control (A) y tratado con el extracto acuoso de semilla hindú ® (B).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar en los registros fotográficos de muestras representativas de monocapas de mioblastos cardíacos, controles, tratados e incubados con NA y (DiOC13) (Fig.23), compara la población control y la población de mioblastos tratada extracto acuoso de semilla hindú ®. El marcaje fluorescente emitido por mioblastos cardíacos incubados con NA, se expresó con un color naranja de aspecto granular, característico de la morfología de los lisosomas, mientras que en el citoplasma se puso en evidencia una tonalidad verde pálido y en el núcleo una fuerte emisión verde brillante. El patrón de emisión descrito corresponde al control. Mientras que con el marcaje fluorescente emitido por los mioblastos tratados con extracto acuoso de Semilla Hindú ®; cambió el patrón de emisión de fluorescencia (Fig. 23). Se observó una fuerte emisión verde a nivel del núcleo y poca emisión naranja en el citoplasma, ubicando los lisosomas de forma dispersa. El marcaje fluorescente emitido por mioblastos cardíacos incubados con (DiOC13), se expresó con color un verde brillante, de aspecto fibrilar

como la morfología microscópica de las mitocondrias y con ubicación en el citoplasma. Mientras que en el núcleo contrastaba sin marcaje evidente. En contraste con el marcaje fluorescente emitido por los mioblastos tratados con extracto acuoso de Semilla Hindú ®; este modificó el patrón de emisión de fluorescencia emitido por las mitocondrias, algunas de ellas en forma redondeada (Fig. 23.D). Se observó, una fuerte emisión verde brillante a nivel del núcleo y verde claro en los restos de citoplasma.

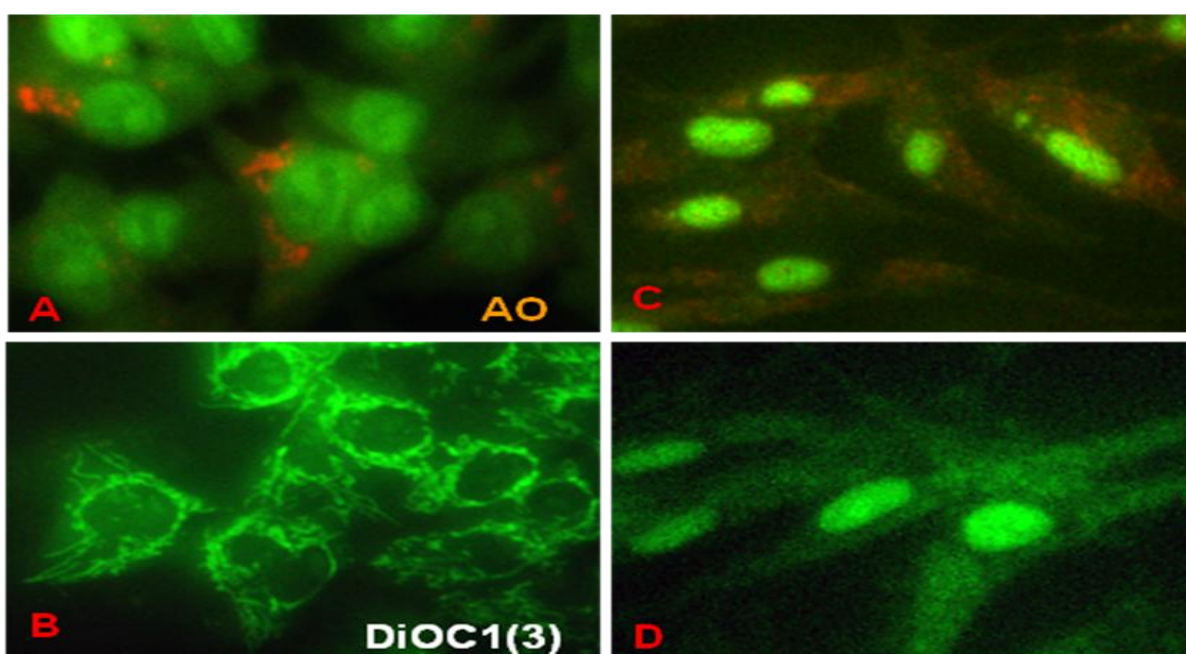


Figura. 23. Microfotografía de mioblastos cardíacos, vivos en cultivo de gota pendiente previo (B) y posterior a 1 h (D) con 0,1 ml de extracto acuoso de semilla hindú ® (0,6µg/ml) e incubados con DiOC13. Se observa claramente la visión selectiva de los lisosomas (AO) y mitocondria DiOC13. Al tratar los mioblastos extracto acuoso de Semilla Hindú ® la visión selectiva de los lisosomas y las mitocondrias desaparecen 64x.

