



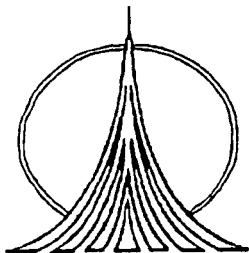
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

**Estudio de la Interacción Sinérgica de
Phytolacca americana L. y *Alnus acuminata* Subsp.
arguta (Schlecht.) Furlow Como Agentes
Antiinflamatorios en Rata Wistar.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A:
RICARDO ADRIÁN ROVELO MARTÍNEZ
DIRECTOR: Dr. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO



MÉXICO. D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION DISCONTINUA

**EL PRESENTE PROYECTO SE REALIZÓ EN EL CONJUNTO "E"
LABORATORIO 126 DEL DEPARTAMENTO DE FARMACIA DE LA
FACULTAD DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO Y FUE PARCIALMENTE FINANCIADO POR LA DIRECCIÓN
GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO A TRAVÉS DEL
PROYECTO DGAPA IN 212300**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS.

Al Dr. Nikolay Martínez Catillejos y la Dra. Rocío Morales Castellanos así como al Centro Fitoterapéutico de Investigaciones Biomédicas A.C. por su valiosa amistad y el apoyo proporcionado para la realización de este proyecto.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por su invaluable amistad, apoyo, enseñanza, y asesoramiento para la realización de este proyecto.

Al M en C. Jesús Arrieta Valencia por sus valiosos consejos para la realización de este tema de tesis.

A mis compañeros del laboratorio 126 por el apoyo y amistad durante la realización de esta tesis.

A los H. miembros del jurado por la revisión, comentarios y observaciones de este trabajo.

Dedicatoria.

Al Dr. Andrés Navarrete y al Dr. Nikolay Martínez por que gracias a sus consejos y apoyo he logrado mi formación profesional.

A mi familia por tener siempre su apoyo incondicional, paciencia y su cariño.

A ti Bety, mi niña linda por darme otra vez la confianza en mi mismo, por tu cariño y amor estaré eternamente agradecido contigo.

ÍNDICE.

RESUMEN.....	1
I. INTRODUCCIÓN.....	2
II. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	4
2.1 GENERALIDADES SOBRE EL PROCESO INFLAMATORIO.....	4
2.2 INFLAMACIÓN AGUDA.....	5
2.3 INFLAMACIÓN CRÓNICA.....	12
III. MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN.....	14
IV. MODELO DE INFLAMACIÓN INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS.....	15
V. GÉNERO <i>Phytolacca</i>	22
5.1 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <i>Phytolacca</i> (<i>Phytolaccaceae</i>).....	22
5.1.1 <i>Phytolacca americana</i> L.	22
5.1.2 <i>Phytolacca dioica</i> L.	24
5.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO <i>Phytolacca</i>	24
5.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE <i>Phytolacca americana</i>	27
5.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GÉNERO <i>Phytolacca</i>	31
5.3.1 <i>Phytolacca dodecandra</i>	31
5.3.2 <i>Phytolacca icosandra</i>	31
5.3.3 <i>Phytolacca esculenta</i>	31
5.3.4 <i>Phytolacca accinosa</i>	31
5.3.5 <i>Phytolacca rivinoides</i>	32
5.3.6 <i>Phytolacca americana</i>	32
VI. GÉNERO <i>Alnus</i>	35
6.1 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO <i>Alnus</i> (<i>Betulaceae</i>).....	35

6.1.1	<i>Alnus acuminata</i> Subsp. <i>arguta</i> (Schltdl).....	35
6.2	COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO <i>Alnus</i>	38
6.3	ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GÉNERO <i>Alnus</i>	42
6.3.1	<i>Alnus hirsuta</i> var. <i>sibirica</i>	42
6.3.2	<i>Alnus rubra</i>	43
6.3.3	<i>Alnus oregona</i>	43
6.3.4	<i>Alnus incana</i>	43
6.3.5	<i>Alnus hirsuta</i>	43
6.3.6	<i>Alnus maximowiczii</i>	44
6.3.7	<i>Alnus glutinosa</i>	44
6.3.8	<i>Alnus acuminata</i> Subsp. <i>arguta</i>	44
VII.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
VIII.	HIPÓTESIS.....	46
IX.	OBJETIVOS.....	47
	GENERAL.....	47
	PARTICULARES.....	47
X.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	48
10.1	Material vegetal.....	48
10.2	Preparación de los extractos vegetales.....	48
10.2.1	Preparación del extracto metanólico de <i>Phytolacca americana</i>	48
10.2.2	Preparación del extracto metanólico de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> Subsp. <i>arguta</i>	50
10.2.3	Preparación del extracto metanólico de las hojas de <i>Alnus acuminata</i> Subsp. <i>arguta</i>	51
10.2.4	Preparación de la mezcla de los extractos metanólicos de <i>Alnus acuminata</i> Subsp. <i>arguta</i> y <i>Phytolacca americana</i>	52
10.3	Determinación de la toxicidad (DL ₅₀) de los extractos metanólicos de <i>Phytolacca americana</i> y <i>Alnus acuminata</i>	53

10.3.1 Método de estimación de la toxicidad (DL ₅₀) para compuestos desconocidos.....	53
10.4 Modelo de inflamación inducida por carragenina en ratas.....	55
10.4.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos de <i>Alnus acuminata</i> y <i>Phytolacca americana</i>	55
10.5 Análisis estadístico.....	56
XI. RESULTADOS	60
XII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS	90
XIII. CONCLUSIONES	95
XIV. PROPUESTAS Y/O RECOMENDACIONES	96
XV. BIBLIOGRAFÍA	97

ÍNDICE DE FIGURAS.

FIGURA 1	Mediadores químicos en la inflamación.....	6
FIGURA 2	Conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas e intermediarios.....	9
FIGURA 3	Metabolitos del ácido araquidónico en la inflamación.....	11
FIGURA 4	Esquema de cooperación celular cuando los linfocitos-T y macrófagos y células sinoviales que intervienen en la inflamación crónica.....	13
FIGURA 5	Estructura de los tipos principales de carragenina.....	17
FIGURA 6	<i>Phytolacca americana</i> (hojas, racimos y flores).....	23
FIGURA 7	Mecanismo de acción de la Pokeweed Antiviral Protein (PAP).....	33
FIGURA 8	<i>Alnus acuminata</i> Subsp. <i>arguta</i> (hojas y frutos).....	37
FIGURA 9	Polígrafo MP 100 de Biopac System Inc.....	58
FIGURA 10	Diagrama para el registro de la inflamación en ratas Wistar	59

ÍNDICE DE TABLAS.

TABLA 1	Acción de los metabolitos del ácido araquidónico.....	12
TABLA 2	Modelos farmacológicos para evaluar inflamación en animales de experimentación.....	15
TABLA 3	Metabolitos secundarios mayoritarios encontrados en el género <i>Phytolacca</i>	25
TABLA 4	Principales metabolitos secundarios aislados en <i>Phytolacca americana</i>	28
TABLA 5	Metabolitos secundarios mayoritarios encontrados en el género <i>Alnus</i>	39
TABLA 6	Tabla para la estimación de la DL ₅₀ por la técnica de Lorke.....	53
TABLA 7	Estimación de la Toxicidad (DL ₅₀) del extracto metanólico de las hojas de <i>Alnus acuminata</i> administrado por vía intraperitoneal.....	60
TABLA 8	Estimación de la Toxicidad (DL ₅₀) del extracto metanólico de la corteza de <i>Alnus acuminata</i> administrado por vía intraperitoneal.....	60
TABLA 9	Estimación de la Toxicidad (DL ₅₀) del extracto metanólico de <i>Phytolacca americana</i> administrado por vía intraperitoneal.....	61
TABLA 10	Estimación de la Toxicidad (DL ₅₀) de la mezcla de los extractos de <i>Alnus acuminata</i> y <i>Phytolacca americana</i> administrados por vía intraperitoneal.....	62
TABLA 11	Valores de DE ₅₀ para los extractos metanólicos evaluados.....	85

ÍNDICE DE ESQUEMAS.

