

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

Departamento de Farmacia

## TRABAJO DE DIPLOMA

Evaluación *in vivo* de la actividad antilitiásica del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav.

**Autor:** Elianet Orellana Rodríguez  
**Tutores:** Dr.C. Dulce Ma González Mosquera  
Dr.C. Yannarys Hernández Ortega  
MSc. Pedro César Quero Jiménez

Santa Clara,  
2019

**UCLV**  
Universidad Central  
"Marta Abreu" de Las Villas



**FQF**  
Facultad de  
Química y Farmacia

*Pharmacy Department*

## DIPLOMA THESIS

Title: Evaluation in vivo of the urolithiatic activity of the aqueous extract of the leaves of *Boldoa purpurascens* Cav.

Author: Eliannet Orellana Rodríguez  
Thesis Director: Dr.C. Dulce Ma González Mosquera  
Dr.C. Yannarys Hernández Ortega  
MSc. Pedro César Quero Jiménez

Santa Clara, 2019

Este documento es Propiedad Patrimonial de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, y se encuentra depositado en los fondos de la Biblioteca Universitaria “Chiqui Gómez Lubian” subordinada a la Dirección de Información Científico Técnica de la mencionada casa de altos estudios.

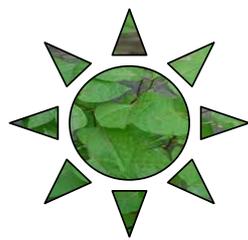
Se autoriza su utilización bajo la licencia siguiente:

**Atribución- No Comercial- Compartir Igual**

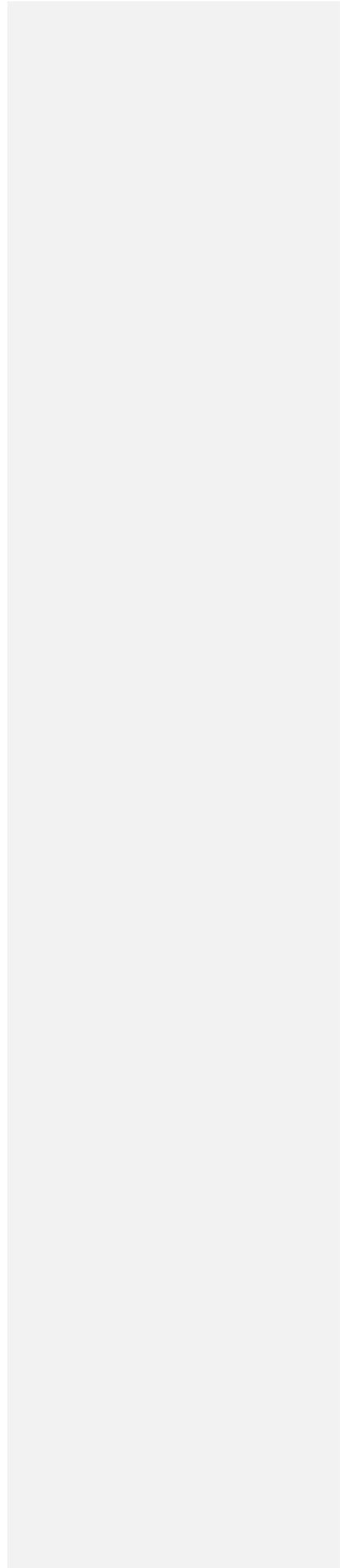


Para cualquier información contacte con:

Dirección de Información Científico Técnica. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Carretera a Camajuaní. Km 5½. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP. 54 830  
Teléfonos.: +53 01 42281503-1419

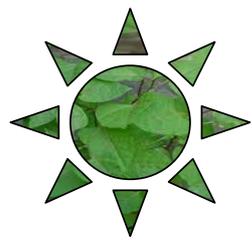


**Pensamiento**

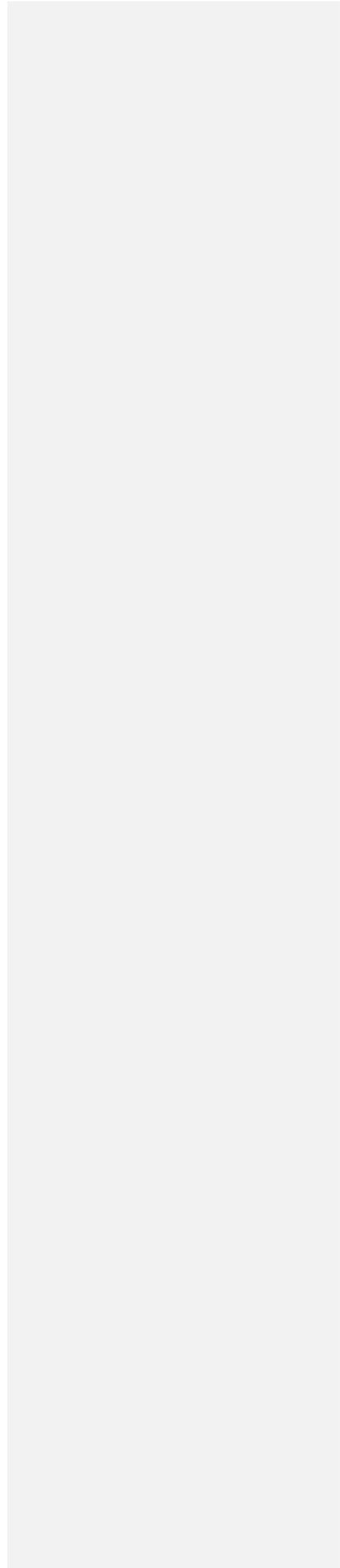


*"Si yo tuve la suerte de alcanzar algo, solamente se debe a que me apoyé en hombros de gigantes".*

*Isaac Newton*



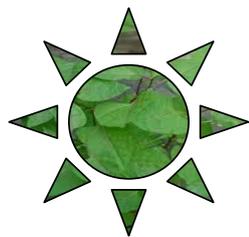
## *Dedicatória*



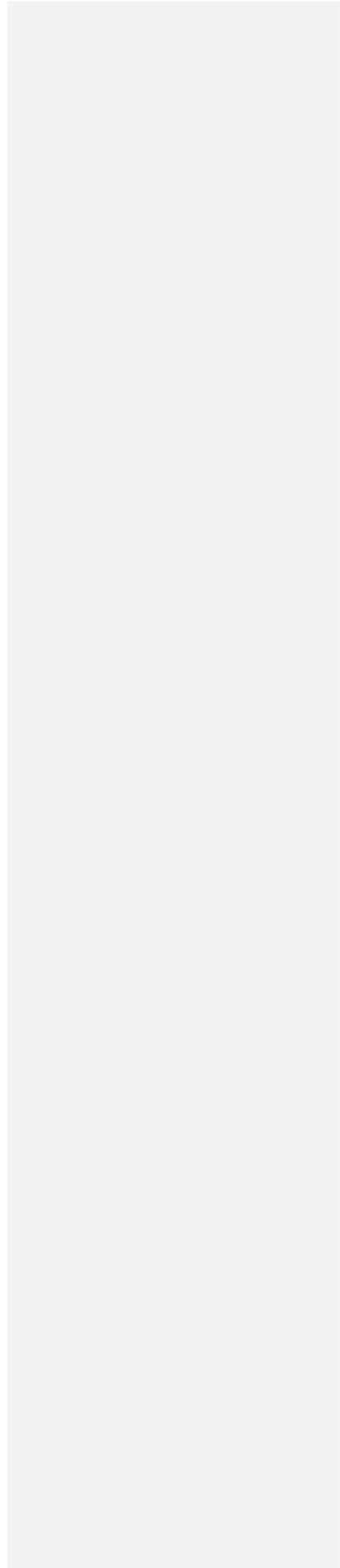
*A mis padres por haber sido y ser siempre  
mi apoyo.*

*A la memoria de mis abuelas Luz Bertha y  
Elena.*

*A quienes han estado conmigo en esta  
travesía, sin apartarse ni un momento de  
mi lado.*



# *Agradecimientos*



## AGRADECIMIENTOS

---

**“Sentir gratitud y no expresarla es como envolver un regalo y no darlo.”**

**William Arthur Ward**

Primeramente a mis padres **Ivonne** y **Julio Cesar**, porque ellos han sido el motor impulsor de todos mis logros, han compartido conmigo todos los momentos buenos y no tan buenos de mi vida, por su apoyo y amor incondicional.

A mis tutores **Dulce María**, **Yannarys** y **Pedro**, por tanta paciencia conmigo y por el apoyo en todo momento aún en tiempos difíciles, desde los inicios de esta investigación hasta puesto el último punto final.

A **Oswaldo Montenegro** por tantas horas dedicadas y siempre un sabio consejo que brindarme.

A todos los **profesores del departamento** de farmacia, así como aquellos que no pertenecen al departamento, pero que a lo largo de estos años han contribuido a mi formación personal y profesional.

A todos los buenos amigos que he hecho durante todos estos años: **Leidy Laura**, **Beisy**, **Arlettis**, **Lázaro Peña**, **Juan Carlos**, **Oslaidy**, **Dianelis**, **Yolanda**, **Nileymi**, **Disnel**, **Nori**, **Alejandra**, **Yani**, **Oswaldo** y **Niuber**, a todos por brindarme su amistad y darme tantas risas.

A mis compañeros de aula en la carrera de Química, **Rosa Amalia**, **Dani**, **Nielsy**, **Maikol**, de todos aprendí mucho, porque ha sido el mejor grupo de compañeros de estudio en el que he estado.

## **AGRADECIMIENTOS**

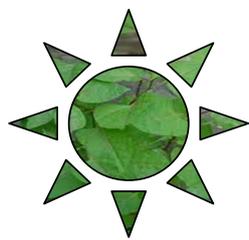
---

*A mis compañeros de aula actuales a Yoan por tantas noches largas de estudio, a Marquito el negrito y el blanquito, Adriana, Martha María, Yisel, Pepito, José Manuel, Lisandra, Laura y Eliany, en fin a todos gracias.*

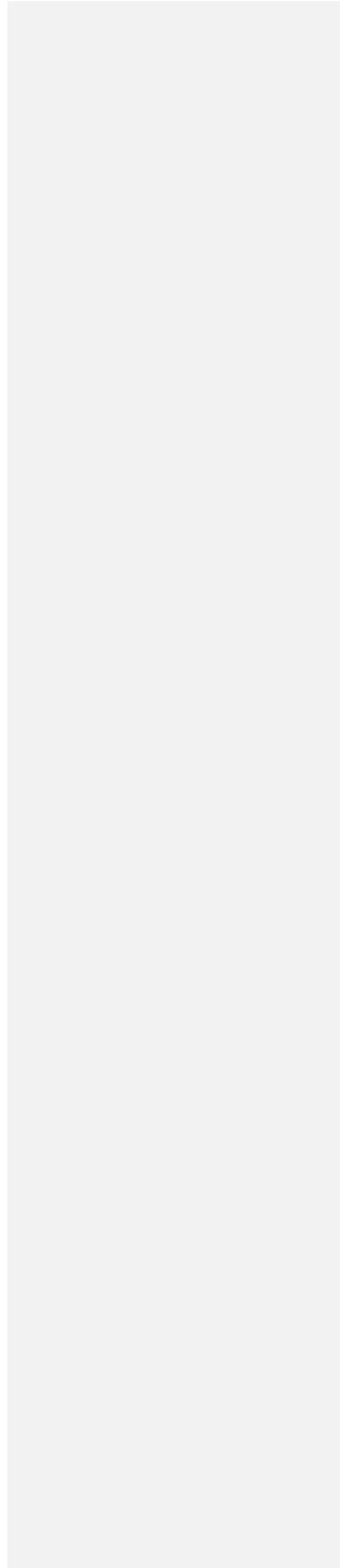
*Y para mí lo mejor de todo es terminar mi vida de estudiante sabiendo que puedo contar con personas maravillosas que a pesar de que algunos nos encontramos lejos eso no es impedimento para seguir queriéndonos: gracias a Anabelilla, Vivi, Patry y Jefferson. A todo muchas gracias por quererme mucho y por soportarme hasta en mis momentos de máximo estrés. Porque haberlos conocido me cambió la vida.*

*A todos los que creyeron que este día nunca llegaría.*

***A TODOS, SINCERAMENTE, MUCHAS GRACIAS!!!!!!!***

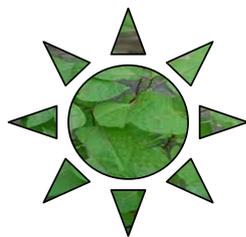


## *Resumen*

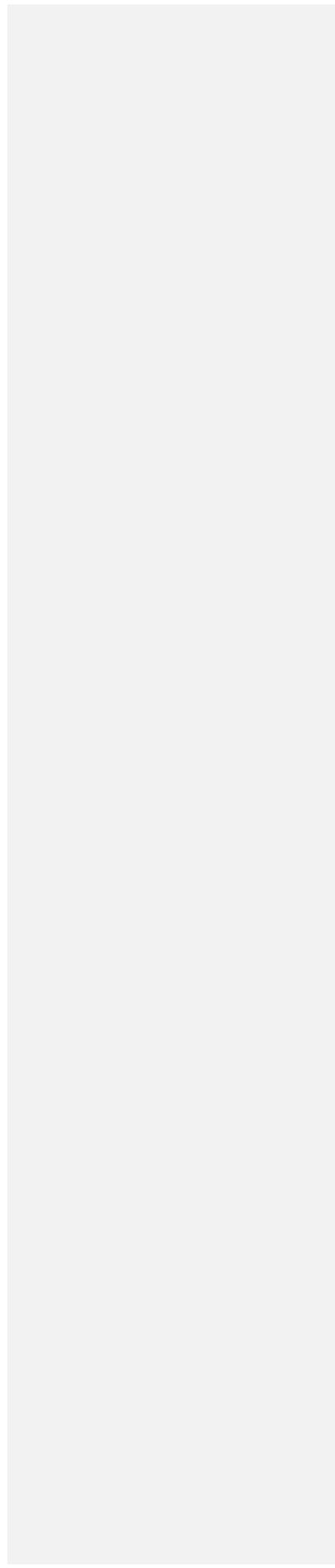


### Resumen

Se realizó un estudio experimental en la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas con el objetivo de evaluar la actividad antiurolitiásica del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav. Para ello se determinó dicha actividad a partir del extracto acuoso de la especie (dosis de 100, 200 y 400 mg/Kg) mediante el modelo experimental de urolitiasis inducida por etilenglicol (EG) (0,75%) y cloruro de amonio (CA) (2%) en ratas. El análisis de microscopía de la orina reveló que la cantidad y el tamaño de los cristales de oxalato de calcio (CaOx) fue mayor en los animales del grupo control litiásico (Grupo II), en comparación con el grupo de control. Por otro lado, los grupos tratados con extracto acuoso mostraron una reducción significativa en la cantidad y el tamaño de los cristales de CaOx en comparación con el grupo II, al igual que el grupo III tratado con cistona. En las ratas de control litiásico (Grupo II), el daño renal marcado se evidenció por la elevación de los niveles de creatinina, ácido úrico y nitrógeno ureico en suero. Los niveles de ácido úrico sérico en los grupos experimentales también se encontraron disminuidos respecto al grupo Control II. La evaluación histopatológica permitió evaluar los daños renales provocados por la inducción de los cálculos con etilenglicol, observar la presencia de atrofia glomerular y la deposición de cristales y el logro de la normalidad de las células epiteliales tubulares y glomérulos al administrar el extracto de planta. Finalmente los hallazgos de este estudio demuestran que el extracto acuoso de hojas de *Boldoa purpurascens* posee una potente actividad antiurolitiásica por inhibición o disolución del calcio inducido por el etilenglicol en ratas.