DISCUSIÓN.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se resaltan como aspectos importantes para la discusión las características físico-químicas, los cambios a nivel funcional del corazón y la expresión de los daños tisulares y celulares, causados por el extracto acuoso de Semilla Hindú ® en el corazón embrionario "*in vivo*" e "*in vitro*".

De acuerdo a los estudios taxonómicos se puede clasificar la Semilla Hindú ® como la especie *Thevetia peruviana*, ya que presentan características taxonómicas similares.

La Mencionada planta es originaria del centro y sur de América (*Vinca minor* L., *V. mayor* L.), aunque se refiere también que su procedencia corresponde a la India Oeste. (Eddleston y col., 2000) Actualmente se encuentra distribuida en distintas regiones tropicales y subtropicales del mundo, (Bruneton; 2001; Ravindra y col., 1990; Eddleston y col., 2000; Martínez y col., 2002; Morales, F., 2005; Villar y col., 2006; Torres, 2009). Etimológicamente su nombre científico se relaciona con André Thévet (1502-1590), misionero francés que colectó plantas en Sudamérica.

La *Thevetia peruviana* pertenece a la familia Apocynaceae y también se la conoce como Yellow Oleander, Adelfa amarilla, Azuceno, Laurel Amarillo, Flor del Perú, etc. (Bruneton; 2001; Ravindra y col., 1990; Eddleston y col., 2000).

El grupo de las adelfas hace referencia a dos especies de plantas, *Nerium oleander* conocida también como adelfa común y *T. peruviana* o adelfa amarilla. Ambas poseen entre sus principios activos glucósidos cardíacos que producen un cuadro similar de

intoxicación, como de sobredosis de digitálicos (Omolar y col., 2007, Bruneton; 2001; Eddleston y col., 2000).

De acuerdo a los análisis químicos realizados, a través de la técnica Ultravioleta Visible se evidenció con la presencia de la banda de absorción a $216 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$, característica del oleandrina (glucósido cardíaco) de acción similar a los glucósidos digitálicos que genera un efecto inotrópico positivo sobre las células cardíacas.

Los efectos cardíacos generados se explican por la interferencia en la bomba de Na^+/K^+ ATPasa del miocardiocito que lleva a una depleción del K^+ intracelular y aumento del Na^+ ; lo que consecuentemente hace aumentar la liberación de Ca^{+2} desde el retículo sarcoplásmico. Estos disturbios electrolíticos afectan la conductibilidad eléctrica, generando todo tipo de alteraciones del ritmo cardíaco (acelerado al principio que luego se hace lento que lo normal al avanzar la reacción), como taquicardia, bradicardia, bloqueo aurículo-ventricular, fibrilación. Aunado a esto se genera un aumento de la contractilidad miocárdica y una estimulación vagal. Llevando a la muerte por falla cardíaca aguda (Soto y col, 2006).

Cabe destacar que en la actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana* realizada por Torres en el 2009, se ha referenciado a la presencia de cianuro, pero no se refleja en que proporciones se encuentra este. Siendo un gran aporte para la comunidad científica y al personal de salud que manejan casos clínicos de intoxicación el haber determinado la concentración de cianuro en diversas partes de la semilla, lo cual arrojó que contienen cianuro en proporciones de $3,234 \text{ ppm} \pm 0,05\%$ en la mitad de la semilla, la misma fue sometida a procesos de maceración y posteriormente analizada con la técnica instrumental de fotocolorimetría.

De acuerdo al mecanismo de acción del cianuro este es capaz de inhibir la cadena respiratoria ya que afecta a prácticamente todas las metaloenzimas, pero sus principales efectos tóxicos derivan de su unión al Fe^{+++} en los grupos Hem de la citocromo oxidasa mitocondrial, inhibiendo el funcionamiento de la Cadena de Transporte de Electrones. Deteniendo las reacciones redox de la cadena respiratoria, no se libera energía, las bombas de protones no funcionan, por lo que no hay protones que regresen a través del complejo V, y la producción de ATP cesa.