ESQUEMA 1	Proceso de extracción de <i>Phytolacca americana</i>	49
ESQUEMA 2	Proceso de extracción de la corteza de <i>Alnus acuminata</i>	50
ESQUEMA 3	Proceso de extracción de las hojas de <i>Alnus acuminata</i>	51
ESQUEMA 4	Elaboración de la mezcla de los extractos metanólicos.....	52
ESQUEMA 5	Metodología seguida para la determinación de la DL ₅₀ de los extractos metanólicos de <i>Phytolacca americana</i> , <i>Alnus acuminata</i> y la mezcla de extractos.....	54
ESQUEMA 6	Determinación de la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos.....	57

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

GRÁFICA 1	Incremento del volumen en el miembro (Δ volumen) después de la inyección de carragenina intra-plantar en la pata trasera de las ratas, del grupo control y los tratados con indometacina.....	63
GRÁFICA 2	Porcentaje de inhibición del edema inducido con carragenina, en comparación a las diferentes dosis de indometacina administrada, a las 5 horas.....	64
GRÁFICA 3	Áreas bajo la curva de las diferentes dosis de indometacina administrada.....	65
GRÁFICA 4	Incremento del volumen en el miembro (Δ volumen) después de la inyección de carragenina intra-plantar en la pata trasera de las ratas, del grupo control y los tratados con el extracto metanólico de las hojas de <i>Alnus acuminata</i>	66
GRÁFICA 5	Porcentaje de inhibición de edema inducido con carragenina, en comparación a las diferentes dosis del extracto metanólico de las hojas de <i>Alnus acuminata</i>	67
GRÁFICA 6	Áreas bajo la curva de las diferentes dosis del extracto metanólico de las hojas de <i>Alnus acuminata</i>	68
GRÁFICA 7	Incremento del volumen en el miembro (Δ volumen) después de la inyección de carragenina intra-plantar en la pata en la pata trasera de las ratas, del grupo control y los tratados con el extracto metanólico de la corteza de <i>Alnus acuminata</i>	69
GRÁFICA 8	Porcentaje de inhibición de edema inducido con carragenina en comparación a las diferentes dosis del extracto metanólico de la corteza de <i>Alnus acuminata</i>	70
GRÁFICA 9	Áreas bajo la curva de las diferentes dosis del extracto metanólico de la corteza de <i>Alnus acuminata</i>	71

GRÁFICA 10	Incremento del volumen en el miembro (Δ volumen) después de la inyección de carragenina intra-plantar en la pata traseras de las ratas, del grupo control y los tratados con el extracto metanólico de <i>Phytolacca americana</i>	72
GRÁFICA 11	Porcentaje de inhibición de edema inducido con carragenina en comparación a las diferentes dosis del extracto metanólico de <i>Phytolacca americana</i>	73
GRÁFICA 12	Áreas bajo la curva de las diferentes dosis del extracto metanólico de <i>Phytolacca americana</i>	74
GRÁFICA 13	Incremento del volumen en el miembro (Δ volumen) después de la administración de carragenina intra-plantar en la pata trasera de las ratas, del grupo control y los tratados con la mezcla de extractos de <i>Phytolacca americana</i> y <i>Alnus acuminata</i>	75
GRÁFICA 14	Porciento de inhibición de edema inducido con carragenina en comparación a las diferentes dosis de la mezcla de extractos metanólicos.....	76
GRÁFICA 15	Áreas bajo la curva de las diferentes dosis de la mezcla de extractos metanólicos.....	77
GRÁFICA 16	Relación de áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos a un mismo nivel de dosis de 30 mg/kg.....	78
GRÁFICA 17	Relación de áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos a un mismo nivel de dosis de 100 mg/kg.....	79
GRÁFICA 18	Comparación de extractos a la dosis de 300 mg/kg reportado como (Δ volumen).....	80
GRÁFICA 19	Relación de áreas bajo la curva de los extractos metanólicos a un mismo nivel de dosis de 300 mg/kg.....	81
GRÁFICA 20	Gráfica de Hill para indometacina.....	82
GRÁFICA 21	Gráfica de Hill para el extracto metanólico de las hojas de <i>Alnus acuminata</i>	83

GRÁFICA 22	Gráfica de Hill del extracto metanólico de la corteza de <i>Alnus acuminata</i>	83
GRÁFICA 23	Gráfica de Hill del extracto metanólico de <i>Phytolacca americana</i>	84
GRÁFICA 24	Gráfica de Hill de la mezcla de extractos metanólicos.....	84
GRÁFICA 25	Curva Dosis-Respuesta Gradual para indometacina.....	86
GRÁFICA 26	Curva Dosis-Respuesta Gradual para el extracto metanólico de <i>Alnus acuminata</i> (hojas).....	86
GRÁFICA 27	Curva Dosis-Respuesta Gradual para el extracto metanólico de <i>Alnus acuminata</i> (corteza).....	87
GRÁFICA 28.	Curva Dosis-Respuesta Gradual para el extracto metanólico de <i>Phytolacca americana</i>	87
GRÁFICA 29.	Curva Dosis-Respuesta Gradual para la mezcla de extractos metanólicos.....	88
GRÁFICA 30.	Curva Dosis-Respuesta Gradual para los extractos metanólicos de <i>Alnus acuminata</i> (corteza), <i>Alnus acuminata</i> (hojas), <i>Phytolacca americana</i> y la mezcla de extractos.....	89

RESUMEN.

Se realizó la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos crudos de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata* Subsp *arguta*. (hojas y corteza) y una mezcla de ambas plantas, mediante el modelo de edema inducido por carragenina en rata Wistar, se utilizó indometacina como fármaco antiinflamatorio de referencia, los extractos metanólicos obtenidos por maceración presentaron actividad antiinflamatoria, prácticamente igual en forma individual y en la mezcla donde se observó que el extracto de *Phytolacca americana* marca la actividad antiinflamatoria en la mezcla de extractos. También se realizó el estudio de toxicidad aguda, el extracto de *Phytolacca americana* presentó una DL₅₀ con valor de 368.28 mg/kg. En tanto que los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* no provocaron la muerte de los animales hasta la dosis de 5 g/kg i.p.

I. INTRODUCCIÓN.

Dentro de la patología, la inflamación es el proceso más frecuente y extendido de los seres vivos; se encuentra en una u otra de sus formas, en la mayor parte de las enfermedades que aquejan a la humanidad. No sólo su frecuencia, sino también sus consecuencias, tanto en la vida como en la función de múltiples órganos y sistemas, lo que le brinda más importancia (Syntex, 1987). La respuesta inflamatoria se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de reparación, ya que sin la inflamación las infecciones no serían controladas, ni curarían las heridas y los órganos lesionados tendrían úlceras permanentes (Smith y Reinard, 1992). La inflamación destruye, diluye o aísla al agente lesivo y pone en marcha una serie de acontecimientos que, hasta donde es posible, reconstruyen el tejido lesionado.

La inflamación participa principalmente en enfermedades que destruyen el tejido conjuntivo, y no existe órgano, aparato o estructura que no pueda ser alterada a través de del tejido conjuntivo o intersticial. Estas patologías revisten tal complejidad, que hasta la fecha ha sido imposible actuar terapéuticamente en todos sus niveles y estadios y menos aún con efecto específico, ya que en la mayoría de ellas se desconoce su causa, aunque se vislumbren ciertas posibilidades etiopatogénicas (Syntex, 1987).