*Abstract*

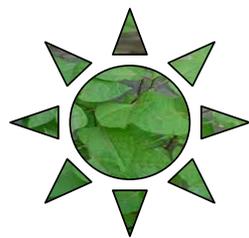


## ABSTRACT

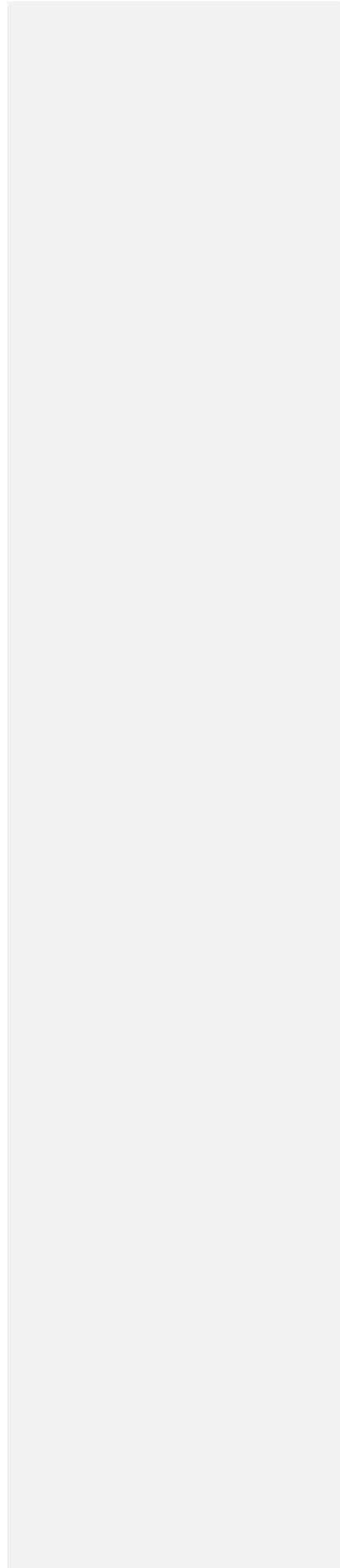
---

### Abstract

An experimental study was carried out at the "Marta Abreu" Central University of Las Villas with the aim of evaluating the antilithic activity of the aqueous extract of the leaves of *Boldoa purpurascens* Cav. To this end, this activity was determined from the aqueous extract of the species (doses of 100, 200 and 400 mg / kg) through the experimental model of urolithiasis induced by ethylene glycol (EG) (0.75%) and ammonium chloride (CA) (2%) in rats. The analysis of urine microscopy revealed that the quantity and size of the calcium oxalate crystals (CaOx) was higher in the animals of the lithiasic control group (Group II), in comparison with the control group. On the other hand, the groups treated with aqueous extract showed a significant reduction in the quantity and size of the CaOx crystals in comparison with group II, as did the group III treated with cystone. In the lithiasic control rats (Group II), the marked renal damage was evidenced by the elevation of serum creatinine, uric acid and urea nitrogen levels. The levels of serum uric acid in the experimental groups were also found to be lower than in the Control II group. The histopathological evaluation allowed to evaluate the renal damages caused by the induction of the stones with ethylene glycol, to observe the presence of glomerular atrophy and the deposition of crystals and the achievement of the normality of the tubular epithelial cells and glomeruli when administering the plant extract. Finally, the findings of this study demonstrate that the aqueous extract of leaves of *Boldoa purpurascens* possesses a potent anti-urolithic activity by inhibition or dissolution of calcium induced by ethylene glycol in rats.



# *Índice*



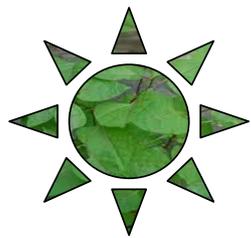
Índice

Resumen.....	12
Abstract.....	14
Índice.....	16
Introducción.....	1
1.1. Generalidades de la planta.....	3
1.1.1. Familia Nyctaginaceae.....	3
1.1.2. Antecedentes químicos de la familia.....	3
1.1.3. Aspectos históricos de la planta.....	3
1.1.4. Descripción botánica de la planta.....	3
1.1.5. Hábitat, distribución, fenología y cultivo.....	3
1.1.6. Composición química.....	4
1.1.7. Usos en medicina tradicional.....	4
1.1.8. Antecedentes farmacológicos de <i>B. purpurascens</i> .....	4
1.1.9. Clasificación taxonómica de <i>Boldoa purpurascens</i> Cav.....	5
1.2. Epidemiología.....	5
1.2.2. Patogenia.....	7
1.2.3. Litogénesis.....	8
1.3. Clasificación de los cálculos renales.....	9
1.3.1. Oxalatos cálcicos.....	9
1.3.2. Fosfatos cálcicos.....	9
1.3.3. Ácido úrico y uratos.....	10
1.4. Tratamiento de la litiasis renal.....	10
1.4.1. Fármacos empleados en el tratamiento de la litiasis renal.....	11
1.4.2. Fitoterapia de la litiasis renal.....	12
1.5. Métodos <i>in vivo</i> para evaluar actividad antilitiásica.....	13
1.5.1. Urolitiasis inducida por etilenglicol en ratas.....	13
1.5.2. Urolitiasis inducida por oxalato de sodio en ratas.....	13
1.5.3. Litiasis aguda inducida por glioxilato.....	14
1.5.4. Urolitiasis inducida por la implantación de discos de zinc en ratas.....	14
2.1. Materiales.....	15
2.2. Preparación del material vegetal.....	16
2.2.1. Recolección, secado y obtención del sólido pulverulento a partir de las hojas de <i>Boldoa purpurascens</i> Cav.....	16
2.2.2. Características organolépticas.....	16
2.3. Obtención del extracto.....	17
2.4. Determinación del contenido de sólidos totales y rendimiento del extracto acuoso.....	17
2.5. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antilitiásica del extracto acuoso obtenido.....	18
2.6. Método de identificación de los animales.....	18
2.6.1. Alojamiento.....	18
2.6.2. Alimentación y agua de bebida.....	18
2.7. Preparación de las muestras de ensayo.....	18
2.7.1. Preparación de las dosis a administrar.....	18
2.7.2. Preparación de la cistona.....	18
2.8. Inducción de urolitiasis con etilenglicol (EG) (0,75%) y cloruro de amonio (CA) (2%).....	18
2.8.1. Toma de muestras de sangre y orina.....	19

## ÍNDICE

---

2.9. Análisis de las muestras de sangre y de orina .....	19
2.9.1. Ácido úrico .....	19
2.9.2. Calcio .....	21
2.9.3. Creatinina .....	22
2.9.4. Urea .....	24
2.10. Análisis anatomopatológico .....	25
2.11. Análisis estadístico.....	25
3.1. Preparación del material vegetal.....	26
3.1.1. Recolección.....	26
3.1.2. Selección.....	26
3.1.3. Secado .....	26
3.1.4. Molinado.....	27
3.2. Obtención del extracto acuoso.....	27
3.3. Determinación del contenido de sólidos totales y rendimiento del extracto acuoso.....	27
3.3. Características organolépticas .....	28
3.4. Evaluación <i>in vivo</i> de la actividad antiurolitiásica del extracto acuoso de las hojas de <i>Boldoa purpurascens</i> .....	28
3.4.1. Parámetros evaluados en orina .....	28
3.4.2. Resultados de parámetros bioquímicos en suero .....	33
3.4.4. Evaluación histopatológica de los riñones de los diferentes grupos .....	35
Conclusiones.....	38
Recomendaciones.....	40
Referencias Bibliográficas .....	42
Anexos .....	47



# *Introducción*

### Introducción

Las plantas medicinales han constituido desde tiempos remotos un recurso de gran importancia, para cubrir las necesidades terapéuticas. Su uso como agentes de la salud es ampliamente conocido en múltiples culturas del mundo y ha sido transmitido a través de generaciones (1). Durante las últimas décadas el interés de pacientes y científicos por la medicina tradicional ha crecido rápidamente debido a las preocupaciones sobre los efectos adversos de las drogas químicas y cuestionamientos de la medicina alopática. El estudio de las plantas medicinales es, por tanto, un campo abierto para la investigación no solamente para la medicina oriental sino también para la occidental, basado en la producción de fármacos mediante el aislamiento de compuestos activos. Este saber tradicional se ha ido perfeccionando a lo largo de los años para explicar, en forma racional, el uso terapéutico de una planta y permite además la vigencia de su empleo (2). La identificación del valor curativo de las plantas ha provenido generalmente de la información proporcionada por su uso en la medicina tradicional, que igualmente ha sido la fuente para la investigación fitoquímica. A pesar de esto solo una cantidad relativamente pequeña de especies de plantas se ha estudiado para las posibles aplicaciones médicas. En este sentido, la familia **Nyctaginaceae** no es ajena a esta situación, es una familia de plantas que engloba alrededor de 350 especies distribuidas en 38 géneros. Se caracterizan por tener unas hojas de bordes lisos opuestas a los tallos. *Boldoa purpurascens Cav* ha sido empleada por la población desde hace varias décadas en el tratamiento de enfermedades renales. La litiasis renal es una de las patologías cuya frecuencia ha crecido en los últimos años constituyéndose en una de las más comunes de la sociedad moderna, caracterizada por la aparición de cálculos en el aparato urinario superior (parénquima renal, cálices, pelvis o uréter), resultante de la sobresaturación de la orina con el consecuente proceso de cristalización, agregación y crecimiento del cálculo (3).

## INTRODUCCIÓN

---

*Boldoa purpurascens* Cav se emplea tradicionalmente en nuestro país como antilitiásica pero esta acción farmacológica no ha sido avalada científicamente. Atendiendo a estas consideraciones el problema científico a resolver en esta investigación es el siguiente:

### **Problema científico**

*Boldoa purpurascens*, es utilizada tradicionalmente en nuestro país para la eliminación de los cálculos renales. Científicamente no existen estudios que justifiquen el empleo de la especie para el tratamiento de dicha enfermedad.

### **Hipótesis**

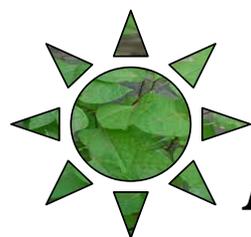
Si se realizan ensayos in vivo para evaluar la acción antilitiásica del extracto de *Boldoa purpurascens*, se podrá conocer su acción y justificar su uso tradicional en esta afección.

### **Objetivo general**

Evaluar la actividad antilitiásica del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav. empleando modelos *in vivo*.

### **Objetivos específicos**

1. Determinar el rendimiento y el contenido de sólidos totales en el extracto acuoso obtenido mediante extracción por Soxhlet.
2. Evaluar la acción del extracto acuoso de la especie, sobre los cristales de oxalato formados en los animales de experimentación.
3. Realizar evaluación histopatológica de los riñones de los animales de experimentación en cada grupo.



*Revisión  
Bibliográfica*

### CAPÍTULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

#### 1.1. Generalidades de la planta

##### 1.1.1. Familia Nyctaginaceae

Las plantas pertenecientes a la familia *Nyctaginaceae* son en su mayoría plantas dicotiledóneas del orden de las *Centrospermales*, herbáceas o leñosas, por lo común con hojas opuestas, flores en cimas umbeliformes o corimbiformes, brácteas en la base de las flores, libres o soldadas, a veces petaloideas, con frecuencia en involucro caliciforme, cinco sépalos corolinos, soldados, con base persistente en la madurez, formando, alrededor del agujero, un antocarpio envolvente (4, 5).

##### 1.1.2. Antecedentes químicos de la familia

Los compuestos que han sido informados en la literatura para los géneros de esta familia son los alcaloides, flavonoides, proantocianidinas, saponinas y saponogeninas. Entre ellos, kamferol, y quercetina han sido los compuestos químicos más corrientemente informados (6-8).

##### 1.1.3. Aspectos históricos de la planta

*Boldoa purpurascens*, Cav ex Lag. es conocida comúnmente en nuestro país como Nitro Blanco o Tostón y se le conoce también con las sinonimias de: *Boldoa ovatifolia* Lag, *Cryptocarpus globosus* H.B.K y *Salpianthus purpurascens*. Esta planta fue descubierta por Cavanilles en América y depositada en el jardín botánico de Madrid en 1816 por Lagasca, un discípulo de Cavanilles e introducida en Cuba en 1842 (5).

##### 1.1.4. Descripción botánica de la planta

*Boldoa purpurascens* Cav es una planta de 1-2 metros de altura, herbácea, muy ramificada; las ramas de la inflorescencia son pegajosas. Hojas rombo-aovadas a aovado-deltaideas, de 5 a 20 cm; agudas a atenuadas, abruptamente acuminadas en la base, decurrente en el peciolo (3). Flores aglomeradas en racimos cortos y densos al extremo de las ramas de la panoja; periantio de 2,5- 3 mm. Fruto de 1,5 mm de diámetro; semilla negra, lustrosa (4, 9).

##### 1.1.5. Hábitat, distribución, fenología y cultivo

Es una planta silvestre que crece en terrenos yermos y en los terrenos de serpentina y calcáreos, bastante abundante en las cercanías de La Habana,

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

por Guanabacoa y Marianao. Habita en México, Nicaragua, Guatemala, Costa Rica y Venezuela. En Cuba florece de diciembre a mayo, las hojas alcanzan su mayor tamaño en los meses de junio y julio (4, 10).

### 1.1.6. Composición química

La planta contiene gran cantidad de metales entre los que se encuentran: el plomo, cadmio, hierro, cobre, cromo, magnesio, níquel, sodio, manganeso, estando en mayor proporción el potasio, aunque el sodio, magnesio y cadmio se hayan también en cantidades importantes (4).

Los flavonoles y las flavonas glicosídicas son compuestos generalmente estables y pueden extraerse desde el material vegetal secado, con disolventes en frío o en caliente. Los aglicones de los flavonoles y flavonas son raramente encontrados como constituyentes internos de los vegetales; ellos son frecuentemente localizados sobre las superficies externas de hojas (11). Esos flavonoides tienden a ser menos polares cuando están a menudo metilados o acilados y requieren disolventes menos polares para su extracción, tales como éter, hexano y diclorometano (12).

### 1.1.7. Usos en medicina tradicional

En los estudios etnobotánicos se informa su uso como diurético y antiséptico de las vías urinarias. En algunos lugares de Cuba se ha usado para la eliminación de cálculos renales, es posible que esta acción (aún no demostrada) sea cierta, atendiendo al potente efecto diurético que se le atribuye, lo que lleva consigo una eliminación considerable de líquido, lo que puede ocasionar la fragmentación de los cálculos, y pudiendo ser arrastrados del órgano (6). De acuerdo a la medicina tradicional china, la especie promueve la micción, tiene efectos antiinflamatorios y es usado tradicionalmente como tónico (13).

### 1.1.8. Antecedentes farmacológicos de *B. purpurascens*

En el año 2006 se comprobó el efecto diurético del extracto acuoso liofilizado de *Boldoa purpurascens* Cav. a la dosis de 400 mg/kg siguiendo una administración continuada. En este propio estudio se informa el aislamiento y caracterización estructural de cuatro nuevos flavonoides que contribuyen a la actividad diurética de la planta así como informes preliminares de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de la misma (14). Posteriormente se evaluó

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

la actividad antiinflamatoria de un crudo de flavonoides obtenido a partir de la planta (4).

En estudios preclínicos efectuados en ratas, se evaluó la actividad hipoglicemiante de los extractos acuoso y etanólico de la planta, utilizando como controles positivos Insulina y Metformin respectivamente. Los resultados obtenidos demostraron que ambos extractos disminuyeron apreciablemente los niveles de glucosa en sangre a las 72 horas. En el estudio se informa que la actividad estudiada es debida a la presencia de D-pinitol, compuesto identificado y caracterizado en los extractos de la planta y a los flavonoides presentes en los mismos (15).