Desde el punto de vista enzimático el bloqueo de la respiración celular ocasiona: imposibilidad para la utilización periférica de oxígeno, falta de generación de ATP y producción excesiva de ácido láctico. Lo que desencadena a nivel funcional una falla cardíaca, vasoconstricción arterial y/o coronaria que genera fallo de bomba.

Mecanismos que explican la disfunción del corazón asociados a la depresión contráctil y reducción del tiempo, ocasionando grandes cambios en la estructura del miocardio y alteraciones en organelos subcelulares como son las mitocondrias y los lisosomas, lo cual ocasiona muerte celular por apoptosis.

Mencionados componentes químicos presentes en la semilla se encuentran asociados a los signos y síntomas reportados en intoxicación de quienes han ingerido de manera constante y por periodos prolongados. El mecanismo de acción de los cardenólidos es similar al de los digitálicos con inhibición de la bomba Na/K ATPasa. (Eddleston y col., 2000 y Maringhini y col., 2002). Lo cual explica la presencia de los siguientes signos en personas que han consumido la semilla; alteraciones electrocardiográficas, bradicardia, diferentes grados de bloqueo A-V, reacción anafiláctica y edema de glotis (Aular y col., 2003). La sintomatología presentada por esta paciente, después de dos horas de la administración de las tabletas (alteraciones de la conducción nodal y A-V,

náuseas, vómito y diarrea) son similares a las referidas por otros investigadores. (Saravanapavananthan, 1988; Eddleston y col., 2000 y Maringhini y col., 2002). Otros estudios, han reportado: taquicardia, arritmias, parálisis, ataxia y desorientación (Oji y col 2000).

Además el presente trabajo ofreció un ejemplo de cardiotoxicidad experimental, inducida por un severo agente tóxico como es el extracto acuoso de semilla hindú ®, haciendo uso del corazón de embrión de pollo, en etapas tempranas del desarrollo, evaluado a través de herramientas semi-invasiva hasta el momento poco explotada como lo son el Acustocardiograma (ACG) y Cardiovideograma (CVG) a través de estos modelos se permitió la evaluación de señales de toxicidad, tales como alteraciones en la frecuencia cardíaca y la actividad contráctil. En el caso particular del acustocardiograma se evidencio un cambio en frecuencia cardiaca al administrar el extracto acuoso de Semilla Hindú ®.

El Cardiovideograma fue reforzado con el análisis de imágenes sobre los fotogramas, lo cual favoreció la estimación de la contracción pseudoperistáltica, iniciada en el atrio o porción auricular (A) y transmitida a través del Tronco Arterioso (TA), hacia la porción ventricular (V). Dicha contracción se encuentra relacionada con bandas pseudo-circulares de miofibrillas que rodean el tubo cardíaco en etapas tempranas del desarrollo. El modelo de cardiotoxicidad reproduce señales de acción tóxica inducida por digitalicos, caracterizada por otros investigadores, quienes han vinculado la acción tóxica de estos compuestos con un vaciado completo de la cavidad ventricular durante la sístole, muy probablemente debido a que el fármaco aumenta la capacidad de la fibra muscular para desarrollar tensión y acortarse. Esta condición hace que el ventrículo sea capaz de desarrollar una presión suficiente, durante la sístole, para incrementar la capacidad

sistólica. Además se perdió la resistencia aórtica lo cual fue reflejado en un aumento del llenado aórtico, como ha sido demostrado con nuestro modelo experimental. Con esta interpretación, cabe destacar que la cardiotoxicidad inducida por el extracto acuoso de Semilla Hindú ®, puede ser claramente analizada en el modelo biológico de embrión de pollo, especialmente a través del registro de los cambios en la frecuencia cardíaca (FCP), acompañados de irregularidades en la actividad contráctil como ha sido observado en humanos.

CONCLUSIONES.