El impacto causado por la inflamación en la vida del paciente es trascendental, desde la desorganización de sus actividades físicas, profesionales y demás, hasta el desequilibrio psicológico preñado de frustraciones, al sufrir incapacidad parcial o total, temporal o definitiva. A todo ello se le añade el sufrimiento ocasionado por el dolor que acompaña inherentemente al proceso inflamatorio, mismo que puede ser ligero o intenso, localizado o extendido a la mayor parte de las estructuras del cuerpo humano (Smith y Reinard, 1992).

Dentro de la medicina tradicional se han encontrado especies vegetales las cuales han demostrado ser eficaces para este tipo de padecimientos, pero desgraciadamente, no se les da la importancia que debieran, ya que son muy pocos los estudios encaminados a comprobar la efectividad de la actividad biológica que exhiben estas especies vegetales, en

el Sureste de México se ha encontrado que en medicina tradicional se ha utilizado a la *Phytolacca americana* L y *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* como plantas medicinales, ya que son activas para tratamiento de inflamación, por lo que el objetivo de este estudio es demostrar que efectivamente ambas especies vegetales presentan actividad antiinflamatoria, ya que pueden representar una buena alternativa para el tratamiento de este tipo de afecciones que afectan al hombre y ser una fuente potencial de nuevos agentes antiinflamatorios.

II. FUNDAMENTO TEÓRICO.

2.1 GENERALIDADES SOBRE EL PROCESO INFLAMATORIO.

La inflamación es la reacción del tejido vivo vascularizado a una agresión local, que conduce al cúmulo de líquido y células sanguíneas. Es un mecanismo que está presente en las formas biológicas superiores, debido a su complejidad. La inflamación es una respuesta patológica/fisiológica fundamental diseñada para eliminar los estímulos nocivos introducidos en el huésped, que incluyen agentes químicos (toxinas y sustancias cáusticas), patógenos y endógenos (como aquellos producidos por el sistema inmune), así como para reparar las lesiones, por radiaciones y quemaduras, entre otros. La respuesta inflamatoria se encuentra estrechamente relacionada con el proceso de reparación de tejidos (Clark y Johnson, 1995).

Sin embargo, la inflamación y consecuente reparación pueden ser perjudiciales ya que comprende una serie de respuestas como la fagocitosis del agente lesivo, la captura del agente extraño por células especializadas y la neutralización del agente nocivo mediante la hipertrofia de la célula. Los signos clínicos que caracterizan a la inflamación son calor, enrojecimiento, hinchazón, dolor y pérdida de la función (Robbins *et al.*, 1990).

La inflamación se divide en aguda y crónica en términos de su duración, y por lo general conduce – al igual que el dolor – a una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada (Robbins *et al.*, 1990; Smith y Reinard, 1992).

La inflamación aguda tiene un periodo de duración relativamente corto, que puede ser desde unos minutos, hasta varias horas o días y sus principales características son el exudado de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y la migración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos. Por otra parte, la inflamación crónica es menos uniforme y obviamente, de mayor duración. Se asocia histológicamente a la presencia de linfocitos y macrófagos y a la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo.

Muchas de las respuestas celulares de la inflamación están mediadas por factores químicos derivados de la acción del estímulo inflamatorio sobre el plasma o las células que actúan en conjunto o secuencialmente (Smith y Reinard, 1992).

El campo del proceso inflamatorio es el tejido conectivo vascularizado, incluyendo el plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los componentes celulares y extracelulares del tejido conectivo. Las células circulantes que tienen importancia en la inflamación son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son las células cebadas, que están en íntima relación con los vasos sanguíneos, los fibroblastos, linfocitos y macrófagos del mismo (Clark y Johnson, 1995).

2.2 INFLAMACIÓN AGUDA.

El edema es una reacción inmediata o transitoria en la inflamación aguda que suele comenzar inmediatamente después del estímulo lesivo, alcanza un máximo de 5-10 minutos después y puede desaparecer en 15-30 minutos, si no existe otro estímulo o si no se desencadenan otros mecanismos. Esta reacción se caracteriza por: 1) cambios de flujo y calibre vascular; 2) cambios de la permeabilidad vascular y 3) exudación leucocitaria. La respuesta inflamatoria es mediada inicialmente por la histamina y posteriormente por una gran variedad de mediadores químicos, que son activados en fases consecutivas (Figura 1) (Robbins *et al.*, 1990; Smith y Reinard, 1992).

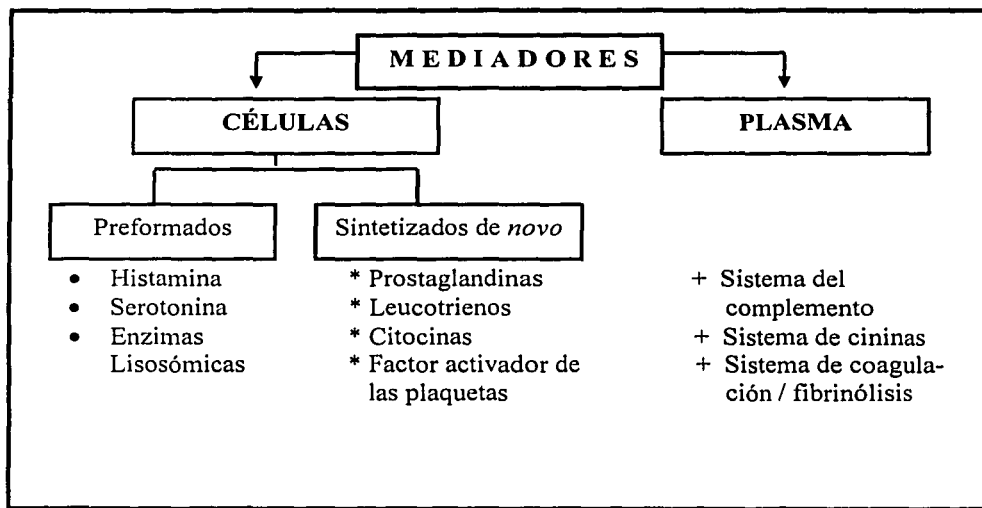


Figura 1. Mediadores químicos en la inflamación (Tomado de Robbins *et al.*, 1990).

La histamina y la serotonina (5-hidroxitriptamina) son los mediadores químicos de la fase activa inmediata al incremento de la permeabilidad. En el hombre y en ciertos roedores, la histamina y la serotonina son producidas y almacenadas en los gránulos de las células cebadas, basófilos y plaquetas. Estas aminas producen vasodilatación e incremento de la permeabilidad vascular creando el edema, especialmente en las vénulas (Crunkhorn *et al.*, 1971).

Muchos agentes producen la liberación de estas aminas a partir de las células cebadas, los agentes físicos, las reacciones inmunes, los fragmentos del complemento C3a y C5a (también llamadas anafilotoxinas) y los factores liberadores de la histamina, presentes en neutrófilos, monocitos y plaquetas así como la interleucina-1. La concentración de histamina disminuye luego de los primeros 60 minutos del estímulo y los antihistamínicos no tienen efecto sobre la permeabilidad vascular en las fases retardadas (Smith y Reinard, 1992).