### 1.1.9. Clasificación taxonómica de *Boldoa purpurascens* Cav

Nombre Científico: *Boldoa purpurascens* Cav.

Familia: *Nyctaginaceae*.

Sinonimias: *Boldoa ovatifolia* Lag; *Cryptocarpus globosus* HBK y *Salpianthus purpurascens* Hook. & Arn.

Género: *Boldoa*.

División: Magnoliopsida.

Especie: *Boldoa purpurascens*.

Subclase: Magnoliophyta.



**Figura 1:** Hojas de *Boldoa purpurascens*.

### 1.2. Epidemiología

La urolitiasis se ha convertido en una enfermedad crónica que ha tenido un gran impacto en la calidad de vida y en la situación laboral de quien la padece;

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

su tasa de prevalencia y recurrencia es cada vez mayor, lo que genera un gran impacto socioeconómico en cualquier país al afectar el sistema de salud. Se han identificado numerosos factores inherentes a la biología humana y algunas variables sociodemográficas, que favorecen el desarrollo de cálculos renales; por lo cual, en esta revisión se describen los principales factores que influyen en la formación de urolitiasis, permitiendo intervenir oportunamente sobre algunos de ellos.

Los cálculos que obedecen a factores propios del metabolismo se denominan intrínsecos (genética, edad y sexo) los debidos a factores externos se conocen como extrínsecos (geográficos y climáticos) (16).

### Factores intrínsecos:

#### Genética:

Cerca del 25% de los pacientes con litiasis urinaria tienen una historia familiar positiva de litiasis debida posiblemente a un defecto poligénico de penetrancia parcial. Las enfermedades hereditarias más comunes que se asocian con urolitiasis son la acidosis tubular renal familiar que se presenta con nefrolitiasis y la nefrocalcinosis que se asocia con litiasis en un 70% de los casos; otra alteración genética es la cistinuria cuya transmisión es recesiva (16, 17).

#### Edad y sexo:

Se presenta a cualquier edad, siendo el mayor pico de presentación de la litiasis urinaria entre los 20 y 40 años con predominio en los hombres (relación 3:1). Al respecto, una teoría postula que las mujeres tienen mayor nivel de citrato en orina; un protector contra la adhesión de los cristales y los hombres tienen mayor nivel de testosterona que resulta en mayor secreción de oxalato por el hígado (18).

En las mujeres predominan las litiasis de origen infeccioso o las relacionadas con defectos metabólicos, como la cistinuria o el hiperparatiroidismo. Mientras que en el hombre es más frecuente la litiasis oxalocálcica, así como la litiasis úrica (17).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

### Factores extrínsecos:

#### Geográficos y climáticos:

Se ha demostrado una fuerte relación causal de los factores climáticos, geográficos, dietéticos y ocupacionales con la formación de cálculos. Estos son más frecuentes en personas que habitan en regiones montañosas, desérticas y tropicales, en general áreas calientes y secas que, presumiblemente, pueden favorecer un estado de deshidratación crónica; a ellos se suman los patrones dietéticos de ciertas regiones que influyen en la formación de cálculos porque aumenta la excreción de compuestos pocos solubles, tales como el ácido úrico asociado a la ingestión de purinas, los oxalatos, el calcio y los fosfatos (17, 18). La actividad laboral también se ha relacionado con la litiasis, la cual es más frecuente en trabajadores administrativos y en personas sedentarias, así como en quienes laboran en condiciones de altas temperaturas (19, 20).

Se presenta en todas las razas, los asiáticos, sirios e indios parecen tener una mayor predisposición a padecer la enfermedad en contraposición con la raza negra, quizá por el aumento de los inhibidores de la cristalización en orina o por hipovitaminosis D, pero en estos, la forma de presentación es habitualmente más compleja, como son los cálculos coraliformes.

#### **1.2.2. Patogenia**

La formación de un cálculo renal requiere necesariamente que la concentración de la sal formadora exceda su solubilidad en la orina, es decir, se encuentre en estado de supersaturación. Dependiendo de la especie predominante de la sal formadora, influirá también en su límite de solubilidad, el pH e interacciones iónicas (20). La etapa inicial para la formación de un cálculo renal es la aparición de la fase sólida o nido de cristales de la respectiva sal. Si cristales de una misma especie forman el nido, se habla de nucleación homogénea. Sin embargo, en una solución compleja como es la orina, cristales de un tipo pueden también arrastrar la precipitación de otros de distinto tipo (2). Esto último se denomina nucleación heterogénea y ha sido demostrada para la precipitación de cristales de oxalato de calcio inducida por cristales de urato monosódico o de fosfato de calcio. Una vez que se ha formado un nido, éste alcanza el tamaño suficiente para alojarse en el tracto urinario gracias al crecimiento y agregación de cristales e interacciones de éstos con la pared

celular. La litogénesis renal puede obedecer también al déficit de inhibidores de la cristalización (21). Estos son sustancias presentes normalmente en la orina que actúan adhiriéndose a los sitios activos de los cristales antagonizando cualquiera de las etapas de la litogénesis. Citrato y magnesio corresponden a los inhibidores mayormente demostrados. Finalmente, factores secundarios (22).

### 1.2.3. Litogénesis

La formación de un cálculo renal supone la generación de un núcleo y que este se retenga en la vía urinaria para dar lugar a su crecimiento. En tal sentido se plantean teorías que ponen el énfasis en factores anatómicos, junto con otras que dan el peso patogénico fundamental a los aspectos físico-químicos. Ninguna de las teorías es completa y los cálculos son de origen multifactorial, dependiendo de factores como edad, sexo, ocupación, estado nutricional, dieta, ingesta líquida, clima, infección y alteraciones metabólicas o anatómicas diversas que modifican el pH, composición y volumen (2, 22, 23).

Las teorías anatómicas de la litogénesis propugnan que la orina es una solución sobresaturada para algunos de sus constituyentes cristalinos y que aquellas situaciones que provoquen ectasia favorecerán la precipitación y retención de estructuras cristalinas y su posterior crecimiento (24).

La litogénesis sigue una serie de pasos que consisten en saturación urinaria, posterior sobresaturación, nucleación cristalina, agregación de los monocristales, retención en el urotelio y crecimiento posterior de ese núcleo retenido (25).

El desarrollo de cristaluria se explica mediante el concurso de la llamada teoría físico-química de la litogénesis. En tal sentido, se considera que la orina es una solución en la que, dependiendo de su concentración, cada sal puede alcanzar diversas situaciones en cuanto a su saturación (26). Cuando la sal está en baja concentración, la orina está infra saturada, existiendo una energía que tiende a disolver la sal e impedir que se precipiten cristales de la misma. Si se aumenta progresivamente la concentración, se alcanza una frontera llamada "producto de saturación" que, una vez superada, puede dar lugar a la precipitación de cristales, aunque la presencia de componentes orgánicos macromoleculares

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

urinarios puede impedir la precipitación que se produciría en una solución acuosa pura (27).

Una vez formado el núcleo del cálculo se producirán las restantes fases de la litogénesis: agregación, fijación y crecimiento (28). La agregación de cristales depende de interacciones electrostáticas, formación de puentes de hidrógeno y de la materia orgánica, que se va desplazando de la superficie de los cristales, permitiendo la agregación de los mismos, de tal modo que su contenido es siempre menos de la mitad en el interior de un cálculo respecto a su superficie. La matriz o componente orgánico de los cálculos está constituida por proteínas caracterizadas por un alto contenido en ácido glutámico, ácido aspártico y presencia de ácido  $\gamma$ -carboxiglutámico (28, 29).

### 1.3. Clasificación de los cálculos renales

#### 1.3.1. Oxalatos cálcicos

La weddellita es el oxalato cálcico dihidratado y su nombre se debe a Weddell que en 1936 lo describió como pequeñas bipinunides tetragonales (30). Los cristales de weddellita con la lupa binocular aparecen diáfanos con ángulos y aristas característicos de las bipirámides tetragonales de escasa altura en relación con los lados de la base común (31). En los cortes pueden aparecer rombos de tamaños crecientes y en las láminas delgadas su aspecto es de rombos en forma de punta de lanza que no son más que pirámides cuadrangulares vistas en el perfil (32).

La Whewellitu es el oxalato cálcico monohidratado y puede producirse por transformación del oxalato dihidratado, aunque se admite que estos cálculos (Whewellitu pueden ser formados inicialmente por cristales de monohidrato (33). La típica estructura de este cálculo es la radiada de aspecto compacto y macizo en la que hay una serie de cristales alargados, prismas monoclinicos que se adosan unos a otros (30, 34).

#### 1.3.2. Fosfatos cálcicos

La brushita es el fosfato cálcico más ácido. Sus cristales de tamaños variables pero en general grandes adoptan la forma de abanico y son de color azul con luz polarizada y pueden cambiar a tonos rojizos o malvas. Las apatitas constituidas por diversos compuestos tienen en general un aspecto microgranular o esferolítico algunos de estos esferolitos tienen forma de

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

gránulos erizados con espículas radiantes (30). Los esferolitos son agrupaciones de macrocristales dispuestos como los radios de una esfera y que al sobresalir de la esférula forma un aspecto erizado como púas o espinas. Estos cálculos a veces muestran una estructura continua amorfa y sin elementos individualizados. Ello se debe a la presencia de carbónico. Cuando más carbonatada es la apatita más amorfa resulta su estructura (35).

### 1.3.3. Ácido úrico y uratos

Los cristales de ácido úrico tienen un color ambarino característico y su aspecto con lupa es el de una desordenada aglomeración de cristales. En algunos cálculos de ácido úrico los cristales están tan próximos y densos que aparentan la forma de una masa continua. Otros muestran zonas de cristales con disposición radial y también líneas curvas concéntricas que se entrecruzan con los cristales longitudinales y radiales (36).

El urato amónico puede proceder de orinas infectadas (gérmenes ureolíticos: y en lámina delgada con luz polarizada aparece con su color dorado amarillo en forma de agujas desordenadas en pequeñas agrupaciones y entre los cristales de fosfato amónico magnésico: sin embargo si la concentración de urato es elevada predomina en el cálculo el urato amónico que rodea los cristales de estruvita que quedan incluidos en su interior (37). En orinas asépticas se forma el urato amónico esferolítico. El urato monosódico se distingue por sus cristales finos y largos que adoptan una disposición curvilínea. Muestran bandas concéntricas más oscuras y algunos cálculos puros de urato monosódico aparecen en forma de concreciones redondas de estructura radiada y la imagen observada se parece a un sol radiante (38).

### 1.4. Tratamiento de la litiasis renal

El tratamiento de primera elección es el farmacológico, siempre que la vía excretora se encuentre permeable. Dicho tratamiento tiene por objetos: 1) Suprimir el dolor, 2) Eliminar el cálculo, 3) Prevenir las recidivas. Hoy día se emplean métodos instrumentales poco invasivos, como la cirugía endoscópica y litotricia extracorpórea, asociados a tratamientos farmacológicos. Muchos cálculos se expulsan de manera espontánea, dependiendo de su tamaño y localización (39, 40).

### 1.4.1. Fármacos empleados en el tratamiento de la litiasis renal

- ✓ Tiazidas: Hidroclorotiazidas, Clortalidona – Diurético
- ✓ Fosfatos: Fosfato Sódico – Inhibición de la absorción de Calcio y Magnesio.
- ✓ Alcalinizantes Urinarios: Bicarbonato Sódico, Citratos, Acetazolamida – por aumento del pH urinario y bloqueo de la reabsorción de bicarbonato.
- ✓ Acidificantes Urinarios: Vitamina C – disminuye el pH urinario.
- ✓ Inhibidores de la Xantina Oxidasa: Alopurinol – impide la formación de ácido úrico.
- ✓ Piridoxina: Vitamina B6 – disminuye la producción de oxalato
- ✓ Anticistinuricos: D- Penicilamina – aumenta la solubilidad de la cistina.
- ✓ Inhibidores de la ureasa: Ácido acetohidroxámico – evita los aumentos del pH urinario.

Durante la fase aguda hay que aliviar el dolor, según su intensidad, con analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). Además de su efecto analgésico, reducen el edema en la obstrucción uretral, el flujo urinario y la presión intraluminal. Los opiáceos no siempre están indicados por que puede producir espasmos locales (39).

Hay que forzar la diuresis mediante la ingestión de grandes cantidades de líquidos o empleando diuréticos si es necesario, para conseguir la eliminación espontánea del cálculo. Los diuréticos pueden producir deshidratación e hipotensión, fatiga, impotencia, hipopotasemia, hiperuricemia e hiperglucemia. Por lo tanto, se debe mantener bien hidratado al paciente, con dieta hiposódica, y administrar citrato potásico por vía oral (30 – 40 mEq/ día) (41).

Según el tipo de cálculo, se debe alcalinizar o acidificar la orina. Cuando los cálculos son de calcio, la orina se alcaliniza con bicarbonato o citrato sódicos, teniendo en cuenta que la presencia de sodio potencia la eliminación de calcio por la orina pero puede aumentar la presión arterial y, a pH superior a 7 puede favorecer la precipitación de fosfato cálcico en enfermos predispuestos (29).

En la profilaxis hay que prescribir medidas higiénico – dietéticas, dependiendo de la etiología de la litiasis, con objeto de corregir los factores litogénicos. La alimentación depende de la composición de los cálculos. Debe ser variada, con

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

pocos lácteos, proteínas y sal; y hay que mantener una buena hidratación. Se recomienda un ejercicio moderado y no abusar de los laxantes.

En embarazadas se pueden presentar cólicos renales, lo cual constituye una urgencia médica que debe ser tratada con reposo en cama, hidratación y analgésicos y según la evolución clínica referenciar a un centro especializado. Se debe recordar que las tiazidas pueden provocar en el feto hipoglucemia, hiponatremia y trombocitopenia (42).

### 1.4.2. Fitoterapia de la litiasis renal

Los primeros medicamentos que el hombre pudo tomar fueron especímenes del reino vegetal. En el caso de la litiasis renal se han descrito más de 70 especies vegetales con actividad antilitiásica (43, 44), entre las que destacan plantas con acción diurética y antiséptica, así como aquellas que contengan saponinas, las cuales actúan disgregando las suspensiones de mucoproteína y/o inhibiendo la cristalización del oxalato de calcio, de ácido úrico siempre y cuando no existan cálculos de gran tamaño formados (21, 39).

**Tabla 1.** Plantas medicinales recomendadas para el tratamiento de la litiasis renal (45, 46).

Nombre científico	Familia
<i>Alhagi maurorum</i>	Fabaceae
<i>Tribulus terrestris</i>	Zygophyllaceae
<i>Nigella Sativa</i>	Caryophyllaceae
<i>Althea aucheri Boiss</i>	Malvaceae
<i>Lactuca sativa L</i>	Compositae
<i>Prunus cerasus</i>	Rosaceae
<i>Alhagi camelorum</i>	Papilionaceae
<i>Mangifera indica</i>	Anacardiaceae
<i>Prangos acaulis (DC.) Bomm</i>	Apiaceae
<i>Urtica dioica L</i>	Urticaceae

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

<i>Fumaria officinalis</i>	Fumariaceae
<i>Plantago psyllium</i>	Plantaginaceae
<i>Medicago sativa</i>	Leguminosae
<i>Apium graveolens</i>	Umbelliferae
<i>Rheum ribes</i>	Polygonaceae
<i>Arctium lappa</i>	Compositae
<i>Pimpinella anisum</i>	Apiaceae
<i>Gundelia tournefortii</i>	Asteraceae

### 1.5. Métodos *in vivo* para evaluar actividad antilitiásica

#### 1.5.1. Urolitiasis inducida por etilenglicol en ratas

La toxicidad del etilenglicol se ha relacionado con el producto de degradación metabólica del ácido oxálico, que, cuando está presente en una concentración suficiente, cristaliza como oxalato de calcio en el tejido corporal, cuando se administra en agua potable a concentraciones del 25-10% produciendo los cálculos de oxalato en el tracto urinario de los animales. La formación de cálculos por el etilenglicol es causada por la hiperoxaluria, que causa un aumento de la retención renal y la excreción de oxalato. El aumento de calcio en la orina es un factor que favorece la nucleación y precipitación de oxalato de calcio o apatito (fosfato de calcio) de la orina y, posteriormente, el crecimiento de cristales. En la urolitiasis, la tasa de filtración glomerular disminuye por la obstrucción de la salida de orina por cálculos en los sistemas urinarios. Debido a esto, los productos de desecho, particularmente las sustancias nitrogenadas como la urea, la creatinina y el ácido úrico se acumulan en la sangre (47-54). Muchas veces el EG se asocia con cloruro de amonio al 2 % (p/v) para promover la hiperoxaluria y la deposición de CaOx en los riñones (55).

