

Estudio de la toxicidad del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en ratas tratadas por vía oral durante 30 días

BALDERAS, Sheila*†, DEL TORO, Juan, ALVARADO, Brenda y LEÓN-Angel

Unidad Académica Multidisciplinaria Zona Huasteca-Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Recibido 3 de Julio, 2015; Aceptado 25 de Septiembre, 2015

Resumen

En México, de acuerdo con datos de la ENSANUT, 2012, 6.4 millones de mexicanos fueron diagnosticados con diabetes. Actualmente, existen diversos reportes en la literatura científica que avalan el uso de las plantas para el tratamiento de la DM2. *Justicia spicigera* (JS) está ampliamente distribuida en la Huasteca Potosina y recientemente ha sido demostrado que el extracto etanólico de JS tiene un efecto hipoglucemiante en modelos de ratas normoglicémicas y diabetizadas; sin embargo sólo se ha evaluado la toxicidad aguda por lo que es necesario evaluar la toxicidad por tiempos prolongados. La toxicidad oral se evaluó en ratas machos Wistar administradas diariamente por vía oral con el EEJS durante 30 días. Los resultados mostraron que la administración del EEJS indujo efectos adversos leves, sobre todo relacionados con anomalías en el comportamiento. Estudios adicionales se están desarrollando para determinar su toxicidad por periodos prolongados.

Toxicidad, *justicia spicigera*, Diabetes Mellitus tipo 2

Abstract

In Mexico, according to data from the ENSANUT, 2012, 6.4 million of Mexicans were diagnosed with diabetes mellitus (DM). Currently, there are several reports in the scientific literature supporting the use of plants for the treatment of T2DM. *Justicia spicigera* (JS) is widely distributed in Huasteca Potosina and its ethanolic extract (EEJS) has recently been shown that has a hypoglycemic effect in normoglycemic rats and streptozotocin-induced DM model; however only its acute toxicity has been evaluated. therefore, it is necessary to evaluate the toxicity for prolonged periods. Oral toxicity was evaluated by repeated dose administration model for 30 days. The results showed that administration of EEJS induced mild adverse effects, particularly related to behavioral abnormalities. Additional experiments are currently being carried out in our laboratory to evaluate its chronic toxicity.

Toxicity, *justicia spicigera*, Diabetes Mellitus tipo 2

Citación: BALDERAS, Sheila, DEL TORO, Juan, ALVARADO, Brenda y LEÓN-Angel. Estudio de la toxicidad del extracto etanólico de *Justicia spicigera* en ratas tratadas por vía oral durante 30 días. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias* 2015, 2-4: 531-537

* Correspondencia al Autor (Correo Electrónico: angel.leon@uaslp.mx)

† Investigador contribuyendo como primer autor.

Introducción

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es una enfermedad crónica degenerativa (ECD) que describe un desorden metabólico de múltiples etiologías y que está caracterizado por la presencia de una hiperglucemia crónica con alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas como resultados de los efectos de la secreción de la insulina, la acción de esta o de ambas (WHO, 1999). En México, de acuerdo con datos de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT, 2012), 6.4 millones de mexicanos fueron diagnosticados con diabetes.

Actualmente, existen diversos reportes en la literatura científica que avalan el uso de las plantas, sus extractos o sus compuestos activos con propiedades antibacterianas, antimicóticas, antiprotozoarias, relajantes y sedativas o bien contra diversas enfermedades como la hipertensión, el cáncer, y la DM2 (Jorge et al., 2013; Mata et al, 2013; Ortega-Ramírez et al., 2013; Alonso-Castro A et al., 2012; Alonso-Castro A et al., 2011; Jacobo-Salcedo et al., 2011; Alanís-Gárza et al., 2007; Argáez-López, 2003).

Justicia spicigera (JS), “Muicle o Muite” está ampliamente distribuida en la Península de Yucatán y la Huasteca Potosina. Existen reportes en la literatura sobre el uso en la medicina tradicional Mexicana de la infusión de hojas, así como la decocción de las partes aéreas para el tratamiento empírico de la DM2 (Graham, 1990; Braz et al, 2002; Arellano-Rodríguez et al, 2003; Meckes et al., 2004; Vega-Avila et al, 2009; Andrade-Cetto y Heinrich, 2005; Johnson et al, 2006). Recientemente, Ortiz-Andrade et al, 2012, demostraron que el EEJS presentó un efecto hipoglucemiante en ratas normoglicémicas. Efectos similares fueron observados en ratas diabetizadas con estreptozotocina.