Por otra parte, las proteasas plasmáticas que incluyen tres sistemas activos e interrelacionados entre sí, el sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación o fibrinólisis. Al igual que las aminas anteriormente mencionadas, poseen actividades vasoactiva y quimiotáctica que median el incremento en la permeabilidad vascular, el quimiotactismo sobre neutrófilos, eosinófilos y monocitos, la opsonización ante la fagocitosis y la lisis de los microorganismos. La anafilatoxinas del complemento C3a y C5a, además de incrementar la permeabilidad vascular y la liberación de histamina de las células cebadas y plaquetas, poseen otros mecanismos que incrementan la respuesta inflamatoria. C5a también activa la vía de la lipooxigenasa (LO) para el metabolismo del ácido araquidónico (AA) en los neutrófilos y macrófagos (Robbins *et al.*, 1990; Smith y Reinard, 1992).

De igual manera, el sistema de las cininas da lugar a la formación de un nonapéptido vasoactivo, la bradiginina, un potente agente que incrementa la permeabilidad vascular y que no posee actividad quimiotáctica. La bradiginina se forma también a partir de la calicreína y el cininógeno. La bradiginina tiene una acción corta, ya que se inactiva por la enzima cininasa. La calicreína tiene actividad quimiotáctica y produce agregación de los neutrófilos *in vitro* (Syntex, 1987).

En lo referente a los derivados oxigenados del ácido araquidónico (AA), los más importantes son las prostaglandinas y tromboxanos, considerados como autacoides u hormonas locales de acción corta, que se forman rápidamente, ejercen su efecto localmente y se degradan espontáneamente o son destruidas por la acción de enzimas. El AA es un ácido graso poliinsaturado de 20 carbonos (ácido 5, 8,11,14-icosatetranoico), que deriva directamente de la dieta o de la conversión del ácido graso linoleico. Existe de forma esterificada en los fosfolípidos de la membrana, particularmente en el carbono 2 de la fosfatidilcolina y fosfatidilinositol. Para que el AA sea utilizado por la célula para formar eicosanoides, tiene que ser antes liberado de los fosfolípidos, mediante activación de las fosfolipasas celulares por estímulos mecánicos, físicos y químicos, o por otros mediadores (v. gr. C5a). El AA es metabolizado principalmente por dos vías:

La vía lipooxigenasa (LO) y la vía de la ciclooxigenasa (COX), siendo los productos formados de estas reacciones leucotrienos y prostaglandinas¹¹ y tromboxanos, respectivamente (Dawson, 1987)

La ciclooxigenasa (COX) transforma rápidamente el AA en el endoperóxido prostaglandina PGG₂ que, a su vez, es convertido enzimáticamente en PGH₂. en esta conversión se genera un radical libre de oxígeno y entonces. La PGH₂ es convertida enzimáticamente en:

- a) Tromboxano A₂ (TXA₂), que se encuentra en las plaquetas y otras células, es un potente agregante plaquetario de vida media corta (segundos) y potente vasoconstrictor.
- b) Prostaciclina (PGI₂), que se encuentra predominantemente en la pared vascular y es un potente inhibidor de la agregación plaquetaria y vasodilatador.
- c) Prostaglandinas (siendo las más estables: PGE₂, PGF_{2α} y PGD₂) que se encuentran en muchos tejidos y ejercen diversas acciones sobre el tono y la permeabilidad vascular (Figura 2).

¹ Las PG están compuestas por un ácido graso básico con 20 carbonos que contiene un anillo ciclopentano, el denominado ácido prostanoico hipotético. Los carbonos se numeran del 1 al 20 a partir del carboxilo hacia el grupo metilo terminal. Las designaciones PGE₁, PGE₂ y PGE₃ se refieren sólo al número de uniones dobles en las cadenas laterales alifáticas. La clase PGE₂ es el grupo natural más abundante. Para la PG₁ el precursor es el ácido 8,11,14-eicosatrienoico (ácido dihomo-γ-linolénico) y para la PG₂ el precursor es el ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico (ácido araquidónico). La PG₃ se forma a partir del ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (Dawson, 1987).

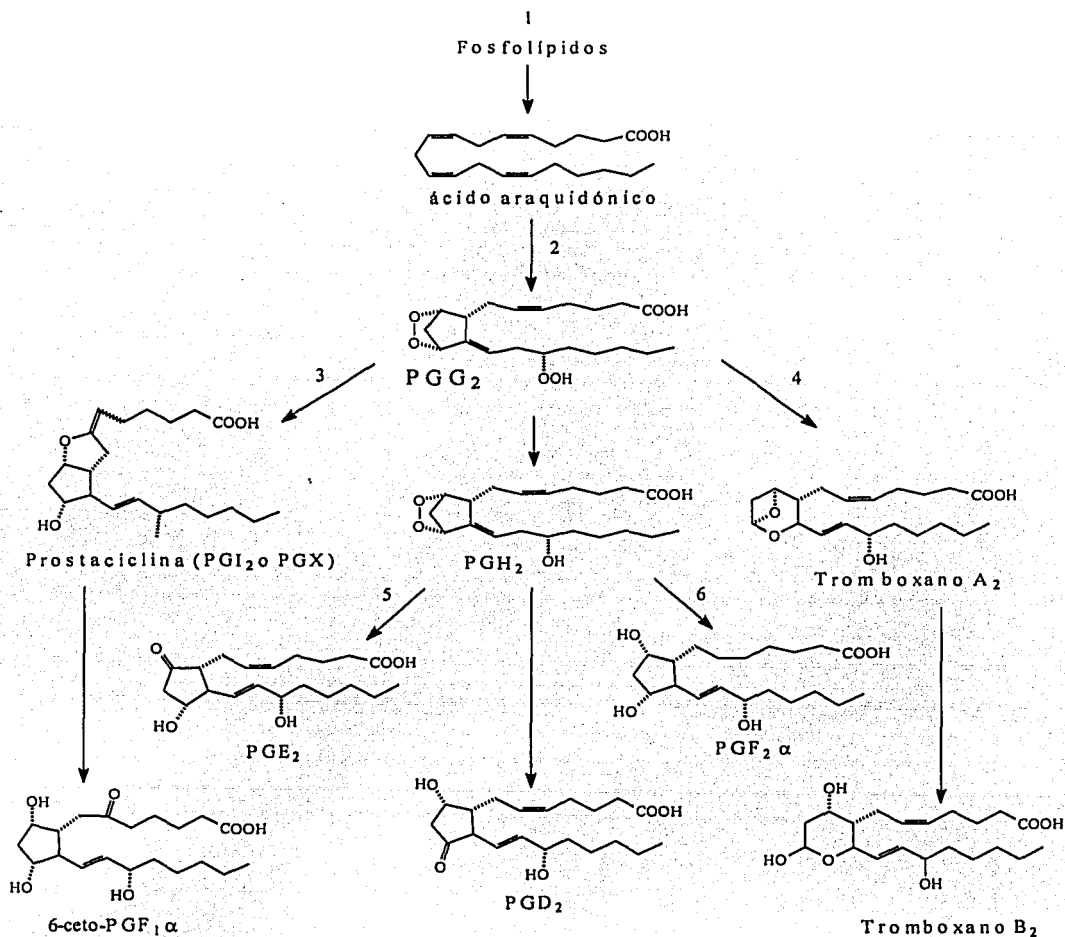


Figura 2. Conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas e intermediarios. Las enzimas de cada paso se designan como: 1, fosfolipasa A₂; 2, cicloxigenasa; 3, prostaciclín sintasa; 4, tromboxano cintasa; 5, endoperóxido isomerasa; 6 endoperóxido reductasa (Dawson, 1987).