#### 1.5.2. Urolitiasis inducida por oxalato de sodio en ratas

La litiasis oxalocálcica se induce mediante una inyección intraperitoneal de oxalato de sodio (NaOx). La pérdida de peso observada se debe a la anorexia debida a la alteración de los carbohidratos, las proteínas o el metabolismo de las grasas, que se ve afectado por la inyección de oxalato de sodio. Sus

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

---

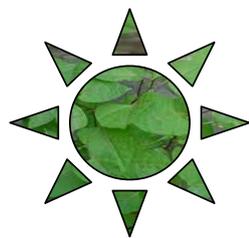
efectos perjudiciales se consideran sales de CaOx que son insolubles en el pH fisiológico, induciendo la nefrolitiasis. La intensidad de la necrosis, el tamaño de las partículas de CaOx, su número y su distribución dentro de la médula interna parecen depender del intervalo de tiempo posterior a la inyección de NaOx (56, 57).

### **1.5.3. Litiasis aguda inducida por glioxilato**

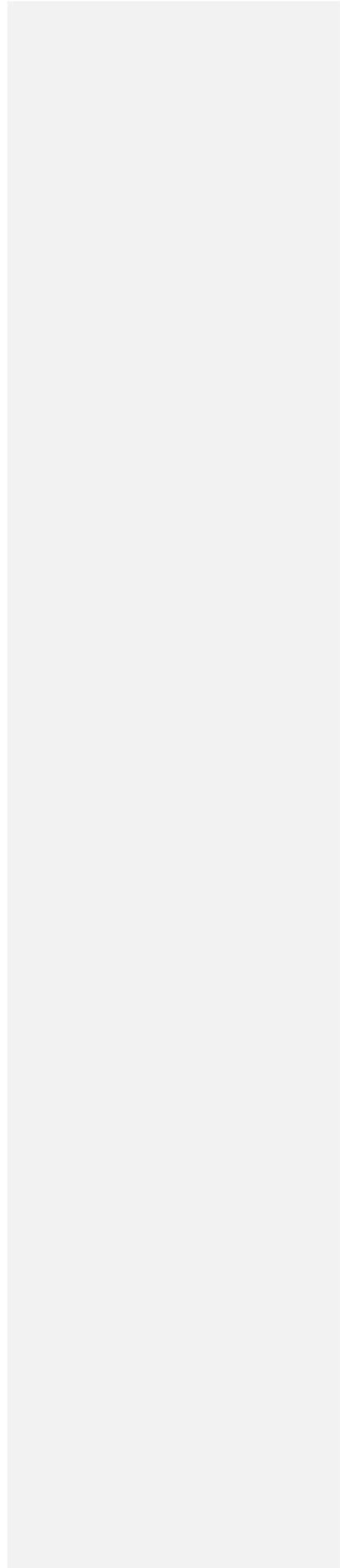
La litiasis por intoxicación aguda de glioxilato eleva significativamente la deposición de componentes formadores de cálculos: calcio, oxalato y fósforo en el tejido renal. Además, se ha informado un aumento de cuatro veces en el nivel de oxalato en la orina (58). El glicolato y el glioxilato son precursores eficaces de oxalato en hepatocitos de rata aislados. El único compuesto que ha demostrado ser un precursor inmediato de oxalato en el hombre es el glioxilato y tiene dos ventajas 1) La cantidad de material tóxico absorbido puede controlarse perfectamente 2) el agente utilizado es un precursor inmediato del ácido oxálico y permite el estudio de compuestos antilitiásicos verdaderos. Los animales reciben glioxilato de sodio 120 mg/kg vía intraperitoneal durante un día, administrado en dos dosis divididas por la mañana y por la noche, para inducir cálculos de oxalato dentro de las 24 h (58).

### **1.5.4. Urolitiasis inducida por la implantación de discos de zinc en ratas**

Las ratas se anestesian y se realiza una incisión para exponer la vejiga urinaria de los animales. Posteriormente se hace un pequeño corte en la parte superior de la vejiga y la orina se aspira asépticamente en un vial estéril para el examen bacteriológico y la determinación del pH. Los discos de cinc estériles y previamente pesados se insertan en la vejiga, la incisión se cierra con una sutura única y se deja que las ratas se recuperen durante una semana. La implantación de cuerpos extraños de zinc en la vejiga urinaria induce el crecimiento de cálculos urinarios e hipertrofia de la musculatura lisa del órgano (59-61).



# **Materiales y Métodos**



### CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente estudio se realizó en el Departamento de Ciencias Farmacéuticas de la Facultad Química-Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV), en los meses comprendidos entre Septiembre 2018/Marzo 2019.

#### 2.1. Materiales

Reactivos empleados:

- Etilenglicol (Merck Mellipore)
- Cloruro de Amonio (QuimiNet)
- Agua destilada
- Cistona (Himalaya. Herbal Healthcar)
- Papel para pH
- Urea (Reactivo 1: Urea/Ureas (3 frascos por 40 mL), Reactivo 2: Urea/NADH (1 frasco por 32 mL), Reactivo 3: Urea  $8.33 \text{ mmol}^{-1}$  Solución de referencia (1 frasco por 5 mL)).
- Calcio (Reactivo 1: Arsenazo III  $0.1803 \text{ mmol}^{-1}$  (4 frascos por 50 mL), Reactivo 2: Calcio  $2.5 \text{ mmol}^{-1}$  Solución de referencia (1 frasco por 5 ml).
- Creatinina (Reactivo 1: ácido pícrico  $14.62 \text{ mmol}^{-1}$  (2 frascos por 120 mL), Reactivo 2: Hidróxido de Sodio  $1.25 \text{ mol.L}^{-1}$  (1 frasco por 60 mL), Reactivo 3: Creatinina  $177 \text{ mol.L}^{-1}$  Solución de referencia (1 frasco por 12 mL)).
- Ácido úrico (Reactivo 1: Solución Buffer (2 frascos por 50 mL), Reactivo 2: Enzimas (2 frascos por 50 mL), Reactivo 3: Ácido úrico  $357 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$  Solución de referencia (1 frasco por 5 mL)).

#### Cristalería y utensilios

- Bandejas de laboratorio
- Beaker de 1000, 100 y 50 mL
- Probeta de  $250 \text{ cm}^3$
- Matraces de 50, 100, 250 mL
- Desecadora
- Pinzas
- Tijera

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### Equipos

- Balanza analítica Sortorius, límite superior de pesada: 200 error  $\pm$  0.1 mg.
- Estufa (Binder®).
- Centrífuga (Yingtai)
- Espectrofotómetro (L6S).
- Molino de cuchillas (IKA WERKE MF 10).
- Microscopio (NOVEL).

### 2.2. Preparación del material vegetal

#### 2.2.1. Recolección, secado y obtención del sólido pulverulento a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav

El material vegetal empleado en el estudio se recolectó en áreas cercanas a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, específicamente en la estación experimental "Las Antillas" en los meses de mayo a julio de 2018. Comprendió ejemplares que no se encontraban en estado de floración y fructificación y se realizó en horas tempranas de la mañana tomando partes aéreas de la planta, procedente de un suelo carbonatado. La planta se identificó por el Dr. Idelfonso Castañeda Noa y se comparó con un ejemplar depositado en el herbario del Jardín Botánico de la propia Universidad identificado con el número 3012. Las muestras en estudio se trasladaron hasta el laboratorio de Química- Analítica, del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas donde se procedió a la selección de las hojas y eliminación de las materias extrañas.

El secado se realizó durante tres días a una temperatura de 40°C y con aire recirculado mediante calor artificial y utilizando una estufa Binder. La droga seca se trituroó en un molino de cuchillas hasta un tamaño de partículas de 2 mm (12).

#### 2.2.2. Características organolépticas

Se realizó una observación sensorial del polvo obtenido, se definió su aspecto, color y olor.

**Comentario [P1]:** Cambia el tamaño de la página, porque?????

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 2.3. Obtención del extracto

Se pesaron 273 g del material vegetal seco y molido (hojas) en una balanza analítica y se sometieron a una extracción continua en Soxhlet, empleando 600 mL de agua destilada. Luego el extracto se evaporó a sequedad.

### 2.4. Determinación del contenido de sólidos totales y rendimiento del extracto acuoso

La determinación del contenido de sólidos totales se realizó según lo establecido en la Norma Ramal de Salud Pública (NRSP 312 ,1992): Extractos fluidos y tinturas. Métodos de ensayo.

De la muestra de ensayo previamente homogeneizada se transfirieron 5 mL a una cápsula de porcelana limpia, seca y previamente tarada; la cápsula se colocó en un baño de agua y el extracto se evaporó hasta que el residuo estuviese aparentemente seco, posteriormente se pasó a una estufa a una temperatura de 105 °C durante 3h. Se retiró la cápsula de la estufa, se colocó en una desecadora hasta que alcanzó la temperatura ambiente y se pesó. Se repitió el proceso anterior, pero empleando solamente 60 minutos de secado hasta que se obtuvo una masa constante. El valor se determinó por la siguiente fórmula:

$St = (Pt - P) / V$  donde:

P es la masa de la cápsula vacía.

Pt es la masa de la cápsula más el residuo.

V es volumen de ensayo.

El ensayo se realizó por triplicado.

El valor del rendimiento del extracto se determinó por la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Rendimiento} = \left( \frac{Mf}{Mi} \right) * 100$$

Donde:

Mf: es la masa final del extracto seco.

Mi: es la masa inicial del material vegetal que se empleó en la extracción.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### **2.5. Evaluación *in vivo* de la actividad antilitiásica del extracto acuoso obtenido**

En el presente estudio el uso y manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo al Manual de Procedimientos para el uso de animales de laboratorio acorde a las normas de la OECD (62).

### **2.6. Método de identificación de los animales**

Los animales se identificaron individualmente mediante el método de marcaje en diferentes zonas con una solución de ácido pícrico. Las cajas se identificaron por numeración de grupos (I, II, III, IV, V, VI), donde se especificaba el intervalo de peso del grupo. Cercano al ensayo se identificaron por grupos de tratamiento.

#### **2.6.1. Alojamiento**

Los animales se alojaron en cajas de plástico con tapas de rejilla de aluminio a razón de 6 animales por caja. Los cambios de frascos de agua, cajas y encamado se realizaron tres veces por semana así como la limpieza del cubículo.

#### **2.6.2. Alimentación y agua de bebida**

El alimento consistió en pienso peletizado esterilizado (certificado por el productor (CENPALAB) (Anexo 1) y agua de bebida apta para el consumo humano.

### **2.7. Preparación de las muestras de ensayo**

#### **2.7.1. Preparación de las dosis a administrar**

Se administraron dosis de 100, 200 y 400 mg/kg de peso vivo, utilizando como vehículo agua destilada. Para la preparación de las muestras se utilizaron volumétricos de 25 y 50 mL y las pesadas se realizaron en balanza analítica Sartorius con una exactitud de 0,1 mg.

#### **2.7.2. Preparación de la cistona**

Se pesaron 2.4303 g de cistona lo que equivale a 810 mg en una balanza analítica, empleando 40,5 mL de agua destilada, luego hubo que esperar de 2 a 3 horas, posteriormente una centrifugación a 1000 rpm utilizando el sobrenadante.

### **2.8. Inducción de urolitiasis con etilenglicol (EG) (0,75%) y cloruro de amonio (CA) (2%)**

Se utilizaron 36 ratas albinas machos de la línea Wistar con un intervalo de peso inicial entre 140- 200 g. Se seleccionaron y fueron divididos en seis grupos de seis

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

animales cada uno según el peso. El período del tratamiento se realizó por diez días. Los animales se suministraron por el Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB) acompañados del correspondiente certificado de calidad genética e higiénico sanitaria.

Grupo I: Agua

Grupo II: EG + CA

Grupo III: EG + CA + cistona

Grupo IV: EG + CA + cext (100 mg/Kg)

Grupo V: EG + CA + cext (200 mg/Kg)

Grupo VI: EG + CA + cext (400 mg/Kg)

### 2.8.1. Toma de muestras de sangre y orina

La toma de muestra de sangre y orina fueron tomadas por grupos de animales.

Las muestras de orinas se recolectaron durante 24 h a partir del día diez de comenzar el experimento y la muestra de sangre se tomó de la vena aorta abdominal de cada animal antes del sacrificio.

### 2.9. Análisis de las muestras de sangre y de orina

A los volúmenes de orina colectados de cada grupo se les midió el pH, posterior a una centrifugación de 3000 rpm por 10 minutos. Luego de centrifugadas se tomó una muestra por grupo y se examinó en un microscopio (IKA WERKE MF 10) para asegurar la presencia de cristales de oxalato seguido de un análisis bioquímico. Los cristales formados fueron verificados por diferentes análisis con marcadores bioquímicos como el ácido úrico, calcio, creatinina y urea.

El flujo de orina se calculó dividiendo el volumen de orina colectado en 24 horas por 1,440, lo que corresponde al número de minutos en 24 horas ( $60 \text{ min} \times 24\text{h} = 1,440$ ):  $\text{flujo de orina (mL / min)} = \text{valor del volumen de orina (24h)} / 1,440$ . El aclaramiento de creatinina se calculó mediante la ecuación de Cockcroft-Gault (63).

#### 2.9.1. Ácido úrico

##### 2.9.1.1. Criterios del desempeño y limitaciones del método

- Linealidad: El método es lineal en un intervalo de concentraciones de Uratos de 29,75 a 1487,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .

## MATERIALES Y MÉTODOS

- Límite de detección: 1,79  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .
- Límite de cuantificación 29,75  $\mu\text{mol.L}^{-1}$
- Interferencias: Se observaron interferencias con los analitos evaluados a partir de las concentraciones indicadas. Presentó una tendencia negativa con ácido ascórbico desde 100  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  y una tendencia positiva con hemoglobina desde 1,3  $\text{g.L}^{-1}$  (64).

### 2.9.1.2. Preparación del reactivo de trabajo y estabilidad del mismo

- Reactivo de trabajo (RT): se mezclaron volúmenes iguales de R1 (solución buffer) y de R2 (Enzimas).
- Estabilidad del reactivo de trabajo: una semana conservado de 2 a 8 °C.

### 2.9.1.3. Trazabilidad de los materiales de referencias utilizados

Se asignó el valor al Ácido úrico 357  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Solución de referencia, utilizando un calibrador de una firma comercial reconocida, Spintrol H CAL suero humano No. Cat. 1002011, Spintrol CAL suero bovino No. Cat. 1002010 (firma SPINREACT), TruCal U No. Cat. 591009910063 (Firma DiaSys), Cfas No. Cat. 10759350 (Firma Roche), o una solución de referencia de Ácido úrico 6  $\text{mg.dL}^{-1}$  No. Cat. 1002300 (Firma SPINREACT), No. Cat. 1030030 (Firma DiaSys).