Estudios toxicológicos del EEJS en modelos in vivo han sido realizados previamente. Alonso-Castro et al, 2012, evaluaron la toxicidad aguda del EEJS mostró que la dosis letal 50 (DL50) para la administración oral e intraperitoneal fue >5000 mg/kg. En dosis >1600 mg/kg se observaron alteraciones neurológicas (inmovilidad, mareo y sedación) en los ratones, sólo durante las primeras 4 h posteriores al tratamiento. Sin embargo, no existen reportes en la literatura sobre el estudio de la toxicidad del EEJS que permitan determinar su seguridad durante su uso a largo plazo en dosis repetidas. Por lo tanto, en el presente trabajo se llevará a cabo la evaluación de la toxicidad oral del extracto etanólico de Justicia spicigera en ratas Wistar tratadas por vía oral durante 30 días.

Metodología

La recolección del material vegetal se realizó en la comunidad de Tanchanaco perteneciente al municipio de Aquismón, S.L.P., (21° 40' 7" N, 99° 2' 4" W) en el mes de julio de 2014 en temporada pluvial. El secado se llevó a cabo a temperatura ambiente (TA) y a la sombra durante 7 días. La pulverización se realizó empleando un molino analítico (Oster). La obtención del extracto se hizo por el método clásico de maceración. Brevemente, 100 g de la planta pulverizada se colocaron en 900 mL de etanol absoluto (proporción 1:10, masa/volumen) y se mantuvo cubierto de la luz durante 7 días a temperatura ambiente.

Al término del proceso de maceración, la mezcla se filtró con papel filtro Whatman No. 2 y se concentró en rotavapor RII (BÜCHI Labortechnik) hasta eliminar el solvente. El extracto obtenido se mantuvo en refrigeración a 4 °C hasta la evaluación toxicológica.

Para la evaluación de la toxicidad oral se emplearon 36 ratas machos de la cepa Wistar, con peso corporal de 100 ± 20 g, procedentes de Harlan laboratories.

Antes de iniciar la evaluación, los animales fueron aclimatados durante 5 días bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), humedad ($70 + 5\%$) y ciclos de luz-oscuridad (12/12 horas). La alimentación consistió de una dieta standard a base de alimento Rodent Lab Chow 5001 y agua a libre demanda. Todos los ensayos fueron realizados en apego a la NOM-062-ZOO-2008.

El estudio de la toxicidad oral de dosis repetidas durante 30 días se llevó a cabo de acuerdo a los términos establecidos en la guía para la evaluación de químicos No. 407 de la OECD, 2008. Los animales fueron divididos en 6 grupos con 6 animales cada uno: Control (DMSO al 1% en solución fisiológica), Grupo 1 - 10 mg/Kg/día, Grupo 2 - 25 mg/Kg/día, Grupo 3 - 50 mg/Kg/día, y Grupo 4 - 100 mg/Kg/día. La administración del extracto se realizó diariamente por vía oral durante 30 días. Antes y al final del estudio se determinaron los valores basales hematológicos (RBC, HGB Y HTC) y glucemia. Adicionalmente, se llevó el registro del alimento consumido semanalmente, así mismo, los animales fueron pesados semanalmente y se determinó la ganancia de peso semanal y al finalizar el estudio. Durante todo el estudio, se mantuvo una estricta vigilancia del estado general de los animales registrando cualquier alteración en la apariencia macroscópica de los mismos, las condiciones de la piel y mucosas, mortalidad, alteraciones neurológicas (inmovilidad y/o sedación), y anomalías en el comportamiento (agresividad, irritación, pasividad). Al finalizar los 30 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados por anestesia con cloroformo.

Los resultados obtenidos en cada experimento fueron analizados mediante el programa estadístico SigmaStat versión 12.1 (Jandel Scientific, San Rafael, CA) y Statistica 8. Las diferencias estadísticas fueron determinadas mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA ONE-WAY) seguido por un prueba post hoc de Tukey. Un valor de $p \leq 0.05$ se consideró como estadísticamente significativo.