- A. De acuerdo a los estudios taxonómicos se puede clasificar la Semilla Hindú ® como la especie *Thevetia peruviana*, ya que presentan características taxonómicas similares.
- B. Poseen entre sus principios activos glucósidos cardíacos, evidenciado con la presencia de banda de absorción a $216 \text{ nm} \pm 1 \text{ nm}$, característica del oleandrina.
- C. Las semillas Hindú ® además contienen cianuro en proporciones de $3,234 \text{ ppm} \pm 0,05\%$ en semillas enteras sometidas a procesos de maceración. Capaz de inhibir la cadena respiratoria, inhibiendo el funcionamiento de la Cadena de Transporte de Electrones.
- D. Los mecanismos que explican la disfunción del corazón están asociados a la depresión contráctil y reducción del tiempo, ocasionando grandes cambios en la estructura del miocárdio y alteraciones en organelos subcelulares como son las mitocondrias y los lisosomas, lo cual ocasiona muerte celular por apoptosis.
- E. Los componentes químicos presentes en la semilla se encuentran asociados a los signos y síntomas reportados en intoxicación de quienes han ingerido de manera constante y por periodos prolongados; alteraciones electrocardiográficas, bradicardia, diferentes grados de bloqueo A-V.
- F. El Acustocardiograma (ACG) y el Cardiovideograma (CVG) permitieron evaluar las señales de toxicidad, tales como alteraciones en la frecuencia cardíaca

y la actividad contráctil, las cuales se vieron alteradas con la presencia del extracto acuoso de semilla hindú ®.

G. Por lo tanto, el uso del embrión de pollo en etapas tempranas del desarrollo, como modelo cardíaco “in vivo”, con la aplicación con el método por nosotros llamado Cardiovideograma (CVG), resulta una alternativa para el estudio de la cardiotoxicidad de la semilla hindú ® y para muchos otros agentes tóxicos de similar potencialidad cardiotóxica.

REFERENCIAS

- Adair T, Gay W y Montani J. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1990; 259: R393-R404.
- Akiyama R, Ono J y colaboradores. Noninvasive determination of instantaneous heart rate in developing avian embryo by means of acoustocardiogram. *Med. Biol. Eng.* 1990; 35: 323–327.
- Allard M, Schonekess B, Henning S y colaboradores. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol*. 1994; 267: 742–750.
- Álvarez M, Figueroa C, León R y Rodríguez M. Cardiotoxicidad de la cloroquina y protección del rojo de rutenio sobre el corazón de embrión de pollo. *Informe Med.* 2004; 6 (4): 121-128.
- Armitage P y Colton T. Quantal Response Models. En: *Encyclopedia of Biostatistics*. Segunda Edición. Wiley, 2005. p. 4738-4745.

Arany Z, Novikov M, Chin S, Rosenzweig A y Spiegelman B. Transverse aortic constriction leads to accelerated heart failure in mice lacking PPAR-gamma coactivator 1 alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006; 103:10086–10091.

Aular Y, Peña M, Pérez Á y Díaz M. Intoxicación por la administración de tabletas de Thevetia peruviana como tratamiento para bajar de peso: presentación de un caso. *Rev. Toxicol*. 2003; 20: 221-223.

Azevedo J, Ferreira A, Oliveira F, Souza J y Junqueira L. Development of a Matlab software for analysis of heart rate variability. *Dept. of Electr. Eng., Brasilia Univ., Brazil*. 2002.

Balinsky B. Introducción a la embriología. Ediciones Omega, Barcelona-España. 1978. p. 343-347 y 441-450.

Berenji K, Drazner M, Rothermel B y Hill J. Dose load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?. *Am J Trop Paediatr*. 2005; 6(4):289–291.

Brewster D. Herbal poisoning: a case report of a fatal yellow oleander poisoning from the Solomon Islands. *Ann Trop Paediatr*. 1986; 6(4):289–291.

Brigham E. The Fast Fourier Transform and its Applications. Englewood Cliffs, NJ: Prentice- Hall, Inc. 1988; p. 448.

Bruneton J. Toxic Plants Dangerous to Humans and Animals. Intercept, Hampshire UK. 1999; p. 125 - 130.

Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales, 3ª ed., Acribia. Zaragoza, p. 1099

Burelle Y, Wambolt R, Grist M, Parsons HL, Chow J, Antler C, Bonen A, Keller A, Dunaway G, Popov K y colaboradores. Regular exercise is associated with a protective metabolic phenotype in the rat heart. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004; 287: 1055–1063.