**Tabla 2.** Técnica de análisis para la determinación de ácido úrico

	Ensayo blanco	Ensayo muestra	Ensayo referencia
Reactivo de trabajo	1 mL	1 mL	1 mL
Muestra	-	20 uL	-
Solución referencia	-	-	20 uL

Cálculo de la concentración de ácido úrico(65):

$$C_m = \frac{A_m \times C_r}{A_r} \quad (1)$$

donde:

$C_m$ : concentración de la muestra ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

$A_m$ : absorbancia de la muestra

## MATERIALES Y MÉTODOS

Cr: concentración de la referencia ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

Ar: absorbancia de la referencia

### 2.9.2. Calcio

#### 2.9.2.1. Criterios del desempeño y limitaciones del método

- Linealidad: El método fue lineal en un intervalo de concentraciones calcio de 0,225 a 4,0  $\text{mmol.L}^{-1}$
- Límite de detección: 0,125  $\text{mmol.L}^{-1}$ .
- Límite de cuantificación 0,225  $\text{mmol.L}^{-1}$ .
- Interferencias: No se observó ninguna interferencia con el ácido ascórbico hasta 0,3  $\text{g.L}^{-1}$ , Triglicéridos 5  $\text{g.L}^{-1}$ , Proteínas hasta 2,0  $\text{g.L}^{-1}$ , Hemoglobina 4  $\text{g.L}^{-1}$ , Fosfatos hasta 0,2  $\text{g.L}^{-1}$  y Magnesio hasta 15  $\text{mg.dL}^{-1}$ .

#### 2.9.2.2. Preparación del reactivo de trabajo y estabilidad del mismo

Los componentes del juego fueron estables hasta la fecha de caducidad indicada en la etiqueta. Se mantuvieron los frascos bien cerrados de 2 a 8°C para evitar su contaminación.

No se utilizaron reactivos fuera de la fecha indicada.

Los reactivos una vez abiertos fueron estables durante 4 semanas, conservados de 2 a 8°C.

#### 2.9.2.3. Trazabilidad de los materiales de referencias utilizados

Se asignó el valor de concentración de calcio 2,5  $\text{mmol.L}^{-1}$ . Solución de referencia, utilizando un calibrador o solución estándar de calcio de firma comercial reconocida: Calcio 10  $\text{mg.dL}^{-1}$  No.Cat 1002340 (Spinreact), Estándar de Calcio 10  $\text{mg.dL}^{-1}$  No. Cat. 111009910030 (DiaSys), TruCal U No. Cat. 591009910063 (DiaSys), Cfas No. Cat. 10759350 (Roche), Spintrol H Cal suero humano No. Cat. 1002011(Spinreact).

**Tabla 3.** Técnica de análisis para la determinación de calcio

	Ensayo blanco	Ensayo muestra	Ensayo referencia
Reactivo 1	2 mL	2 mL	2 mL
Muestra	-	20 uL	-

## MATERIALES Y MÉTODOS

Solución referencia	-	-	20 uL
---------------------	---	---	-------

Cálculo de la concentración de calcio:

$$C_m = \frac{A_m \times C_r}{A_r}$$

(2)

donde:

$C_m$ : concentración de la muestra ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )

$A_m$ : absorbancia de la muestra

$C_r$ : concentración de la referencia ( $\text{mmol.L}^{-1}$ )

$A_r$ : absorbancia de la referencia

Intervalo de referencia:

De 2,02 a 2,60  $\text{mmol.L}^{-1}$

### 2.9.3. Creatinina

#### 2.9.3.1. Criterios del desempeño y limitaciones del método

- Linealidad: El método fue lineal en un intervalo de concentración de creatinina de 44,25 a 530  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para ambos métodos punto final y cinético.
- Límite de detección: Método punto final: 15,36  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , método cinético: 4,361  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .
- Límite de cuantificación: Método punto final: 22  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , método cinético: 32  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ .
- Interferencias: No presentó interferencias con los siguientes productos hasta las concentraciones indicadas: Bilirrubina hasta 85  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , Hemoglobina 4  $\text{g.L}^{-1}$ , Piruvato 0,727  $\text{mmol.L}^{-1}$  y Glucosa  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

#### 2.9.3.2. Preparación del reactivo de trabajo y estabilidad del mismo

Técnica cinética

Reactivo de trabajo: se mezcló un volumen del reactivo 2 con 9 volúmenes del reactivo 1.

Reactivo 3: Se encontraba listo para usar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Técnica punto final.

Reactivo de trabajo: se mezcló un volumen del reactivo 2 con 4 volúmenes del reactivo 1.

Reactivo 3: se tomaron 10 volúmenes del reactivo y diluyó hasta 100 volúmenes con agua purificada en frasco volumétrico.

Los reactivos una vez abiertos fueron estables durante 6 meses, conservados de 2 a 8 °C. El reactivo de trabajo fue preparado en el momento de ser utilizado. Se desechó el resto al finalizar la jornada laboral.

### 2.9.3.3. Trazabilidad de los materiales de referencias utilizados

Se asignó el valor de concentración de Creatinina 177  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Solución de referencia, utilizando un calibrador de una firma comercial reconocida: ELICAL 2 (Firma SEPPIM No. Cat. CALI-1550), calibrador para sistemas automatizados Cfas (Firma Roche No. Cat. 759350), Trucal U (Firma DiaSys No. Cat. 591009910063) o Estándar de Creatinina 2  $\text{mg.dL}^{-1}$  (Firma SPINREACT No. Cat. 1002330).

**Tabla 4.** Técnica de análisis para la determinación de creatinina

	Ensayo blanco	Ensayo muestra	Ensayo referencia
Reactivo de trabajo	1 mL	1mL	1mL
Agua purificada	100 uL	-	-
Muestra	-	100 uL	-
Solución referencia	-	-	100 uL

Cálculo de la concentración de creatinina:

$$C_m = \frac{(A_2 - A_1)_{\text{muestra}}}{(A_2 - A_1)_{\text{referencia}}} * C_r$$

(3)

donde:

$C_m$ : concentración de la muestra ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

$C_r$ : concentración de la referencia ( $\mu\text{mol.L}^{-1}$ )

$A_2 - A_1$ : diferencia entre las lecturas de absorbancia para la muestra o la referencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.9.4. Urea

#### 2.9.4.1. Criterios del desempeño y limitaciones del método

- Linealidad: El reactivo fue lineal en un rango de concentración de Urea de 1,7 a 50  $\mu\text{mol.L}^{-1}$
- Límite de detección: 0,315  $\mu\text{mol.L}^{-1}$
- Límite de cuantificación: 1,665  $\mu\text{mol.L}^{-1}$
- Densidad óptica del blanco reactivo a 340 nm: De 1,700 a 1,900 a tiempo cero
- Interferencia: Los analitos citados no interfirieron significativamente en los resultados de la determinación de urea hasta los siguientes valores de concentración: Ácido ascórbico 1,13  $\text{mmol.L}^{-1}$ , Triglicéridos 11  $\text{mmol.L}^{-1}$ , Bilirrubina 1026  $\text{mmol.L}^{-1}$ , Hemoglobina 5  $\text{g.L}^{-1}$ , Glucosa 27,75  $\text{mmol.L}^{-1}$  y Metildopa 0,21  $\text{mmol.L}^{-1}$ .

#### 2.9.4.2. Preparación del reactivo de trabajo y estabilidad del mismo

Reactivo de trabajo: Se mezclaron cuatro volúmenes del reactivo 1 con un volumen del reactivo 2.

Estabilidad: 15 días de 2 a 8 °C preparado en frascos con la misma calidad que presentan los reactivos 1 y 2.

#### 2.9.4.3. Trazabilidad de los materiales de referencias utilizados

Se asignó el valor a la solución de referencia de Urea 8,33  $\text{mmol.L}^{-1}$  utilizando multicalibradores: ELICAL 2 (firma SEPPIM, No.Cat. CALI 1550), calibrador para sistema automatizado (Cfas, Firma Roche No. Cat. 759350) y TruCal U (Firma DiaSys No. Cat. 591009910063).

**Tabla 5.** Técnica de análisis para la determinación de urea

	Ensayo blanco	Ensayo muestra	Ensayo referencia
Reactivo de trabajo	1 mL	1 mL	1 mL
Agua purificada	10 uL	-	-
Muestra	-	10 uL	-
Estándar	-	-	10 uL

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

Las lecturas fueron efectuadas a 340 nm a la temperatura de 37 °C. Se realizó una primera lectura ( $t_1$ ) a los 30 segundos y una segunda lectura ( $t_2$ ) a los 90 segundos contra agua purificada a la misma longitud de ondas.

Cálculo de la concentración de Urea:

$$conc = \frac{t_2 - t_{1muestra}}{t_2 - t_{1referencia}} * 8,33 \text{ mmol.L}^{-1}$$

(4)

Intervalo de referencia: De 1,8 a 6,1 mmol.L<sup>-1</sup>.

### 2.10. Análisis anatomopatológico

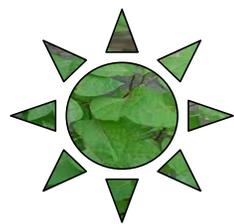
Los riñones se fijaron en formol al 10% y luego se procesaron para su posterior inclusión en parafina. Se hicieron cortes finos de 3 micras empleando un micrótopo vertical rotatorio. Las observaciones se realizaron en un microscopio con una magnificación de (X4 y X10). La tinción utilizada fue la de hematoxina y eosina para su análisis definitivo.

### 2.11. Análisis estadístico

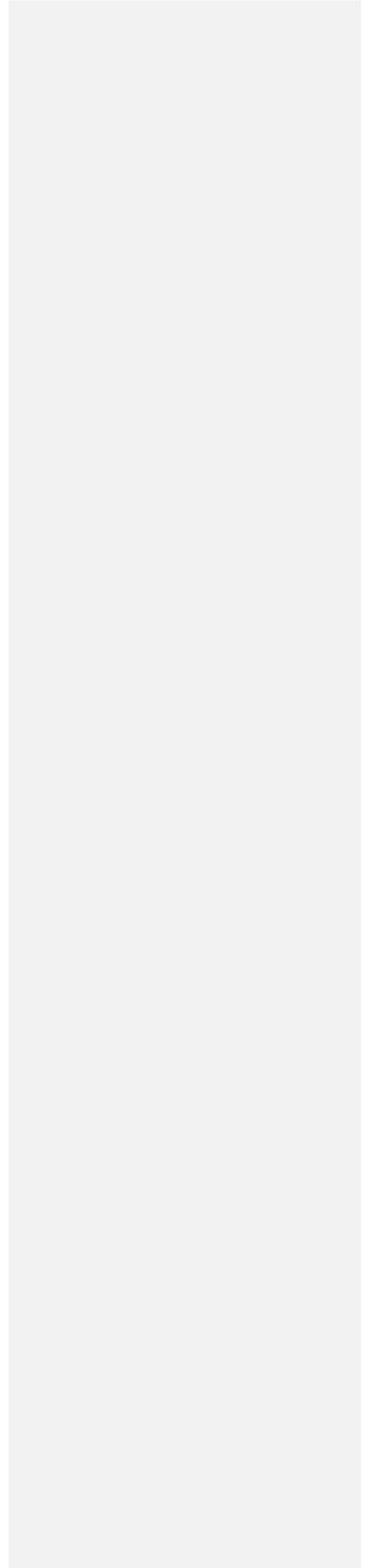
En los análisis se utilizó el paquete de programas estadísticos SPSS versión 22 (2013). Primeramente se realizó un análisis descriptivo de los datos para conocer su naturaleza y las principales tendencias, para ello se calcularon las principales medidas de tendencia central y de dispersión de los grupos de dosis en los diferentes momentos analizados. La comparación entre los grupos se realizó mediante la aplicación de técnicas no paramétricas: el test de Kruskal Wallis para el análisis de varianza de los diferentes grupos, el test de Mann-Whitney para conocer las diferencias entre los grupos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## **Resultados y Discusión**



### CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Preparación del material vegetal

##### 3.1.1. Recolección

El material vegetal se colectó en buen estado vegetativo y libre de materiales extrañas, asegurando las condiciones óptimas para la regeneración de la planta, según lo establecido en el manual de Buenas Prácticas Agrícolas y de Recolección (BPAR) e identificándose a través de herramientas taxonómicas, como *Boldoa purpurascens* Cav. La identificación se realizó mediante observación directa de la planta, comparándolas con descripciones informadas en la literatura (66). Adicionalmente, se comparó con la muestra depositada en el herbario con el número 3012, correspondiendo en su totalidad con las características botánicas para la citada especie.

##### 3.1.2. Selección

En el laboratorio de Química- Analítica, del Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) de la Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas se seleccionaron las hojas, ya que es el órgano de la especie que se sometió a las diferentes evaluaciones y se procedió a la eliminación de las materias extrañas.

##### 3.1.3. Secado

El proceso de secado se realizó con el empleo de la estufa a 40°C y con aire recirculado con el objetivo de mantener una temperatura estable, una correcta ventilación y evitar que los factores ambientales afectaran la calidad de la droga; además, porque este método reduce considerablemente el tiempo de secado. *Boldoa purpurascens* Cav. cuenta con un estudio de secado bajo estas condiciones siendo este el método de secado más apropiado.

Este proceso posee gran importancia pues reduce sustancialmente el volumen y la masa de la droga vegetal lo que permite el almacenamiento durante diferentes períodos de tiempo para así disponer de ella en cualquier época del año. También mejora su estabilidad química, física y microbiológica. Esta operación resultó ventajosa pues adicionalmente a que se fijan los constituyentes, se facilitan los procesos de trituración necesarios para obtener una forma más conveniente para su comercialización y almacenamiento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

El material vegetal una vez secado conservó las características establecidas para la droga.

### 3.1.4. Molinado

El material vegetal una vez secado según describió Martínez (1997), se molinó observándose que la materia prima conservó las características macromorfológicas establecidas para la droga. Se comprobó que no existieran variaciones en cuanto a color y olor del material vegetal, así como la ausencia de contaminaciones ocasionadas por materias extrañas, insectos o microorganismos.

Se almacenó en bolsas de polietileno en una desecadora protegida de la luz y la humedad, hasta el momento de su utilización.

### 3.2. Obtención del extracto acuoso

Se decidió obtener el extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav. ya que el uso tradicional de la planta para esta afección es en forma de decocción (66).

El material vegetal se extrajo en un equipo Soxhlet durante 20 h hasta garantizar el agotamiento total de la droga para lograr la mayor concentración de los metabolitos extraíble en agua, es conocido que las saponinas y flavonoides, metabolitos mayoritarios dentro de la especie, son sustancias polares y es posible extraerlas en caliente o en frío con agua o alcoholes de bajo peso molecular (67). Además, estos fitoconstituyentes son de suma importancia para inhibir la formación del cálculo urinario.

Se sometieron a extracción 273 gramos del material vegetal seco y se obtuvieron 38,69 gramos de extracto acuoso seco.

### 3.3. Determinación del contenido de sólidos totales y rendimiento del extracto acuoso

Se procedió a la determinación de los sólidos totales contenidos en el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens*. Este parámetro nos permite tener elementos sobre la cantidad de metabolitos que el disolvente empleado es capaz de extraer del material vegetal, el conocimiento de este índice se hace necesario para establecer las dosis a emplear cuando se realizan estudios biológicos a partir de extractos de plantas medicinales, en este caso se obtuvo un valor equivalente a 58,3 mg/mL.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

El rendimiento del extracto fue de 14,17%. Se debe considerar que dicho extracto no está estandarizado y que el valor obtenido puede estar influido por factores climatológicos que afectaron el desarrollo de la planta.

### 3.3. Características organolépticas

El sólido pulverulento presentó un color verde olivo ligeramente oscuro, con olor característico y penetrante, sabor amargo y sus partículas mostraron apariencia irregular.