Resultados

En las Tablas 1, 2 y 3 se muestran los resultados obtenidos del conteo de RBC y los niveles de HGB y HCT durante todo el periodo de estudio. Se puede observar que en el conteo de RBC el grupo al cual se administró 10 mg/Kg del EEJS mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a la comparación entre periodos de estudio, basal (25%, $p < 0.05$) y en comparación con el grupo CTL a los 30 días (24%, $p < 0.05$); además se aprecia que los niveles de HTC (Tabla 3) para los grupos tratados con 10 mg/Kg (20.9%, $p < 0.05$) y 25 mg/Kg (18.99%, $p < 0.05$) mostraron diferencias en comparación con el resultado del periodo de evaluación basal. En cuanto al análisis de HGB, en la Tabla 2 se muestra que no existió diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos de estudio en el periodo basal y a los 30 días.

Los resultados del análisis de glicemia en las ratas Wistar se muestran en la Tabla 4. Los niveles de glucosa en sangre analizados en los grupos de estudio en el periodo basal y a 30 días se mantuvieron estables sin mostrar diferencias estadísticamente significativas con excepción del grupo de 100 mg/Kg en el cual se observó un aumento del 28% ($p < 0.05$) con respecto al CTL a los 30 días y en el mismo grupo en los resultados basales.

Grupo de estudio	RBC-10x6 (/uL)	
	Basal	30 días
CTL	7.78 ± 0.659	8.29 ± 0.350
10 mg/Kg	8.33 ± 0.788	6.32 ± 1.931 * #
25 mg/Kg	8.91 ± 0.635	8.02 ± 0.220
50 mg/Kg	8.32 ± 0.698	8.19 ± 0.625
100 mg/Kg	7.96 ± 0.683	8.19 ± 0.125

Tabla 1 Conteo de RBC en sangre periférica de ratas Wistar al finalizar el tratamiento con el EEJS y datos basales.

Grupo de estudio	HGB (g/dL)	
	Basal	30 días
CTL	15.93 ± 1.855	15.88 ± 0.766
10 mg/Kg	17.93 ± 1.817	14.30 ± 2.828
25 mg/Kg	17.60 ± 1.460	14.83 ± 0.499
50 mg/Kg	16.92 ± 1.507	15.38 ± 1.175
100 mg/Kg	16.27 ± 1.301	15.90 ± 0.264

Tabla 2 Niveles de HGB en sangre periférica de ratas Wistar al finalizar el tratamiento con el EEJS y datos basales.

Grupo de estudio	HCT (%)	
	Basal	30 días
CTL	47.13 ± 5.050	46.60 ± 1.926
10 mg/Kg	51.72 ± 3.761	40.90 ± 8.343*
25 mg/Kg	53.43 ± 4.016	43.28 ± 0.665*
50 mg/Kg	50.75 ± 3.844	45.02 ± 3.454
100 mg/Kg	48.38 ± 3.385	46.57 ± 0.750

Tabla 3 Niveles de HCT en sangre periférica de ratas Wistar al finalizar el tratamiento con el EEJS y datos basales.

Grupo de estudio	GLU (g/dL)	
	Basal	30 días
CTL	144.68 ± 10.878	129.35 ± 11.286
10 mg/Kg	119.46 ± 18.537	134.31 ± 11.733
25 mg/Kg	129.33 ± 10.133	144.16 ± 9.625
50 mg/Kg	114.88 ± 4.904	142.10 ± 17.203
100 mg/Kg	125.46 ± 15.032	160.73 ± 23.954**

Tabla 4 Niveles de GLU en sangre periférica de ratas Wistar al finalizar el tratamiento con el EEJS y datos basales.

En la Figura 1 se observan los promedios de los pesos registrados de cada grupo de estudio durante el periodo de evaluación. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los grupos de estudio.

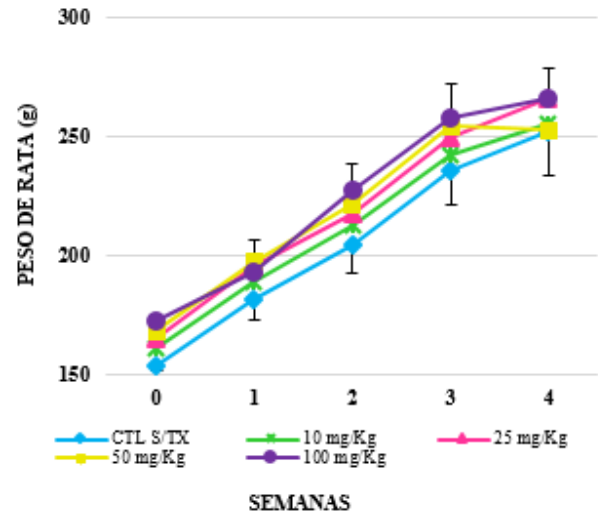


Figura 1 Control de peso corporal de los animales tratados con el EEJS durante 30 días.