Burggren W y Keller B. Ontogeny of Cardiovascular Systems: Molecules to Organisms. New York: Cambridge University Press. 1997.

Carlson B. *Embriología Básica de Patten*. Quinta Edición. México: Interamericana McGraw Hill; 1990. Apéndice 1. p. 647-709.

Desarrollo del feto humano. [Consulta: 20 de Diciembre de 2009]; Disponible en: <http://www.icarito.cl>

Díaz M, Bustos M, Bustos M, Espinoza A. Pruebas de toxicidad acuática: Fundamentos y métodos. Bogotá: Universidad Nacional de Colombia. 2004; p. 94-100.

Díaz M, Bulus G y Pica Y. Métodos Estadísticos para el Análisis de Resultados de Toxicidad. En: Castillo, G. (Comp.). Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. [Libro en línea] 2004. Centro Internacional Para El Desarrollo, Canadá. [Consulta: 10 de Diciembre de 2007]; Disponible en: http://www.idrc.ca/es/ev-66572-201-1-DO_TOPIC.html.

Dorn G y Force T. Protein kinase cascades in the regulation of cardiac hypertrophy. J Clin Invest. 2005; 115:527–537.

Dorn G, Robbins J y Sugden P. Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation. Circ Res. 2003; 92: 1171.

Eddleston M, Ariaratnam C, Meye W, Perera S, Kularatne A, Attapatta S, Sheniff M y Warrell D. Epidemic of Self Poisoning with Seeds of the Yellow Oleanders Tree (Thevetia peruviana) in Northerns Sir Lamka; Trop. Med. Int. Health. 1999; 4(4): 266-273.

Eddleston M, Ariaratnam C, Sjöström L, Jayalath K, Rajakanthan y colaboradores. Acute yellow oleander (Thevetia peruviana) poisoning: cardiac arrhythmias,

- electrolyte disturbances, and serum cardiac glycoside concentrations on presentation to hospital. *Heart*. 2000; 83:301-306.
- Eddleston M y Persson H. Acute plant poisoning and antitoxin antibodies. *J. Toxicol.clin toxicol*. 2003; 41 (3): 309-15.
- Fotakis G y Timbrell J. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. 2006; 160 171–177.
- Fox S. Fisiología humana. Séptima Edición. España: Mc Graw Hill; 2003. p. 374 - 419.
- Flórez J, Armijo J y colaboradores. Farmacología humana. España: Elsevier; 2004. p. 172-173, 640-644.
- Freshney I. Culture of Animals Cells. A Manual of Basic Techniques. 4ta Edición. New York-E.E.U.U: Wiley-Liss; (2005) p. 152, 156-159.
- Frohlich E, Apstein C, Chobanian A y colaboradores. The heart in hypertension. *N Engl J Med*. 1992; 327(14):998–1008.
- García R. Laboratorio de Anatomía Patológica. España: Mc Graw Hill; 1993. p. 405-425.

Gayton A. Tratado de fisiología médica. Quinta Edición. México: Interamericana; 1976. p. 357-383.

Gilbert S. Developmental Biology. Sexta Edición. Massachusetts – E.E.U.U.: Sinauer Associates, Inc Publishers; 2000. p. 471-490.

Grossman W. Cardiac hypertrophy: useful adaptation or pathologic process. Am J Med. 1980; 69: 576-84.

Guadalajara J. Entendiendo la hipertrofia ventricular izquierda. Arch Cardiol Mex. 2007; 77: 175-180.

Guadalajara J, Gual J, Martínez S, Monobe F y Cervantes J. La hipertrofia miocárdica en la insuficiencia aórtica como mecanismo de compensación. Implicaciones para la indicación quirúrgica. Arch Inst Cardiol Mex. 1992; 62: 351-360.

Hamburger V y Hamilton H. A series of normal stages in the development of the chick embryo. Develp. Dynamic. (1992); 195: 231-272.

Haring O, Patterson J y Sarche M. Prenatal development of the cardiovascular system in the chicken. Arch Pathol. 1970; 89: 537-547.

Harris D. Análisis químico cuantitativo. Tercera Edición. España: Editorial Reverte; 2007.

Henderson L. Alien Weeds and Invasive Plants. Plant Protection Research Institute, Handbook No. 12, ARC, Pretoria 2001.