**Figura 2.** Características organolépticas del sólido pulverulento obtenido a partir de las hojas *Boldoa purpurascens* Cav.

### 3.4. Evaluación *in vivo* de la actividad antiurolitiásica del extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens*

Se empleó el método de hiperoxaluria inducida por EG y CA por ser un método poco invasivo, y en el cual se pueden evaluar distintos parámetros como: la función renal (pH, densidad urinaria, determinación de creatinina, urea y ácido úrico), ácido oxálico en orina, alteración de la morfología del tejido renal así como la presencia-ausencia de cálculos renales (mediante técnicas histológicas).

#### 3.4.1. Parámetros evaluados en orina

El etilenglicol (EG) es un precursor metabólico del oxalato, por lo que su administración a animales de experimentación resulta en hiperoxaluria y cristaluria al inducir efectos modificantes en la orina como sobresaturación, inactivación de los inhibidores naturales de cálculos y disminución del pH que favorecen el depósito de cristales de oxalato cálcico monohidrato en células tubulares renales.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

La administración de cloruro de amonio (CA), sustancia que promueve la acidosis metabólica, se ha empleado con frecuencia junto al EG para inducir una alta tasa de depósitos uniformes de cristales de oxalato de calcio en modelos experimentales. La urolitiasis consiste en el depósito de cristales de diferentes compuestos, en el 80% de los casos es oxalato de calcio cuya formación depende de la hiperoxaluria y alteraciones del pH urinario (68).

Se conoce que, si el pH es alcalino reduce la cristalización del oxalato de calcio ya que el fosfato y el citrato se disocian incrementando la complejación del calcio evitando que se una al oxalato; sin embargo, a pH mayor de 6 se favorece la formación de cálculos de fosfato de calcio (69).

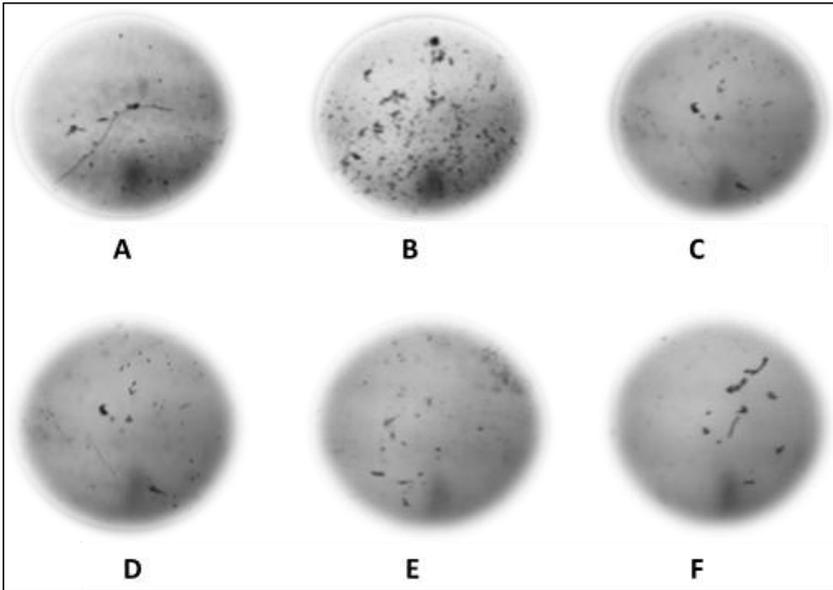
El pH de la orina en el grupo I tuvo valores entre 6 y 7. Al inducir los cálculos de  $\text{CaO}_x$ , el pH para el grupo II resultó ser de 5, los grupos III, IV, V y VI mostraron un incremento de este parámetro alcanzando valores entre 7 y 8, lo cual indica la presencia de las sales de calcio en este fluido biológico que se están eliminando por la acción de la cistona y del extracto de *B. purpurascens* administrados, no así para el grupo II que no recibió tratamiento con dicho extracto.

Los grupos experimentales evidenciaron una menor densidad urinaria en comparación con el grupo control II. El elevado valor para el pH urinario en el grupo de mayor dosis con respecto al grupo control II se corresponde con otros trabajos realizados (70, 71).

El análisis de microscopía de orina reveló que la cantidad y el tamaño de los cristales de oxalato de calcio es mayor en la orina de los animales del grupo litiasico (Grupo II) (Figura 3B), en comparación con el grupo de control (Figura 3A).

Por otro lado los grupos tratados con extracto acuoso mostraron una reducción significativa en la cantidad y el tamaño de los cristales de oxalato de calcio en comparación con el grupo II (D, E y F), al igual que el grupo III tratado con cistona (Figura 3C).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 3:** Fotografías de microscopía de orina del grupo tratado con extracto acuoso. (A) grupo normal (control, no tratado); (B) grupo de control litiásico (no tratado); (C) grupo tratado con cistona; (D) grupo tratado con extracto acuoso (100 mg/Kg); (E) grupo tratado con extracto acuoso (200 mg/Kg); (F) grupo tratado con extracto acuoso (400 mg/Kg)

La toxicidad del etilenglicol se ha relacionado con el producto de degradación metabólica del ácido oxálico, que, cuando está presente en una concentración suficiente, cristaliza como oxalato de calcio en el tejido corporal y cuando se administra en agua potable a concentraciones del 25-10 % produce el oxalato en piedra. La formación de cálculos por el etilenglicol es causada por la hiperoxaluria, que causa un aumento de la retención renal y la excreción de oxalato. El aumento de la excreción urinaria de fosfato junto con el estrés por oxalato parece proporcionar un entorno adecuado para la formación de cálculos formando cristales de fosfato de calcio, que inducen la deposición de oxalato de calcio de forma epitaxial. La desposición renal de oxalato de calcio provocada por el EG y el CA en ratas es usada frecuentemente para mimetizar la formación de cálculos urinarios en humanos. El CA, por su parte, acelera el proceso de litogénesis (72).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

La administración de EG + CA en agua por 10 días provocó un incremento significativo en la deposición de los niveles de calcio y oxalato en los riñones, observado en todos los grupos, excepto para el grupo I.

Se observó una leve degeneración de las células y la formación de quistes. La hiperabsorción de calcio se debe a una reabsorción tubular renal defectuosa.

En la urolitiasis, la tasa de filtración glomerular (GFR) disminuyó debido a la obstrucción de la salida de orina por cálculos en los sistemas urinarios, debido a esto, los productos de desecho, particularmente las sustancias nitrogenadas como la urea, la creatinina y el ácido úrico se acumulan en la sangre (73, 74).

Las alteraciones enzimáticas son factores causantes de la hiperoxaluria idiopática, que causa un aumento de retención renal y excreción de oxalato. En este estudio, la suplementación con extracto acuoso de *B. purpurascens*, disminuyó el riesgo de formación de cálculos con disminución de los niveles de calcio. El extracto evaluado a las diferentes dosis aceleró el proceso de disolución de los cálculos preformados en régimen curativo y la prevención de la formación de nuevos cálculos en la orina, lo que puede deberse al efecto diurético que posee la planta y una posible actividad antioxidante (75) por la presencia de metabolitos mayoritarios en la especie como los flavonoides y saponinas. En este sentido es importante señalar que las saponinas poseen propiedades antilitiásicas y son conocidas por desintegrar mucoproteínas que son componentes cruciales de la matriz del cálculo. Los flavonoides también poseen potencia de disolución del cristal de oxalato de calcio (CaOx) (76, 77).

La tasa de formación de especies de oxígeno parcialmente reducidas aumenta en la urolitiasis y/o las defensas antioxidantes de las células se debilitan, lo que finalmente conduce a una lesión celular oxidativa; los flavonoides además exhiben actividad antioxidante evitando que las células causen lesiones favoreciendo la actividad antilitiásica (78).

El aumento de calcio en la orina es un factor que favorece la nucleación y precipitación de oxalato de calcio o apatito (fosfato de calcio) de la orina y posteriormente, el crecimiento de cristales. Además, la hipercalciuria disminuye la actividad inhibitoria contra la cristalización de la orina, al unirse a inhibidores naturales e inactivarlos.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Por su parte, el ácido úrico interfiere con la solubilidad del oxalato de calcio y se une y reduce la actividad inhibitoria de los glicosaminoglicanos. El predominio de los cristales de ácido úrico en los cálculos de oxalato de calcio y la observación de que las proteínas de unión al ácido úrico son capaces de unirse al oxalato de calcio y modular su cristalización también sugiere su papel principal en la formación de cálculos.

Un significativo incremento en la excreción de calcio, ácido úrico y urea se observó en el grupo II, al compararlo con el control negativo (Tabla 6). En los grupos III y VI hubo un discreto incremento, obteniéndose los valores más bajos para el grupo VI, lo cual sugiere que a esta dosis el extracto actúa inhibiendo la formación del cálculo o disolviendo los cristales formados. El test de Kruskal Wallis reveló que existen diferencias significativas entre los grupos de las dosis administradas y los controles (Sig.  $p < 0,05$ ) y que el efecto observado fue dependiente de la dosis.

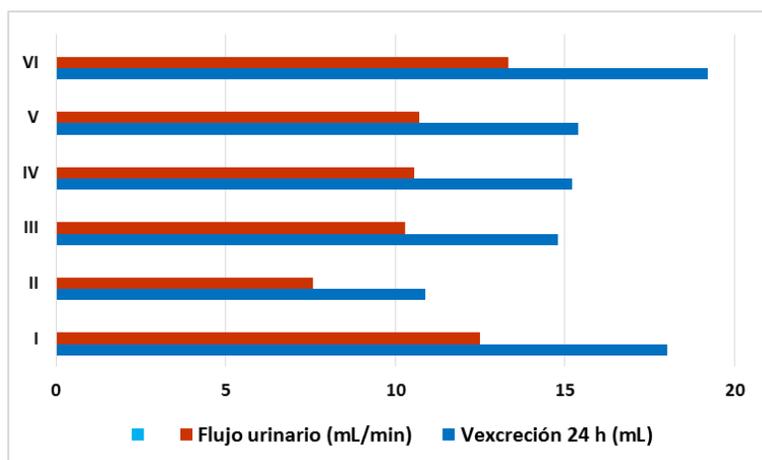
**Tabla 6.** Comparación de los parámetros bioquímicos en la orina al concluir el experimento mediante el test de Mann Whitney

Grupos	Ácido úrico ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	Urea ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	Calcio ( $\text{mmolL}^{-1}$ )
Agua destilada (I)	18,00±5,00	7,50±6,54	0,12±0,27
EG + CA (II)	37,20±7,95***	17,10±1,05**	3,64±3,70 ***
EG + CA + cistona (III)	19,00±7,35	10,22±3,49	1,00±0,37*
EG + CA + cext (100 mg/Kg) (IV)	32,60±11,06**	15,94±0,05*	2,72±0,80**
EG + CA + cext (200 mg/Kg) (V)	28,00±22,09*	11,40±3,29	2,28±0,43**
EG + CA + cext (400 mg/Kg) (VI)	22,20±5,81*	9,84±2,17	2,20±0,36**

Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig.  $p < 0,05$  (Análisis Vertical)

El volumen de orina también jugó un papel importante en la formación de cristales de CaOx, observándose una disminución en la producción de orina excretada en 24 horas así como en el flujo urinario, particularmente en el grupo II (control litiasico) e indicando una obstrucción (Figura 4).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN



**Figura 4.** Flujo urinario y velocidad de excreción

Para los grupos tratados con el extracto acuoso de *Boldoa purpurascens* a todas las dosis, así como para los animales tratados con cistona, se observó un incremento en el volumen de orina excretado y en el flujo urinario, siendo mayor para el extracto a dosis de 400 mg/Kg. Esto puede estar relacionado con la potente acción diurética descrita para la especie. El aumento del volumen de orina disminuye la saturación del oxalato y previene la precipitación del CaOx a pH fisiológico. La diuresis también ayuda al sistema renal y a la expulsión mecánica de la piedra (79).

### 3.4.2. Resultados de parámetros bioquímicos en suero

En la urolitiasis, el daño tubular producido por los derivados del EG, principalmente el oxalato, conlleva a una disminución de la reabsorción y secreción tubular fisiológica, en el caso del primero, incrementa la sobresaturación del medio, con mayor formación de cálculos que obstruyen las vías urinarias; por su parte, la disminución de la secreción tubular de sustancias incrementa sus concentraciones séricas también. Ambos efectos, globalmente, llevan a un incremento de metabolitos en sangre, la filtración glomerular disminuye debido a los cálculos que se forman en el sistema urinario que obstruye el flujo y excreción normal de orina (80).

Según lo informado por Boehm y col. (2007), para las ratas Wistar machos, los valores de referencia para estos parámetros bioquímicos en suero son: ácido úrico entre 0,20-0,91

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

mg/dL (12-54  $\mu\text{molL}^{-1}$ ); creatinina entre 0,35-0,54 mg/dL (31,0-48,0  $\mu\text{molL}^{-1}$ ) y urea entre 24,02 –55,86 mg/dL (4,0-9,30  $\text{mmolL}^{-1}$ ) (81).

Teniendo en cuenta estos valores de referencia, en las ratas de control litiasico (Grupo II), el daño renal marcado se evidenció por la elevación de los niveles de creatinina, ácido úrico y urea en suero (Tabla 7). Los niveles de ácido úrico sérico en los grupos experimentales también se encontraron disminuidos respecto al grupo control II. Estos valores elevados en los animales de control litiasico (grupo II) pueden deberse a la obstrucción del flujo de salida de la orina por cálculos en el sistema urinario.

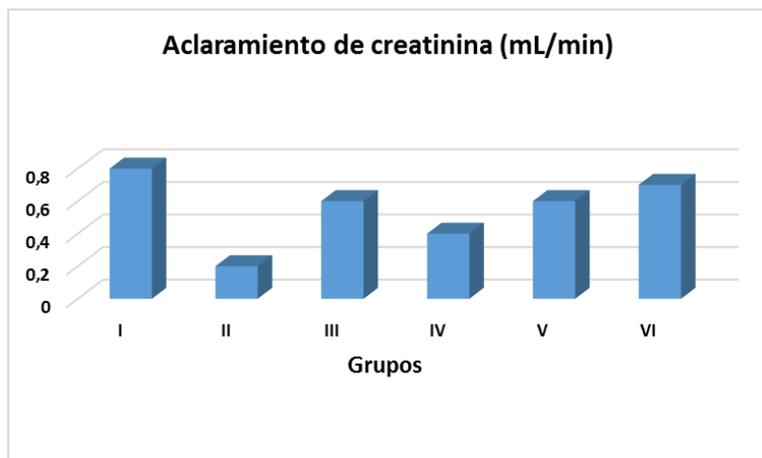
**Tabla 7.** Comparación de los parámetros bioquímicos en suero al concluir el experimento mediante el test de Mann Witney

Grupos	Ácido úrico ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	Urea ( $\text{mmolL}^{-1}$ )	Creatinina ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )
Agua destilada (I, control negativo)	142,17±22,08	5,53±4,01	37,33±7,69
EG + CA (II, control litiasico)	299,80±85,40***	8,84±1,54*	84,33±5,82***
EG + CA + cistona (III, control positivo)	178,00±24,17	7,50±2,00	51,60±14,38*
EG + CA + ext (100 mg/Kg)	217,83±18,70**	7,63±2,23	79,50±26,45***
EG + CA + ext (200 mg/Kg)	204,75±51,42**	7,57±1,92	73,40±18,28**
EG + CA + ext (400 mg/Kg)	161,20±46,64	6,57±3,43	38,17±7,71

Letras diferentes muestran diferencias significativas con sig.  $p < 0,05$  (Análisis Vertical)

La administración de EG + CA en el agua de beber en el grupo II y el resto de los grupos, incrementaron los niveles de ácido úrico, urea y creatinina al compararlos con el grupo I (control negativo). Para el caso del grupo que recibió cistona, el aumento fue significativamente inferior al igual que en los grupos tratados con el extracto a las diferentes dosis, obteniéndose el mejor resultado a 400 mg/Kg, superior incluso que en el grupo control positivo y con un valor muy similar el grupo control negativo.