Por su parte la vía de la lipooxigenasa (LO) implica la conversión de AA en derivados hidroperóxidos (ácido hidroperoxieicosatetranoico – HPETE- en las plaquetas y 5-HPETE y 15-HPETE en los leucocitos), por la acción de la LO en los ácidos grasos. El 5-HPETE puede sufrir peroxidación a ácido hidroxieicosatetranoico (HETE), un potente estímulo quimiotáctico para los neutrófilos. 5-HPETE también da lugar a los leucotrienos. El leucotrieno A₄ (LTA₄) es luego convertido en leucotrieno B₄ (LTB₄) o por la adición de un residuo de glutatión en leucotrieno E₄ (LTE₄). LTB₄ es un potente agente quimiotáctico que estimula la agregación de los leucocitos al endotelio vascular mientras que LTC₄, LTD₄ y LTE₄ producen vasoconstricción, bronco espasmo y aumento de la permeabilidad vascular (Figura 3 y Tabla 1). De igual manera los neutrófilos también producen metabolitos trihidróxidos del AA, denominados Lipoxinas (Robbins *et al.*, 1990).

Otros agentes responsables de la inflamación son los constituyentes microsómicos y los radicales libres de oxígeno (RLO), liberados a partir de neutrófilos, monocitos y macrófagos. Estos agentes aumentan la permeabilidad, directamente o mediante la liberación de histamina de las células cebadas, son quimiotácticas para los monocitos e inhiben el movimiento de los neutrófilos y eosinófilos. Los constituyentes lisosómicos tienen, por lo tanto, numerosos efectos; si no es controlada, la infiltración leucocitaria inicial puede potenciar aun más el aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis y lesión tisular. Por su parte la influencia de los RLO, en una reacción inflamatoria, depende del equilibrio entre la producción e inactivación de estos metabolitos por las diferentes células y tejidos (Syntex, 1987; Smith y Reinard, 1992).

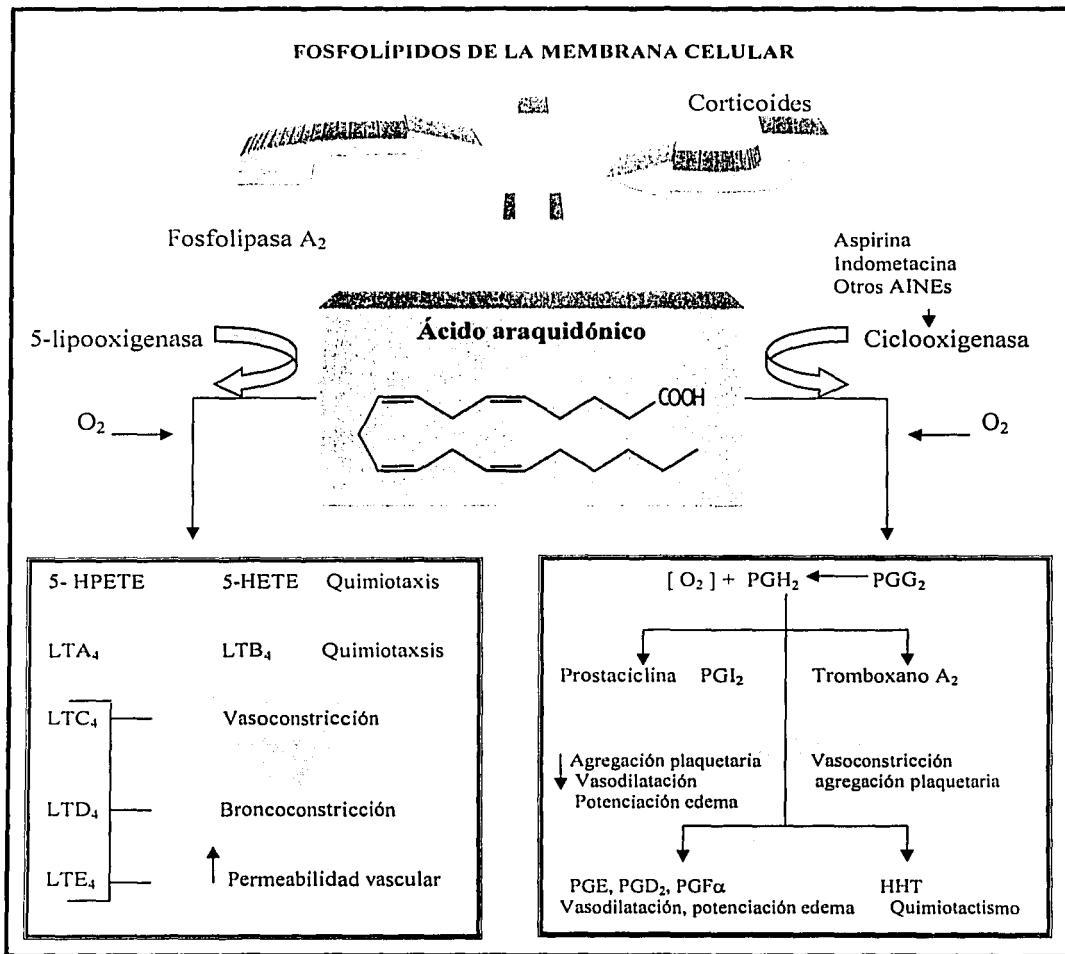


Figura 3. Metabolitos del ácido araquidónico en la inflamación (Tomado de Robbins *et al.*, 1990).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Acción de los metabolitos del ácido araquidónico.

ACCIÓN	METABOLITO
Vasoconstricción	Tromboxano A ₂ , HPETE, endoperóxidos leucotrienos, C ₄ , D ₄ , E ₄ .
Vasodilatación	PGI ₂ , PGE, PGE ₂ , PGD.
Aumento de la permeabilidad Vascular	Leucotrienos, C ₄ , D ₄ , E ₄ .
Quimiotaxis	Leucotrienos B ₄ , HHt, HPETE, HETE, D ₄ , E ₄ .

(Tomado de Robbins *et al.*, 1990).

2.3 INFLAMACIÓN CRÓNICA.

La respuesta inflamatoria aguda puede evolucionar hacia una resolución completa (recuperación normal de la zona inflamada), a una curación por cicatrización (con subsiguiente destrucción tisular), y formación de abscesos (en infecciones por agentes pirógenos) o en casos más severos, progresar en dirección a una inflamación crónica (Figura 4). De esta manera, la inflamación crónica se caracteriza por la destrucción del tejido y por una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada, de mayor duración que en la inflamación aguda, y puede generarse por:

1. Persistencia del estímulo lesivo o por alguna interferencia en la curación normal. Se caracteriza por destrucción tisular y por una pérdida de la funcionalidad de la parte afectada, de mayor duración que en la inflamación aguda.
2. Brotes repetidos de inflamación aguda (con períodos de curación entre los brotes), como en los casos de pielonefritis o colecistitis.