La ganancia de peso obtenida en cada grupo de estudio muestra en la Figura 2. Los resultados obtenidos muestran que la ganancia de peso de los grupos tratados con el EEJS no mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo CTL, ($p < 0.05$).

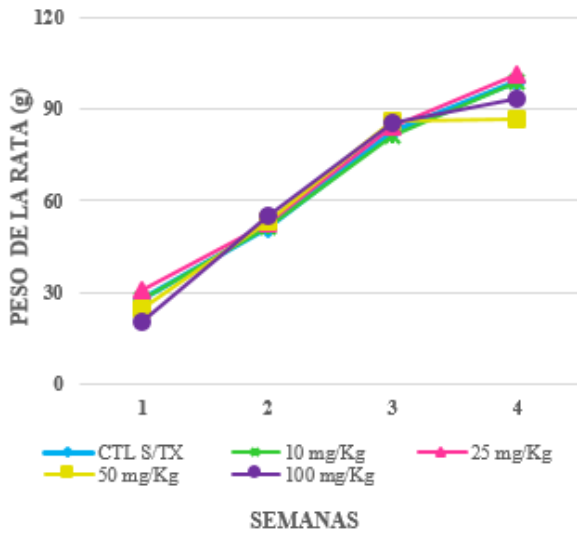


Figura 2 Control de la ganancia de peso de los grupos de estudio de ratas Wistar al inicio y durante el periodo de tratamiento con el EEJS.

El análisis estadístico de los promedios del pesaje del alimento ingerido en cada grupo, semanalmente y al finalizar el estudio, mostraron que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos que recibieron el EEJS comparados con el grupo CTL, después de 30 días de tratamiento. (No se muestra la figura).

En la Tabla 5 se muestran los resultados obtenidos del monitoreo del estado general de las ratas Wistar durante todo el estudio.

Se observa que no se presentó mortalidad en ninguno de los grupos culminando la evaluación con todos los animales asignados desde el inicio del estudio. Respecto a las alteraciones neurológicas se observa que no ocurrieron cambios en cuanto a la inmovilidad y sedación; sin embargo, los grupos tratados con 50 mg/Kg y 100 mg/Kg presentaron agresividad e irritabilidad. Los cambios en las condiciones de piel se presentaron en los grupos de 25 mg/Kg, 50 mg/Kg y 100 mg/Kg.

Estado general de las ratas Wistar		grupos de estudio				
		CTL	10*	25*	50*	100*
mortalidad		0/6	0/6	0/6	0/6	0/6
alteraciones neurológicas	inmovilidad	sc	sc	sc	sc	sc
	sedación	sc	sc	sc	sc	sc
anormalidades del comportamiento	agresividad	sc	sc	sc	+	++
	irritabilidad	sc	sc	sc	+	++
condiciones de piel y mucosas *	pasividad	sc	sc	sc	sc	sc
	piel	sc	sc	+	+	++

Tabla 5 Estado general de las ratas Wistar el periodo de estudio de 30 días.

+ Leve ++ Moderado +++ Intenso
SC: sin cambios

En este parámetro sólo se evaluaron las condiciones de la piel de las ratas Wistar ya que no se presentaron anormalidades en las mucosas.

mg/Kg

Conclusión

La administración diaria por vía oral del EEJS durante 30 días en un modelo in vivo demostró la presencia de efectos adversos leves, sobre todo relacionados con anormalidades en el comportamiento; sin embargo, es importante continuar con la evaluación del EEJS durante un periodo de tiempo prolongado para determinar su toxicidad crónica.

Agradecimientos

Al personal de apoyo técnico del Laboratorio de Investigación Biomédica. Un agradecimiento al Fondo de Inmersión a la Ciencia por el apoyo económico otorgado través del convenio C15-PIFI-06-01.01.