Además, el deterioro de las funciones renales de las ratas no tratadas es evidente también a partir de los valores disminuidos en el aclaramiento de creatinina, otro de los marcadores de daño glomerular y tubular (Figura 5).



**Figura 5. Aclaramiento de creatinina**

La disfunción renal disminuye la capacidad de depurar la creatinina, por lo que el nivel de creatinina aumenta en la sangre. La normalización de este parámetro en los animales tratados con el extracto acuoso de *Boldoa*, en comparación con animales hiperoxalúricos muestra que la especie protege el deterioro de la función renal al minimizar el daño tubular y la deposición de cristales.

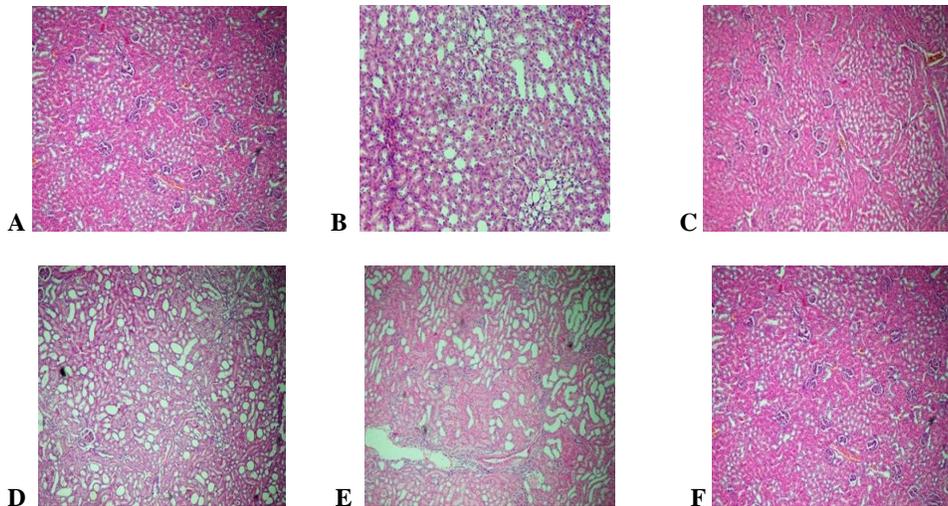
Resultados similares se obtuvieron para otras especies de la familia *Nictaginaceae*. Pareta y col. (2010) evaluaron la actividad antiurolitiásica del extracto acuoso de hojas de *Boerhaavia diffusa* Linn. Este estudio demostró que, a dosis de 100 y 200 mg/kg, el extracto redujo las deposiciones de cristales de oxalato en los riñones de las ratas tratadas mostrando un efecto dosis-dependiente y después de una semana de inducción de la urolitiasis. En este caso, *Boerhaavia diffusa* causa diuresis y acelera el proceso de disolución de los cristales preformados, ayuda a eliminar el cálculo y a mejorar la función renal. Finalmente, los resultados de este estudio indicaron que *Boerhaavia diffusa* Linn. posee actividad antiurolitiásica, mediada probablemente por su efecto diurético e hipooxalúrico (82).

#### **3.4.4. Evaluación histopatológica de los riñones de los diferentes grupos**

El estudio histopatológico de los riñones de las ratas en el grupo I (sin tratamiento) presentaron un aspecto normal con glomerulos normales, túbulos contorneados

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

proximales y distales sin cambios inflamatorios, vasos sanguíneos normales y sin depósitos de oxalato de calcio (Figura 6A).



**Figura 6.** Histopatología del riñón. (A) grupo normal (no tratado I) (B) grupo de control litiasico (no tratado II) (C) grupo tratado con cistona III; (D) grupo tratado con extracto acuoso (100 mg/Kg IV);(E) grupo tratado con extracto acuoso (200 mg/Kg V); (F) grupo tratado con extracto acuoso (400 mg/Kg VI)

En el grupo control (II) litiasico, hubo presencia de calcio puntiagudo, pequeño y delgado, cristales de oxalato en la luz del túbulo contorneado proximal (Figura 6B). Los túbulos estaban muy dilatados (Figura 6B). Los cristales causaron la dilatación de los túbulos proximales junto con Inflamación intersticial.

Los animales tratados con cistona al igual que los tratados con extracto acuoso a todas las dosis muestran una normalidad en las células epiteliales tubulares y glomérulos, con presencia de pocos cristales, así como la aparición de edema leve y dilatación en los túbulos (Figura 6D, E y F).

Para el presente estudio, los resultados obtenidos indican la presencia de uno o más componentes inhibidores de la agregación de cristales de oxalato de calcio en la planta que interfieren con el crecimiento y la agregación de los mismos. Esto probablemente sea

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

---

un indicador de una posible estrategia terapéutica para la prevención de la enfermedad recurrente de urolitiasis.

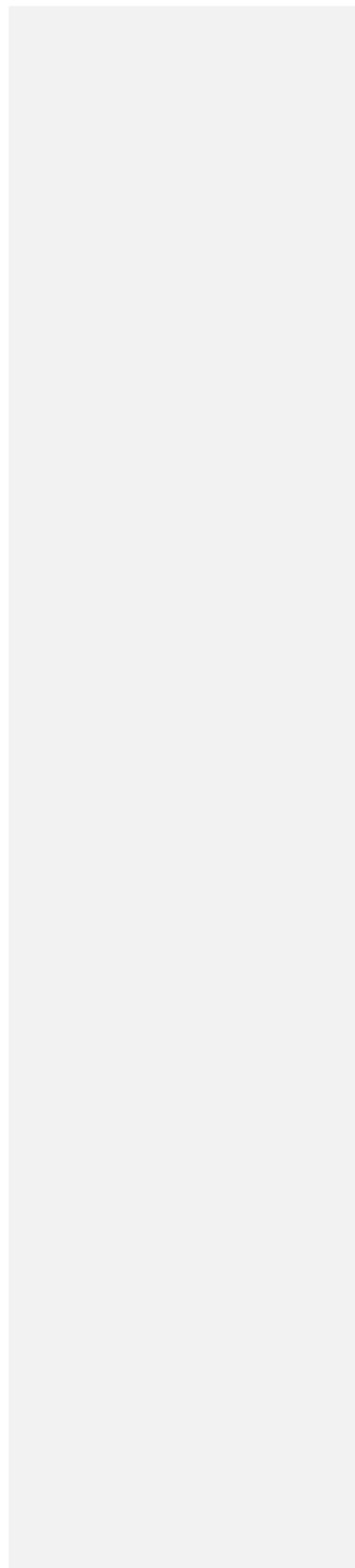
Se ha informado que el extracto de *Boldoa purpurascens* posee actividades antiinflamatorias (4, 12) y antimicrobianas (83), lo que puede complementar su efecto beneficioso ya que la infección y la inflamación están asociadas con el proceso de la urolitiasis.

En el caso de la litiasis renal, la existencia de terapias alternativas como la fitoterapia presenta la ventaja de complementar y sustentar un tratamiento por un largo período de tiempo, necesario para mitigar la presencia de urolitos, sobre todo en personas de estratos sociales bajos en las que la patología se agrava por no tratarse en forma y tiempo adecuados (84).

El uso de plantas medicinales es un aspecto cultural y social que constituye una opción viable para la población que no puede pagar una terapia costosa; sin embargo muchas veces se atribuyen propiedades antilitiásicas a una determinada infusión vegetal sin especificar a qué tipo de cálculo va dirigido, si se considera que la etiología de los cálculos mayoritarios es claramente diferente entre urolitos de distinta composición e incluso dentro de un mismo tipo, debe admitirse que es difícil entender que una sola planta pueda corregir factores etiológicos tan heterogéneos. No obstante se acepta que cierta acción diurética y desinfectante puede ser beneficiosa, ya que al aumentar la cantidad de orina excretada, por simple acción mecánica, puede favorecer la eliminación de arenillas o fragmentos de cálculos y, por otra parte, la acción antiséptica protege al urotelio de ataques bacterianos que actuarían facilitando el anclaje de núcleos cristalinos o micro cálculos en ellos. Por ello, es importante evaluar los principios activos de dichas plantas con el fin de comprender, demostrar y avalar el potencial farmacológico de éstos para sustentar su uso popular.



## *Conclusiones*

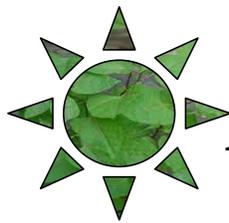


## CONCLUSIONES

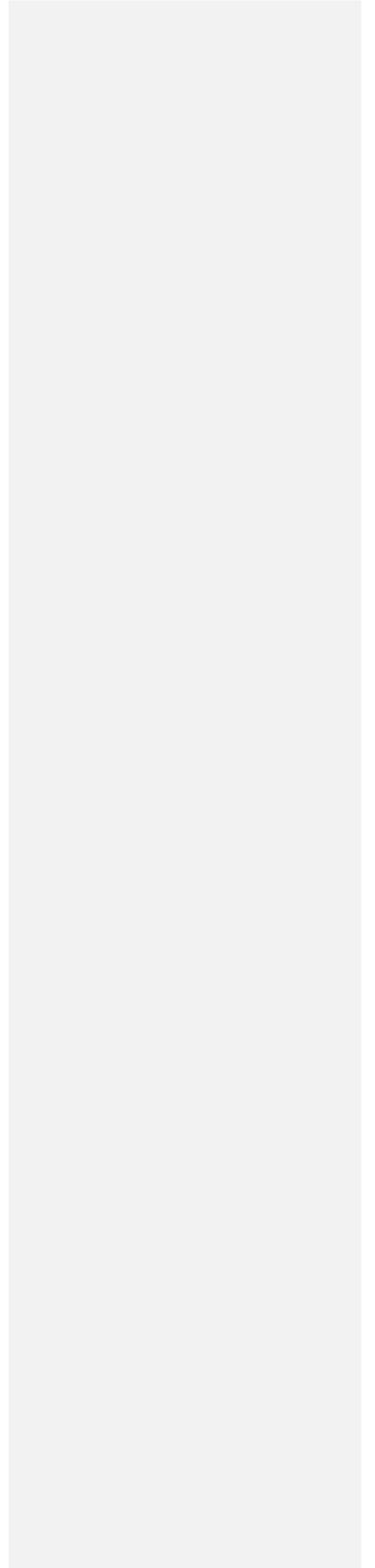
---

### Conclusiones

1. Los hallazgos de este estudio demostraron que el extracto acuoso de las hojas de *Boldoa purpurascens* poseen actividad antiurolitiásica por inhibición o disolución del calcio inducido por el etilenglicol en ratas.
2. La evaluación histopatológica permitió valorar los daños renales provocados por la inducción de los cálculos con etilenglicol, observándose la presencia de atrofia glomerular y la deposición de cristales y el logro de la normalidad de las células epiteliales tubulares y glomérulos a administrar el extracto acuoso de la planta.



## *Recomendaciones*

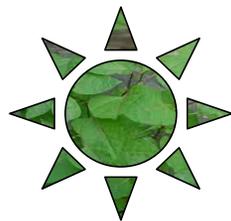


## RECOMENDACIONES

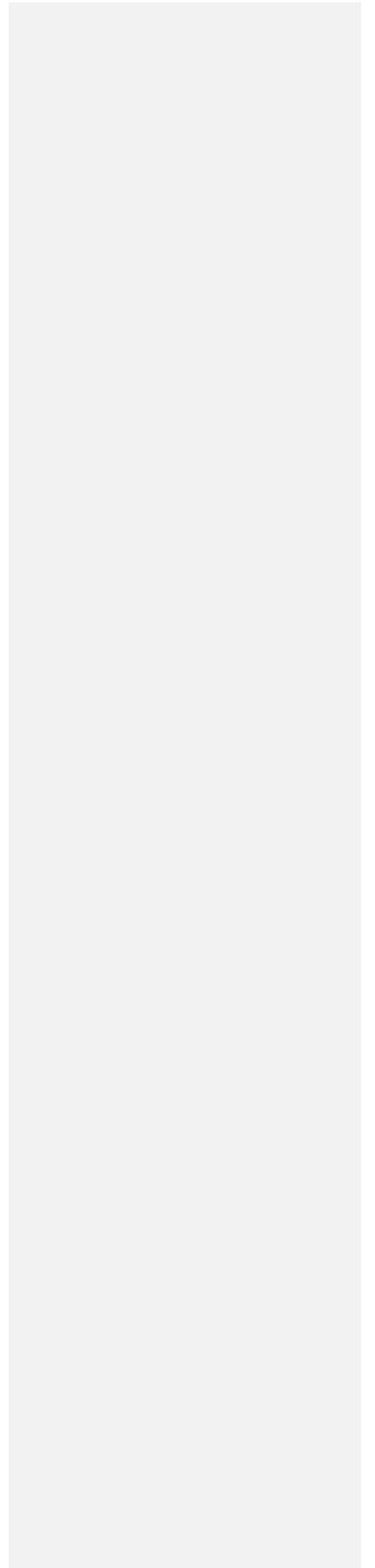
---

### Recomendaciones

- ❖ Realizar la evaluación de la actividad antioxidante de las hojas de la planta, por su relación con la actividad antilitiásica.