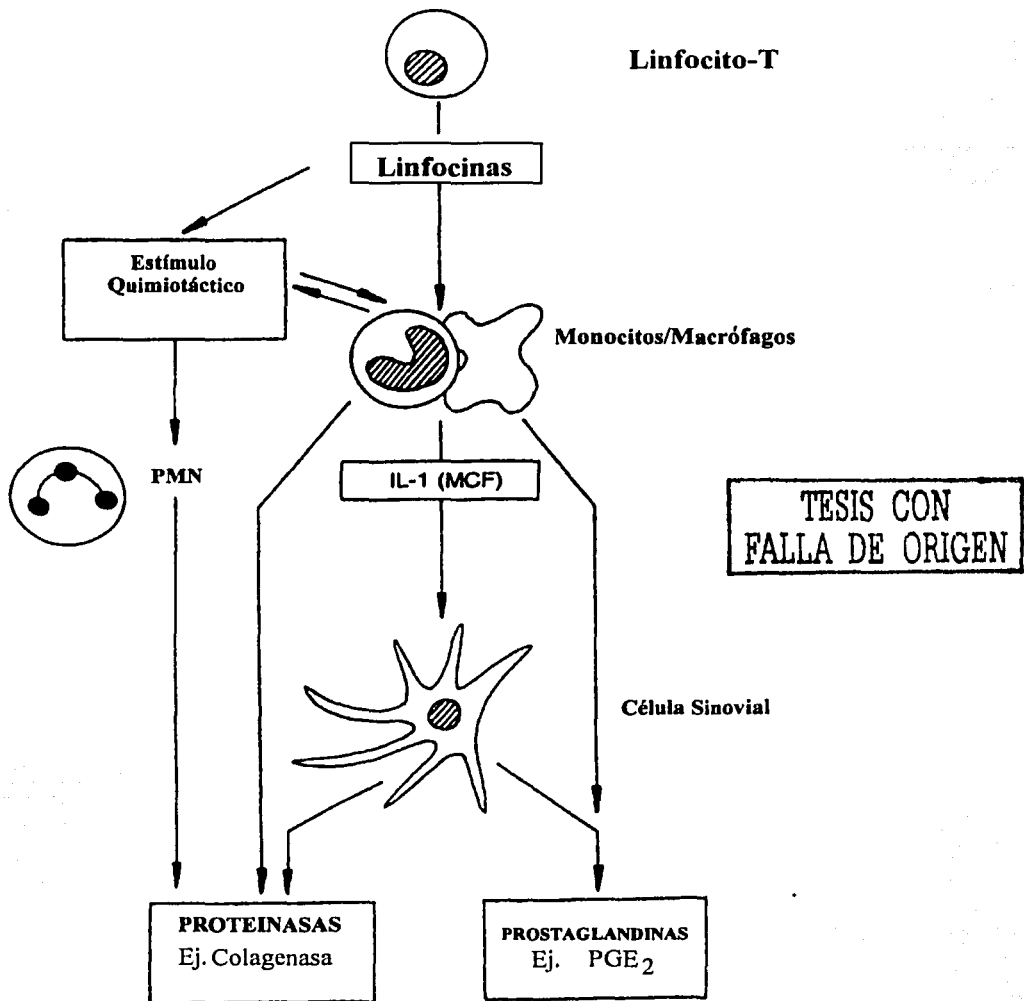


Figura 4. Esquema de cooperación celular cuando los linfocitos-T, macrófagos y células sinoviales intervienen en la inflamación crónica (Williamson *et al.*, 1996).

III. MODELOS EXPERIMENTALES DE INFLAMACIÓN.

Los modelos inflamatorios en animales de laboratorio, permiten valorar la potencia y la efectividad antiinflamatoria de los fármacos, sustancias de origen vegetal y agentes antiartríticos de manera cuantitativa. En los animales de laboratorio ha sido posible diseñar un importante número de modelos experimentales que representan con bastante fidelidad, algunos procesos inflamatorios (Williamson *et al.*, 1996). En general estos modelos son útiles para valorar la eficacia de los fármacos antiinflamatorios, ya que las sustancias proinflamatorias que se utilizan permiten, gracias a su estandarización, predecir con cierta seguridad la actividad terapéutica de las sustancias a prueba (Tabla 2). En estos estudios se utilizan agentes físicos, químicos, inmunogénicos, microbiológicos, entre otros, para aplicarlos en las articulaciones o en las extremidades (cojinete plantar) de conejos, ratas cobayos y otros animales de laboratorio para producir alteraciones inflamatorias que en forma similar, se presentan en los procesos de artritis, osteoartritis y artritis reumatoide (Syntex, 1987).

Tabla 2. Modelos farmacológicos para evaluar inflamación en animales de experimentación (Dawson, 1987).

Inductores de inflamación.	Animal de Prueba	Tipo de inflamación
Agentes Físicos.		
- Dislocación	Conejo	Artrosis
Agentes químicos.		
- Carragenina	Rata	Artritis reumatoide
- Sulfas	Rata	Artritis periartritis
- Colesterol	Conejo	Artritis
- Caolina, dextrán y formalina	Rata	Artritis reumatoide
- TPA (Esteres de Phorbol)	Ratón	Dermatitis
Agentes infecciosos.		
- Estreptobacilos	Ratón	Artritis reumatoide
- Diploestreptococos	Rata	Artritis reumatoide
- Herpes simple	Conejo	Artritis
Agentes inmunógenos.		
- Complejos inmunes	Cobayo	Artritis
- Adyuvantes (Freud)	Rata	Artritis reumatoide
- Albúmina y Levadura	Rata	Artritis reumatoide
Otros.		
- Papaína	Conejo	Artritis
- Enzimas Hidrolíticas	Conejo	Artritis reumatoide

IV. MODELO DE INFLAMACIÓN INDUCIDO POR CARRAGENINA EN RATAS.

El modelo de carragenina, es uno de los más utilizados para desarrollar edema en modelos animales, porque presenta las siguientes ventajas (Syntex, 1987):

- 1) La sustancia agresora (carragenina) es estable y las cantidades necesarias para producir una artritis reumatoide similar a la humana, han sido estandarizadas.

- 2) Puede emplearse como un modelo agudo, subagudo o crónico de inflamación.
- 3) La evolución de la inflamación, es similar a la experimentada en el hombre (Zhang *et al.*, 1997).
- 4) Es altamente reproducible y presenta baja variabilidad inter-sujetos.
- 5) Es un modelo que permite una valoración cuantitativa de la inflamación producida, de esta manera, las determinaciones no son subjetivas o indirectas (Di Rosa *et al.*, 1968).
- 6) El efecto antiinflamatorio que se produce es aproximadamente de la misma magnitud y en relación con la dosis administrada.

La carragenina es una mezcla de polisacáridos sulfatados extraídos de las algas marinas rojas *Rhodophyceae*. Las principales fuentes son *Chondrus crispus* L, *Gigartina stellata* y *G. mammilosa*, entre otras. Las familias estructurales λ (forma no gelatinizante), ι y κ (formas gelatinizantes) se identifican en base a la posición del grupo sulfato y a la presencia o ausencia de galactosa anhidra (Figura 5). Las formas más usadas para inducir edema en modelos experimentales, son λ y κ debido a que la estructura terciaria de las mismas, les confiere propiedades gelatinizantes, siendo mayor esta habilidad para κ que para λ , la forma κ consiste en porciones ι , μ , ν y se describe con la repetición de la unidad 4-sulfato- β -D-galactopiranosil(1-4)- α -D eslabonada a (1-3); mientras que la forma λ presenta fracciones λ y ϵ , caracterizadas por una repetición (1-3) unidas al disacárido 2-sulfato- β -D-galactopiranosil (1-4)- α -D-galactosa (Miller, 1992).