Higgins D y Pappano A. Development of transmitter secretory mechanisms by adrenergic neurons in the embryonic chick heart ventricle. Dev Biol. 1981; 87: 148-162.

Hodach RJ, Gilber EF, Fallon JF (1974). Aortic arch anomalies associated with the administration of epinephrine in chick embryos. Teratology. 9: 203-209.

Langford S y Boor P. Oleander Toxicity: An examination of Humans and Animal Toxic Exposures. Toxicol. 1996; 109(1): 1-13.

Latarjet M y Ruiz L. Anatomía humana. Buenos Aires: Editorial médica Panamericana; 1983. p. 1025-1056.

Lehman J, Barger P, Kovacs A, Saffitz J, Medeiros D y Kelly D. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. J Clin Invest. 2000; 106:847–856

LeGrande MC, Pfaff GH, Shideman FE (1996). Initiation of vagal control of Heart rate in the embryonic chick. *Ant. Rec.* 15, 163-166.

Lorell B y Carabello B. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* 2000; 102: 470–479.

Marín J y Goldenthal M. La mitocondria y el corazón. *Res Esp. Cardiol.* 2002; 55: 1293 - 1310.

Maringhini G, Notaro L, Barberco O, Giubilato A, Butera R y Di Pasquale P. Cardiovascular glycoside like intoxication following ingestion of thevetia nereifolia/ peruviana seeds: a case report. *Ital Heart J.* 2002; 3 (2): 137-40.

Martínez M, Moreno L, Luna M y colaboradores. Acute Toxicity of Thevetia peruviana in Rodents. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 2002; 45: 131-133.

Massie B, Schaefer S, Garcia J, McKirnan M, Schwartz G, Wisneski J, Weiner M y White F. Myocardial high-energy phosphate and substrate metabolism in swine with moderate left ventricular hypertrophy. *Circulation.* 1995; 91:1814–823.

Minda P. Compendio de anatomía patológica. España: Elsevier; 1998. p. 27-29.

Mitchell I y Cotran R. Lesión, adaptación y muerte celular. En: Robbins Patología humana. España: Elsevier; 2003. p. 3-14.

Moore K y Dalley A. Anatomía con orientación clínica. Quinta Edición. México: Interamericana; 2007. p. 38-44.

Morales F, Ocampo M y Murillo F. *Thevetia peruviana* (Pers) K. Schum. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica. [Documento en línea]. 2001. [acceso 20 de Julio de 2007] Disponible en: <http://darnis.inbio.ac.cr/FMPro?-DB=UBIpub.fp3&-lay=WebAll&Format=/ubi/detail.html&-Op=bw&id=1977&-Find>

Nadal- Ginard B. Inducción de nuevos cardiomiocitos en el corazón adulto: futuro de la regeneración miocárdica como alternativa de trasplante. Rev. Esp. Cardiol 2001; 54:543-550.

Nishibatake M, Nakasawa M, Tomita H, Ikeda K, Takao A. Imagen analysis of cardiac contraction in the early stages of the chick embryo. En *Developmental Cardiology: Morphogenesis and Function*. Mount Kisco, NY, Futura Publishing Co., Inc©. (1990); Cap. 22:305- 314.

Nueva Enciclopedia Médica Ilustrada. Madrid: Delair Publishing Comapany, Inc; 1982. Tomos 1 y 4 p. 245-242 y 1039.

Oji O y Okafor Q. Toxicological Studies on Stem bark, leaf and seed Kernel of yellow oleander (*Thevetia peruviana*). *Phytothes. Res.* 2000; 14 (2): 133-135.

Omolaro O. y Ibiyemi S. Extractability of Thevetia peruviana glycosides with alcohol mixture. African Journal of Biotechnology. 2007; 6 (18):2166-2170.

Prados J, Melguizo C, Marchal J, Velez C, Alvarez L y Aranega A. Estudio inmunohistoquímico de los cambios en la expresión de la α -actinina durante el desarrollo cardiaco de pollo. Rev. Chil. Anat. 1998; 16(2):255-261.

Ravindra F y Deepthi W. Thevetia peruviana. National Poison Information Centre General Hospital. London. IPCS. INTOX. Databank. 1990.