*Referencias  
Bibliográficas*



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

### Referencias Bibliográficas

1. Anabel GA. Contribución al estudio fitoquímico y farmacológico de la especie *Eugenia clarensis* Britton & P. Wilson. 2017.
2. Charles. E. Aislamiento y Caracterización de metabolitos a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens*. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico. 2010.
3. Adrienne ÁP. Nuevos aportes al perfil farmacognóstico y farmacológico de la especie *Boldoa purpurascens* Cav. 2018.
4. Tomás AR. Actividad Antinflamatoria del extracto etanólico y fracciones obtenidas a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens* cav. 2015.
5. Mosquera DMG, Ortega YH, Kilonda A, Dehaen W, Pieters L, Apers S. Evaluation of the in vivo anti-inflammatory activity of a flavonoid glycoside from *Boldoa purpurascens*. 2011.
6. Lorraine SL. Desarrollo de formulaciones de tabletas a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens* Cav. Evaluación preliminar. 2017.
7. Jussieu ALD. Nyctaginaceae. Flora argentina. 1997.
8. Velloso JCR, Regasini LO, Khalil NM, Silva Vd, Bolzani, Khalil OAK, et al. Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and isoquercitrin. 2011.
9. Fernández OY. Estudios de preformulación de los sólidos pulverulentos obtenidos a partir de *Boldoa purpurascens*. Cav. 2007.
10. Morales MYA. Evaluación de la actividad antiagregante plaquetaria y analgésica del extracto hidroalcohólico obtenido a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens* cav. 2010.
11. Elide C. Aislamiento y Caracterización de metabolitos a partir de las hojas de *Boldoa purpurascens*. Evaluación de la actividad antioxidante del extracto hidroalcohólico. 2010.
12. Mosquera MCDMG. Evaluación Fitoquímica y Farmacológica del extracto acuoso de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens*, Cav. 2006.
13. Fernández ML. Evaluación fitoquímica y toxicológica del extracto hidroalcohólico al 80% del tallo de *Boldoa purpurascens* Cav. 2011.
14. Boniface K. Saco intestinal aislado para estudio in vitro de transporte de flavonoides. 2012.
15. Bernal YM. Comprobación de la actividad diurética de una flavona aislada del extracto acuoso de *Boldoa Purpurascens* (Nitro Blanco). 2006.
16. AMAO. BLS, DAZA. BDR. Evaluación del efecto antiurolítico e influencia en la función renal del extracto seco hidroalcohólico al 70 % de *Mikania cordifolia* en litiasis renal inducida en animales de experimentación. 2013.
17. Puente Cabezas SS, Vilcayauri Delgado AM. Efecto antilítiasis del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Chuquiraga spinosa* – Huamanpinta en ratas albinas cepa holtzman. 2018.
18. Medina JC. Determinación del efecto antinefrolítico y diurético de la *Manicaria saccifera*. 2011.
19. Uribe YA. Influencia del extracto acuoso de flores de *Boldoa purpurascens* Cav. en la germinación de *Leucaena Leucocephala* cv. Cunningham. 2013-2014.
20. Rodríguez GE. Cuantificación de flavonoides en el extracto etanólico 80% de las hojas de la especie *Boldoa purpurascens* Cav. 2011.
21. G BL, Banji D, J. O, Banji F. Evaluation of antiurolithiatic activity of the aqueous and alcoholic extracts of roots of *Boerhaavia Difusa*. 2015.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

22. By. B. Comprobación de la actividad hipoglicemiante de extractos de *Boldoa purpurascens* Cav. Aislamiento y caracterización del D-pinitol. 2010.
23. Rubinstein E, Carrete P. Litiasis renal. Litiasis renal. 1a ed ed. Buenos Aires 2009.
24. Betancourt-Valladares M, Guerrero-Betancourt M, Ramírez D. Alteraciones morfológicas en riñones de ratas sometidos a isquemia reperusión. Medicina e investigación. 2016.
25. Barroso AP. Influencia de los extractos acuosos de las hojas y tallos de *Boldoa purpurascens* Cav. en la germinación de *Leucaena Leucocephala* cv. Cunningham. 2013-2014.
26. Mazza DO. Guías para el Tratamiento de la Litiasis Renal y Ureteral. 2014.
27. Sindu PS, Aparna M, Sravani B, Kranthi M, Maheswari TR. Evaluation of selected medicinal plants for antiurolithiatic activity. 2012; Vol. 3, Issue 12.
28. Joshi P. Evaluation of the antiurolithiatic activity of ethanolic extract of *Celosia Argentea*. 2012.
29. Kaleeswaran B, Ramadevi S, Murugesan R, Srigopalram S, Suman T, Balasubramanian T. Evaluation of anti-urolithiatic potential of ethyl acetate extract of *Pedalium murex* L. on struvite crystal (kidney stone). Journal of Traditional and Complementary Medicine. 2017.
30. P.Barceló, Vila R. Estructura de los cálculos renales. Metodología de estudio. 1996.
31. Abrisqueta DJA. Perspectivas actuales de la genética humana.
32. Wolfman GKaM. An Automated Procedure for the Simultaneous Determination of Calcium and Phosphorus. July 12, 1963.
33. Neira-Carrillo A, Vásquez-Quitral P. Formación de calculos renales de oxalato cálcico en mamíferos. February 2012.
34. ANTONIO DAJ. PERSPECTIVAS ACTUALES DE LA GENÉTICA HUMANA. 1995.
35. H. Ilarslan JI, Harry T. Horner. Quantitative determination of calcium oxalate and oxalate in developing seeds of soybean (*Leguminosae*). 1997.
36. C. Türk TK, A. Petrik, K. Sarica, C. Seitz, M. Straub, O. Traxer. Guía clínica sobre la urolitiasis European Association of Urology. 2010.
37. Ramírez BMW. Estudio y análisis de tecnologías para el tratamiento y eliminación de cálculos renales y biliares utilizados en la población de el salvador. Enero 18 del 2003.
38. Pérez Gutiérrez RM, Vargas Solís R. Actividad antiurolitiasica del extracto acuoso de *mammillaria compacta* en ratas.
39. Camaggi M. C. Evaluación metabólica y nutricional en litiasis renal.
40. Galán JA. Atlas de diagnóstico práctico en litiasis. Asociación española de urología. 2012.
41. Machín MP, Cárdenas MB, Mosquera DMG, Jiménez EEM, Triana RM, al.] LEDce. Efecto de la administración oral continuada de *Boldoa purpurascens* Cav. sobre diferentes variables fisiológicas en ratas. 2009.
42. A.Elumalai, Eswaraia MC, Lahari KM, Shaik HA. In-vivo screening of *Bougainvillea glabra* leaves for its Analgesic, Antipyretic and Anti-inflammatory activities. 2012.
43. Lakshmi T, Devaraj E. Antiurolithiatic activity of phytochemical extracts. 2017.
44. Polo AE. Tratamiento activo de la urolitiasis, ¿hay alternativa a la cirugía o la litotricia?
45. Babak Baharvand-Ahmadi2 PT, Mahmoud Rafeieian-Kopaei. Identification of medicinal plants for the treatment of kidney and urinary stones. Journal of Renal Injury Prevention. 2016.
46. Chitme HR. Herbal treatment for urinary stones. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 2010.
47. A J, Roberts, HR S. Ethylene glycol toxicity in the Monkey. Toxicol Appl Pharmacol. 1996.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

48. R S, P K, A G, V BM, AS SK. Effect of *Aerva lanata* flowers extract and *Vediuppu chunnam* on the urinary risk factor of calcium oxalate urolithiasis during experimental hyperoxaluria. *Pharmacol Res.* . 2001.
49. WG R, M P. The cause of idiopathic calcium disease; hypercalciuria or hyperoxaluria? 1980.
50. Jr LJ, EM W, RW G. Hypercalciuria and stones. *Am J Kidney Dis.* 1991.
51. K R, MD L, ML S. Uric acid nephrolithiasis. *Urol Clin North Am.* . 1997.
52. PB G. Chemical tests in kidney disease. In; textbook of medical laboratory technology, 1st ed. Bhalani Publing House, Mumbai. 1994.
53. HG R, M S. Effects of magnesium deficiency on intra tubular calcium oxalate formation and crystalluria in hyperoxaluria rats. *Journal of Urol.* 1982.
54. RL R, RM H, VR M. The effect of urine pyrophosphate citrate, magnesium and glycosaminoglycans on the growth and aggregation of calcium oxalate crystals in vitro *Clin Chim Acta.* 1991.
55. M T, A L, K E, F L, I Z, Y E. Lemon juice has protective activity in a rat urolithiasis model. *BMC Urology.* 2007.
56. SR K, B F, KL H. Experimental calcium oxalate nephrolithiasis in the rat. Role of the renal Papilla. *American Journal of Pathology.* 1982.
57. S B, C H, E M-G, N A, M L. Pharmacological and toxicological effects of *Paronychia argentea* in Experimental calcium oxalate nephrolithiasis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2010.
58. P V, Y S, E C. Effect of *Crataeva nurvala* in experimental urolithiasis rat. . *J Ethnopharmacol.* 1990.
59. CW V, WJ G, R G, Ragins, HD, NO C. Experimental urolithiasis. Developmental of calculi upon foreign bodies surgical introduction into bladder of rats. *Journal of Urology* 1950.
60. RB G, TK S, LN M, SC. C. Antiurolithiatic activity of *Coleus aromaticus* benth in rats. . *Ancient Science of life.* 2000.
61. R V, RM P, S P, MA Z, C. P. Antiurolithiasis activity of *Raphanus sativus* aqueous extract in rat. . *J Ethnopharmacol.* 1999.
62. Leary S, Underwood W, Anthony R, Cartner S. *AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals.* 2013.
63. Teruel JL, Sabater J, Galeano C, Rivera M, Merino JL, Lucas MF, et al. La ecuación de Cockcroft-Gault es preferible a la ecuación MDRD para medir el filtrado glomerular en la insuficiencia renal crónica avanzada. *NEFROLOGÍA.* 2007;Volumen 27.
64. Normal de eliminación de ácido úrico en orina de 24 horas. *Unidad de Bioquímica Clínica.* 1982.
65. BM V, Díaz - Tenorio L, López - Salinas N, Güemes - Vera N, Hernández - Chávez JF. Determination of uric acid precursors associated to red and processed meats consumption: hipoxanthine and xanthine in blood by zone capilar electrophoresis. 2012;Vol. 6.
66. Mesa DJTRy. *Diccionario botánico de nombres vulgares cubano* 1965.
67. Larrasoña OI. Influencia de la temperatura y el tiempo de secado en la calidad de las hojas de *Cymbopogon Citratus* D.C. *STAF.* 2010.
68. López-Cabanillas R, Huayanay-Conde R, Gonzales C, Maguiña M, Granados I, al.] M Ce. Actividad antiurolítica del extracto etanólico de propóleo Ayacuchano en ratas. 08/11/2017.
69. Sonja L, Allen R. Idiopathic calcium oxalate urolithiasis: risk factors and conservative treatment. *Clinica Chimica Acta.* 2004.
70. BA V, RB V, SV J, DD S. Antiurolithiatic Activity of Whole-Plant Hydroalcoholic Extract of *Pergularia daemia* in Rats. *Journal of Young Pharmacists.* 2011; Vol 3.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

71. RK P, NR K, PR T, TR D, PN B. Preclinical Evaluation of Antiurolithiatic of Swertia Chiratastem. 2012.
72. Bilbault H, Perez J, Huguet L, Vandermeersch S, Placier S. Urothelium proliferation is a trigger for renal crystal deposits in a murine lithogenesis model. 2018.
73. Effect of A. lanata leaf extract and VEDIUPPU CHUNNAM on the urinary risk factors of calcium oxalate urolithiasis during experimental hyperoxaluria. *Pharmacological Research*. 2001;43(1):89-93.
74. Bashir S, Gila A. Antiurolithiatic effect of *Bergenia ligulata* rhizome: An explanation of the underlying mechanisms. . February 2009.
75. Pearle MS, Goldfarb DS, Assimos DG, Curhan G, Denu-Ciocca CJ, Manoj BRM, et al. Medical management of kidney stones:AUA Guideline. 2014.
76. Candela JLF. Las saponinas y la botánica.
77. Guzmán ACH, Carazo VJH. Efecto de la concentración de saponinas en la actividad hemolítica de extractos de ocho plantas de uso medicinal en Guatemala. 2014.
78. Martínez-Flórez S, González-Gallego J, Culebras JM, Tuñón MJ. Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. 2002,.
79. Sridharan B, Michael ST, Arya R, Roopan SM, Ganesh RN, Viswanathan. P. Beneficial effect of Citrus limon peel aqueous methanol extract on experimentally induced urolithic rats. *Pharmaceutical Biology* 2016.
80. Liao L, Richardson K. The metabolism of oxalate precursors in isolated perfused rat livers. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1972;153(2):438-48.
81. Boehm BOea. Octreotide reduces vitreous hemorrhage and loss of visual acuity risk in patients with high-risk proliferative diabetic retinopathy. *HormMetab*. 2007.
82. Pareta SK, Patra KC, Mazunder PM, Sasmal D. Aqueous extract of *Boerhaavia diffusa* root ameliorates ethylene glycol-induced hyperoxaluric oxidative stress and renal injury in rat kidney. 2010.
83. MachínI MP, Monteagudo EEJ, Cárdenas MB, Mosquera DMG, TrianaV RM, Machado BV, et al. Acute toxicity of an aqueous extract of *Boldoa purpurascens* Cav. in the up and down model in rats 2008.
84. JM M-C, J. T. Rehabilitación neuropsicológica. Madrid. 2001.



## *Anexos*

**Comentario [H2]:** Pon algunas fotos de la sratas cdo le estabas haciendo los procedimientos y la imprimes a color y pone sfotos d elos cristales en la orina también a En anexos

Anexos

Anexo 1: Certificado por el productor (CENPALAB)

GC.CC.10.18 Dirección de Aseguramiento de la Calidad  CENPALAB  
 Folio: 181 Grupo de Aseguramiento de la Calidad  
**CERTIFICADO DE CALIDAD DE ROEDORES SPF. Salud y Zootecnia**

Especie	Banco Genético	Colonia Expansión	Colonia Producción	Línea	Lote	Total de cajas
Rata			Sancti Spiritus	Cenp-WI	43007919	5
Machos/Hembras	Total	Peso	Edad	Centro de destino	Fecha Expedición	Hora
45 -	45	12690	6-35m	CVA Villa Clara	23/10/18	11:10

**Dictamen Zootécnico e Inspección Clínica**

Los animales en el momento de la expedición se encuentran clínicamente sanos, sus características morfológicas, fisiológicas y reproductivas se corresponden con la especificación de calidad de este producto. Proceden de una colonia con ambiente controlado y mantenidos en un sistema de producción intensivo aprobados para la línea de alimentación se realiza con alimentos concentrados fórmula **ALYCO** EMO 1002 esterilizable a razón de 22.4 a 30 g diarios. Dicha producción se encuentra bajo las BPP y un Sistema de Gestión de la Calidad que garantiza el estado higiénico sanitario de los animales que se expiden.

**Resultados de Bacteriología \***

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Salmonella sp.	Cult/ Serot	X			24/07/18	Shigella flexneriae	Cult/ Serot	X			24/07/18
Streptococcus sp. equisubsp.	Cultivo		X		-	Shigella flexneriae	Cult/ELISA	X			24/07/18
Streptococcus B hemolítico	Cult/ Serot	X			24/07/18	Campylobacter jejuni	Insp. Clínica	X			09/02/18
Bacteroides bronchiseptica	Cult/ ELISA	X			22/06/18	Legionella sp.	ELISA/ Mop	X			22/09/18
Pneumococcus sp.	Cultivo	X			27/04/18	Mycoplasma pulmonis	Cult/ELISA	X			27/04/18
Corynebacterium kutscheri	Cult/ ELISA	X			24/07/18	Mycoplasma pulmonis	Cult/ELISA	X			27/04/18
Leptospira	Insp. Clínica/Cultivo	X			24/07/18						

**Resultados de Parasitología \***

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Entamoeba	DIR/ FLOT	X			18/07/18
Toxoplasma gondii	ELISA	X			17/08/18
Trichostrongylus axei	Sedimentación	X			18/07/18
Echinostoma	Insp. Clínica	X			18/07/18

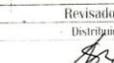
**Resultados de Virología \* (Serología)**

Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha	Entidad	Método	Pos.	Neg.	No Test.	Fecha
Virus Sendai (guinea): Virus vacuno (SDA/RCV)	IFA	X			15/05/18	Coronavirus Infeccioso (LCM)	IFA	X			15/05/18
Virus Peste (PPV)	IFA	X			15/05/18	Virus Dengue	ELISA/IFA	X			15/05/18
Virus Encefalomiélitis Thelae (TMEV)	IFA	X			15/05/18	Rotavirus Tipo 3 (RED 3)	IFA	X			15/05/18
Virus Vesicular (VH-1)	IFA	X			-	Virus Kiliam (KRV)	IFA	X			-
						Virus Hantaan	IFA	X			-

\* Según lo certificado por la Dirección de Aseguramiento de la Calidad del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio, de acuerdo al cronograma de monitoreo de los roedores criados y mantenidos en sistemas protegidos y que consta en los expedientes de la línea archivados en la Dirección de Calidad. Documento de referencia "Recomendaciones del monitoreo microbiológico para Roedores mantenidos y criados en condiciones controladas".

Válido a partir de **OCTUBRE /2018** hasta **DICIEMBRE /2018**.

Este certificado es copia fiel de la original que se elabora a partir de la liberación de la línea para su comercialización.

Cargo	Especialista Técnico de Calidad de la Dirección de Aseguramiento de la Calidad	Aprobado por	Dirección de Producción	Revisado por	Distribuidor
Firma					

Anexo 2: Procedimiento en el laboratorio con las ratas.



**ANEXOS**

---

**Anexo 3:** Cristales observados en el microscopio en muestras de orina.