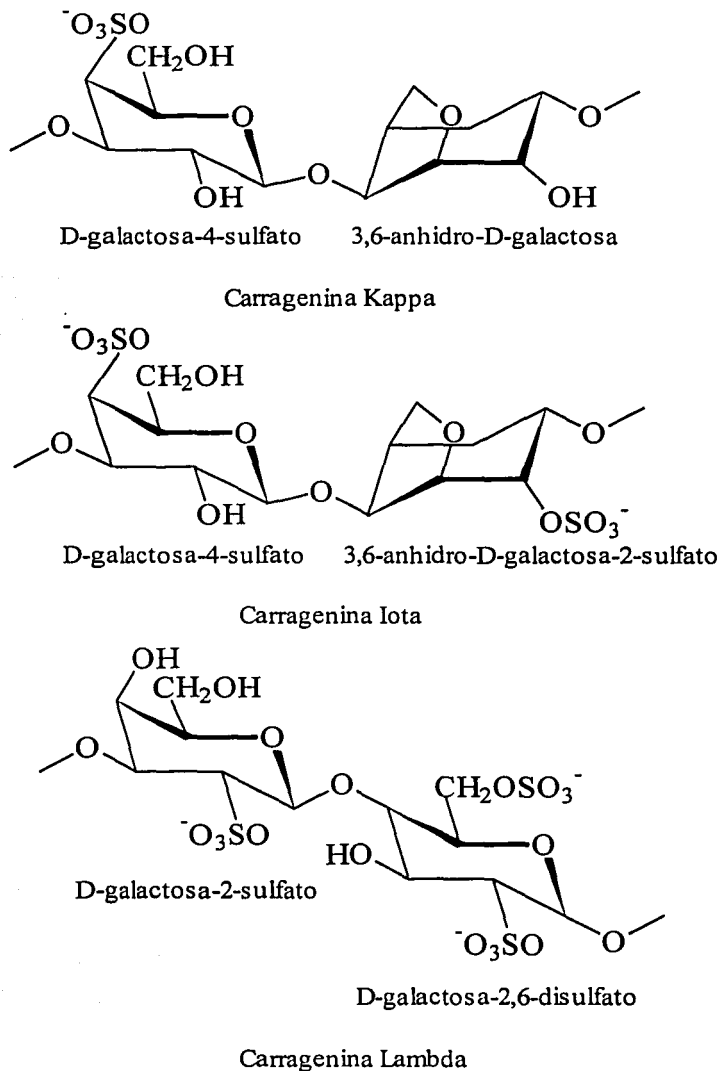


Figura 5. Estructuras de los principales tipos de carragenina. Obsérvese la diferencia en la cantidad y la posición de los grupos sulfatos.

La carragenina posee la habilidad de formar geles termoreversibles y es soluble en disolventes polares, la forma κ es soluble en solución concentrada y caliente de glucosa, en agua a $\sim 60^\circ$ C y en solución salina diluida fría; es insoluble en soluciones salinas concentradas y solución alcohólica al 35 %, la estabilidad óptima sucede a pH ~ 9.0 y el grado de sulfatación de esta forma va de 32-39%. Se usa como agente gelatinizante, emulsificante estabilizador y viscosante, así como para inducir edema en animales de laboratorio (Miller, 1992).

La dosis para producir el efecto inflamatorio agudo de carragenina varía entre 0.05 mL y 0.1 mL de una suspensión de carragenina en solución salina al 1 %, aunque se obtiene variabilidad de un experimento a otro en función de la dosis (2 % a 3 % para inflamación crónica) y al tipo de carragenina empleado (ya sea λ o κ), casi todos los autores coinciden que la mejor vía de administración es la subcutánea en el cojinete plantar de la pata trasera de la rata. El efecto máximo se alcanza entre las 3-5 horas posteriores a la administración de carragenina y puede permanecer por varias horas (Mañes *et al.*, 1999).

La cinética de la carragenina puede caracterizarse por una curva biexponencial donde se pueden distinguir dos procesos separados: una primera fase en la cual el incremento del volumen en el miembro lesionado alcanza un máximo y puede describirse por una cinética de primer orden y una segunda fase de la disminución de la inflamación alcanza los niveles basales y se caracteriza por una cinética de segundo orden (Van Arman *et al.*, 1965).

El modelo de carragenina se perfila como modelo representativo de trastornos inflamatorios sean estos subagudos, agudos y crónicos: ya que el edema producido por otros agentes flogistas como levaduras, formalina, caolína, dextran y albúmina de huevo, entre otros, no es específicamente influenciados por agentes antiinflamatorios (Winter *et al.*, 1962).

El mecanismo de producción de edema por carragenina ha sido ampliamente estudiado aunque los resultados son controversiales. Algunos investigadores señalan que el edema es causado en una primera etapa por la liberación de histamina, serotonina y elementos del complemento, y en una segunda fase (de 2 a 3 horas posteriores al estímulo lesivo) por la producción de prostaglandinas, bradicinina y 5-hidroxitriptamina (5-HT), así como la presencia de leucocitos. En su conjunto, todos estos agentes son responsables del incremento en la permeabilidad vascular y del daño causado al tejido conectivo (Winter *et al.*, 1962; Crukhorn *et al.*, 1971).

Considerando que las prostaglandinas potencian el edema producido por carragenina, se ha postulado que el mecanismo básico (más no el único) de acción de los AINE' s es la inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas (PGs), por ello son utilizados como fármacos de referencia, para modelos de inflamación por carragenina (Crukhorn *et al.*, 1971).

De acuerdo a lo encontrado por Van Arman *et al.*, (1965); los efectos inhibitorios de la inducción inflamatoria producida por carragenina, depende en gran medida de la activación de proteasas tisulares de tipo tripsina, que se encuentran presentes en los mastocitos. Aunque no exista evidencia de que el efecto inflamatorio de la carragenina sea mediado por los mastocitos *per se*, los procesos proteolíticos tipo tripsina son puestos en marcha debido a la presencia de carragenina. Más aún, el efecto inflamatorio de la carragenina, puede bloquearse por los inhibidores de tripsina de soya (Van Arman *et al.*, 1965), aprotinina, inhibidor de proteasas y el iniprol. Estos resultados sugieren que los procesos proteolíticos de carragenina, son responsables de la formación de bradicinina y otros péptidos similares que intervienen en la primera etapa del proceso inflamatorio inducido por carragenina (Di Rosa *et al.*, 1968).

El edema producido por carragenina, puede ser suprimido por pretratamiento con celulosa sulfatada, un agente que disminuye o agota el cininógeno. La habilidad de la carragenina para activar el sistema de formación de cininas, parece mediar los efectos inflamatorios e hipotensores que ésta presenta (que tal parece, que es una propiedad común

de varios polisacáridos sulfatados). La relación entre la intensidad del edema producido, y las concentraciones plasmáticas de cininógeno, muestra una correlación directa entre el transcurso del tiempo del agotamiento del cininógeno y la reducción del edema, con la consecuente formación de cininas, y activación local del complemento en la pata trasera de la rata, no conduce a una disminución importante, en las concentraciones séricas del complemento. El ácido maleopimárico, inhibidor de la activación del complemento puede inhibir el edema producido por carragenina (Crukhorn *et al.*, 1971).

Al igual que las cininas, el mediador 5-HT, contribuye significativamente a la formación de edema producido por carragenina, ya que la metisergida (un inhibidor de 5-HT) disminuye la intensidad de edema producido. Mientras que la histamina (inhibida por mepiramina) desempeña un papel menor en el proceso, durante las tres primeras horas. Los efectos directos en la inflamación producida por carragenina, de los mediadores antes mencionados (cininas, complemento y en menor grado la histamina y serotonina), pierden importancia luego de las 3-4 horas de administrado el agente lesivo (carragenina), cuando la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMNs) al tejido ha comenzado. Esta migración leucocitaria que caracteriza a la segunda fase del edema producido por carragenina, esta es una de las diferencias más importantes entre el edema causado por carragenina y el inducido por dextrán. Es claro que la presencia de estas células liberando enzimas proteolíticas que a su vez inician la liberación local de prostaglandinas, mismas que se encargan de mantener el incremento en la permeabilidad vascular. La extravasación de fluido y proteínas a partir de la microvasculatura local y la acumulación de PMNs en el sitio causa daño al tejido conectivo con la consecuente liberación o formación de mediadores adicionales (Crukhorn *et al.*, 1971).