Ritchie R y Delbridge L. Cardiac hypertrophy, substrate utilization and metabolic remodelling: cause or effect?. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006; 33:159–166

Ross M, Gordon K y Wojciech P. Histología. Texto y Atlas Color con Biología Celular y Molecular. 4ta Edición. Buenos Aires-Argentina: Editorial Panamericana. 2005; p 74-77 y 345-348.

Ruijtenbeeh K, Mey J y Blanco C. The Chicken Embryo in Developmental Physiology of the Cardiovascular System: A Traditional Model with New Possibilities. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2002; 283: R549-R551.

Saraswat D, Garg P y Saraswat M. Rare poisoning with cerebra thevetia (yellow oleander). Review of 13 cases of suicidal attempt. J Assoc Physicians India. 1992; 40:628-9.

Saravanapavanthan N y Ganeshamoorthy J. Yellow oleander poisoning. A Study of 170 cases. Forensie sei Int. 1988; 36: 247-250.

Sharon M, Heitkemper M y Durksen S. Enfermería medicoquirúrgica: Valoración y cuidados de problemas clínicos. España: Elsevier; 2004. p. 772-783.

Sequera D y González M. Informe técnico - científico sobre los efectos tóxicos de la Thevetia (Semilla Hindú proveniente de la venta ilícita). Caracas. Laboratorio Central de la Guardia Nacional de Venezuela; 2007.

Sequera D, Ercolino J y Alvarez M. Embrión de Pollo: Un modelo con cardiovideograma para el estudio de la toxicidad experimental inducida por *Thevetia peruviana*. RETEL. 2010: 37-48.

Singh K, Kumar A, Vimlesh M y col. A REVIEW ON: *Thevetia peruviana*. International Research Journal of Pharmacy. 2012; ISSN 2230-8407: 74 – 77.

Skoog D, Holler J y Crouch S. Fundamentos de Química analítica. Cuarta Edición. España: Editorial Reverte; 2001.

Skoog D, Holler J y Crouch S. Principios de análisis instrumental. Sexta Edición. México: Editorial Cengage Learning; 2008.

Smith L y Wyngaarden J. Fisiología principios biológicos de la enfermedad. Segunda Edición. Argentina: Editorial medica panamericana; 1998. p. 779-801.

Sodeman W. Fisiopatología Clínica. Quinta Edición. México: Interamericana; 1978. p. 140-196.

Soto B, Fontenele J, Silva D, Reis P y Nóbega, J. Acute Intoxication From Neurium Oleander Pods. Trop. Anim. Health Prod. 2006; 38: 451-454.

Stern C y Bachavarova R. Early Chick Embryos in Vitro. Int. J. Develop. Biol. 1997; 41: 379-987.

Sugiyama T, Miyazaki H, Saito K, Shimada H y Miyamoto K. Chick Embryos as an Alternative Experimental Animal for Cardiovascular Investigations: Stable Recording of Electrocardiogram of Chick Embryos in Ovo on the 16th Day of Incubation. Toxicology and Pharmacology. 1996; 138: 262 - 267.

Tazawa H. Cardiac Rhythms in Avian Embryos and Hatchlings. Avian and Poultry Biology. Reviews. 2005; 16 (3):123-150.

Torres N. Actualización sobre intoxicación con *Thevetia Peruviana*. Revista de Toxicología en Línea (RETEL). 2009. Vol 19; 2-19.

Trump B y Berezsky I. Lesión celular y muerte celular. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. España: OIT. 2001; Cap: 33 p. 33.33-33.34.

Urbaneja B, Gugig M y Bello R. Cultivo de Tejidos Animales Trabajos de Laboratorio. Caracas: Universidad Central de Venezuela, Facultad de Ciencias, Escuela de Biología, 1975.

Van B, Van F y Van B. Poisonous Plants of South Africa. Briza Publications, Pretoria. 2002; p. 156 – 157.

Villar D y Ortiz J. Plantas tóxicas de interés veterinario: Casos clínicos. España: Elsevier. 2006.

Watt J y Breyer M. The Medicinal and Poisonous plants of Southern and Eastern Africa. Second Edition, Livingstone, London. 1962.

Wagner HN, Rhodes BA. Radioactive tracers in diagnosis of cardiovascular disease. Cardiovascular Diseases. (1972). Vol; XV(1): 1-24.