Referencias

- Alanís-Garza BA, González-González GM, Salazar-Aranda R, Waksman de Torres N, Rivas-Galindo VM. (2007). Screening of antifungal activity of plants from the northeast of Mexico. *J Ethnopharmacol*, 114(3):468-71.
- Alonso-Castro AJ, Villarreal ML, Salazar-Olivo LA, Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J Ethnopharmacol*, 133(3):945-72.
- Alonso-Castro JA, Maldonado-Miranda JJ, Zarate-Martinez A, Jacobo-Salcedo M del R, Fernández-Galicia C, Alejandro Figueroa-Zuñiga L, Abel Rios-Reyes N, Angel de León-Rubio M, Andrés Medellín-Castillo N, Reyes-Munguia A, Méndez-Martínez R, Carranza-Alvarez C. (2012). Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. *J Ethnopharmacol*, 143(1):292-8.
- Andrade-Cetto A, Heinrich M. (2005). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *J Ethnopharmacol*, 93,248–325.
- Arellano-Rodríguez JA, Flores Guido JS, Tun J, Garrido MM, Cruz Bojórquez. (2003). Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la península de Yucatán. *Etnoflora Yucatanense*, 20,5–6.
- Argáez-López N, Wachter NH, Kumate-Rodríguez J, Cruz M, Talavera J, Rivera-Arce E, Lozoya X. DIMSS Study Group, 2003. (2003). The use of complementary and alternative medicine therapies in type 2 diabetic patients in Mexico. *Diabetes Care*, 26(8):2470–1.
- Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT2012). Disponible en <http://ensanut.insp.mx/>. Consultada 21.01.14.
- Graham, VA. Delimitation and infra-generic classification of *Justicia* (Acanthaceae). (1990). *Kew Bulletin*, 43,551–624.
- Jacobo-Salcedo MdR, Alonso-Castro AJ, Salazar-Olivo LA, Carranza-Álvarez C, Gonzalez-Espindola LA, Dominguez F, Maciel-Torres SP, Garcia-Lujan C, Gonzalez-Martinez MdR, Gomez-Sanchez M, Estrada-Castillon E, Zapata-Bustos R, Medellin-Milan P, Garcia-Carranca A. (2011). Antimicrobial and cytotoxic effects of Mexican medicinal plants. *Nat Prod Commun*, 6(12),1925–8.
- Johnson L, Strich H, Taylor A, Timmermann B, Malone D, Teufel-Shone N, Drummond R, Woosley R, Pereira E, Martinez A. (2006). Use of herbal remedies by diabetic Hispanic women in the southwestern United States. *Phytother Res*, 20,250–5.
- Jorge VG, Ángel JR, Adrián TS, Francisco AC, Anuar SG, Samuel ES, Ángel SO, Emmanuel HN. (2013). Vasorelaxant activity of extracts obtained from *Apium graveolens*: possible source for vasorelaxant molecules isolation with potential antihypertensive effect. *Asian Pac J Trop Biomed*, 3(10):776-9.
- Mata R, Cristians S, Escandón-Rivera S, Juárez-Reyes K, Rivero-Cruz I. (2013). Mexican antidiabetic herbs: valuable sources of inhibitors of α -glucosidases. *J Nat Prod*, 76(3):468-83.
- Meckes M, David-Rivera AD, Nava-Aguilar V, Jimenez A. (2004). Activity of some Mexican medicinal plant extracts on carrageenan-induced rat paw edema. *Phytomedicine*, 11,446–51.

OECD. Guideline for the testing of chemicals No. 407. Repeated Dose 90-day study oral toxicity study in rodents. 2008.

Ortega-Ramirez LA, Rodriguez-Garcia I, Leyva JM, Cruz-Valenzuela MR, Silva-Espinoza BA, Gonzalez-Aguilar GA, Siddiqui MW, Ayala-Zavala JF. (2013). Potential of Medicinal Plants as Antimicrobial and Antioxidant Agents in Food Industry: A Hypothesis. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 10(3):397-404.

Ortiz-Andrade R, Cabañas-Wuan A, Arana-Argáez VE, Alonso-Castro AJ, Zapata-Bustos R, Salazar-Olivo LA, Domínguez F, Chávez M, Carranza-Álvarez C, García-Carrancá A. (2012). Antidiabetic effects of *Justicia spicigera* Schltdl (Acanthaceae). *J Ethnopharmacol*, 143(2):455-62.

Vega-Avila E, Espejo-Serna A, Alarcon-Aguilar F, Velazco-Lesama R. (2009). Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants. *P W Pharmacol Soc*, 52,78–82.

World Health Organization. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a WHO Consultation. Geneva: World Health Organization, 1999.