Uno de estos mediadores es el óxido nítrico (NO), que causa vasodilatación por incremento del flujo sanguíneo microvascular al sitio de la inflamación. Conduciendo a la extravasación plasmática y a la formación del edema. El óxido nítrico es liberado a partir de las células endoteliales vasculares y los macrófagos; en respuesta al estímulo de sustancias como histamina, bradicinina, 5-HT, lipopolisacáridos y citocinas. Al igual que las PGs; el NO se produce en la segunda etapa del edema y su producción puede

incrementarse mediante la administración de mediadores del proceso inflamatorio como leucotrienos y los anteriormente mencionados; dependiendo del curso temporal de la inflamación, el NO puede ser liberado a partir de componentes tisulares o generando por inducción de sintetasa de óxido nítrico. Este mediador es en gran parte responsable de la inflamación mediada por carragenina, puesto que sustancias antagonistas al mismo (inhibidores de sintetasa de NO y dexametasona), son capaces de revertir casi por completo el edema causado por carragenina. Adicionalmente, L-arginina es sustrato para la formación de NO y es otro de los mediadores en la inflamación inducida por carragenina (Atsufumi *et al.*, 1992).

Otros mediadores involucrados en el mantenimiento del edema causado por carragenina (segunda fase), son los radicales libres de oxígeno. Estas moléculas generadas enzimáticamente o liberadas a partir de macrófagos activados y células endoteliales conducen también a incrementos en la permeabilidad vascular, infiltración celular y daño tisular, como otros mediadores de la inflamación. De hecho los resultados para diferenciar los efectos antiinflamatorios *per se*, de los efectos antiinflamatorios mediados por actividad antioxidante (superóxido dismutasa, dexametasona y el nuevo antiinflamatorio experimental BW755C) no son muy claros (Boughton y Smith, 1993).

En este sentido, Seibert *et al.*, (1994) encontraron que son por lo menos dos las isoformas de la enzima ciclooxigenasa (COX) las responsables de la síntesis de prostaglandinas. Mientras que COX-1 es constitutivamente expresada en muchos tejidos y es la encargada de mantener diversas funciones fisiológicas, la COX-2 se expresa de forma local ante el estímulo proinflamatorio de ciertos agentes lesivos, como carragenina. Los mismos autores describieron que el tiempo necesario para que se de la máxima expresión de COX-2 es semejante al requerido para alcanzar el máximo efecto inducido por carragenina, es decir, a las tres horas posteriores al estímulo lesivo (Seibert *et al.*, 1994). Así, las PG's formadas por COX-2 (PGE₂) parecen ser de suma importancia en el mantenimiento de la respuesta hiperalgésica e inflamatoria en el sitio de acción (Zhang *et al.*, 1997).

V. GÉNERO *Phytolacca*.

5.1 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Phytolacca*. (Phytolaccaceae).

Árboles, arbustos, sufrútices, hierbas y algunas veces lianas, anuales o perennes, hermafroditas, monoicas o dioicas. Hojas alternas, o algunas veces subpuestas, simples, enteras, pecioladas, exestipuladas o algunas veces con estípulas diminutas. Inflorescencias terminales, opositifoliales o axilares, racemosas o cimosas, rara vez paniculiformes, con una bráctea basal sobre el pedicelo; flores actinomorfas o rara vez zigomorfas; cáliz con 4-5(-10) sépalos, persistentes o raramente deciduos, acrescentes y menudo petaloides; corola ausente o con 4-5 tépalos; estambres en 1 ó 2 series, generalmente alternando con los sépalos, frecuentemente insertos sobre un disco hipogíneo, los filamentos libres o connados en la base, filiformes o subulados, las anteras introrsas, biloculares, basifijas o dorsifijas, deshiscentes longitudinalmente; gineceo súpero o parcialmente ínfero, de uno a muchos carpelos, separados o unidos, los óvulos axilares o basales, campilótrpos. Fruto una baya lobulada, un aquenio en ocasiones armado o una cápsula; semillas erectas, subglobosas, lenticulares o reniformes, rara vez alargadas, la testa glabra o pubescente, lisa o rugosa, algunas veces arilada: embrión anular, semianular o recto, el perispermo duro, almidonoso o farináceo, los cotiledones incumbentes, laminares, plegado-enrollados o lineares y semicilíndricos (Cano y Marroquín, 1994).

5.1.1 *Phytolacca americana* L.

Hierba con frecuencia robusta, glabra o poco pubescente, hasta 2 metros de alto, tallos ramificados, huecos, angulosos; pecíolos bien manifiestos, de 1 a 6 cm de largo hojas elípticas u ovado-elípticas, de 7 a 20 cm de largo por 2.5 a 9.5 cm de ancho, ápice agudo, acuminado y a veces mucronado, de base atenuada a acuminada; racimos pedunculados, numerosos, axilares y terminales, de 8 a 15 cm de largo, flores subsésiles o sobre pedicelos de 2 a 5 mm de largo brácteas lobuladas, pétalos verdosos, blancos o rojizos, elípticos a ovados, de 2.5 a 3.2 mm de largo por 1.5 a 3 mm de ancho, persistentes, estambres 8 a 20, ovario subgloboso, con 6 a 10 carpelos, estilos encorvados fruto carnoso, globulado-

aplanado, de 6 a 8 mm de diámetro, verde cuando tierno, pasando a rojo oscuro y luego negro en la madurez (Figura 6); Semilla negra, brillante, de unos 2.5 mm de largo (Keville, 1995).



Figura 6. *Phytolacca americana* (hojas, racimos y flores).

Recibe el nombre de "Namole", "Mazorquilla", "Carricillo", "Jabonera" y "Telcocox" (en Yucatán y Chiapas). Maleza ampliamente distribuida, en diversos hábitat pero en condiciones lluviosas. Crece en altitudes de 2250 a 3000 metros o más, predomina en el sur de los Estados Unidos y en el Sureste de México a Sudamérica. Naturalizada en algunas partes de Europa, posee propiedades medicinales. Aparentemente es una especie bastante variable ya que algunos autores subdividen en 2 o más, mientras que otros consideran que *Phytolacca americana* L es sinónimo de *Phytolacca icosandra* L (Rzedowski, 1979).

5.1.2 *Phytolacca dioica* L.

Hierbas robustas perennes, arbustos o árboles; tallos erguidos o algo endebles; hojas pecioladas o sésiles, inflorescencia generalmente racimosa, terminal; flores hermafroditas o unisexuales, pedicelos con brácteas en la base y a veces también en la parte superior; tépalos 5; estambres 6 a 33, mono o bisexuados, anteras dorsifijas; ovario subgloboso, de 5 a 16 carpelos libres o unidos; fruto una baya aplanado-globular; semilla 1 en cada lóculo, placentación axilar. Unas 35 especies de regiones tropicales y subtropicales, principalmente de América. *Phytolacca dioica* L. Es una planta originaria de Sudamérica, en México se cultiva como planta de ornato (Rzedowski, 1979).

5.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GENERO *Phytolacca*.

El género *Phytolacca* sp. posee una variedad de compuestos químicos muy diversos, entre los compuestos que más destacan por sus propiedades farmacológicas o toxicológicas son: Saponinas triterpénicas, diferentes sustancias mitogénicas del tipo cisteína, ricas en glycoproteínas, lectinas conocidas en el idioma ingles como: pokeweed mitogens (PWM), proteínas con acción antiviral conocidas en el idioma inglés como: pokeweed antiviral protein (PAP), la cual posee un peso de 29 kDa (kiloDaltones). Los metabolitos secundarios aislados dentro del género *Phytolacca* son representados en la Tabla 3 por las siguientes estructuras químicas.

TABLA 3. Metabolitos secundarios mayoritarios encontrados en el género *Phytolacca*.

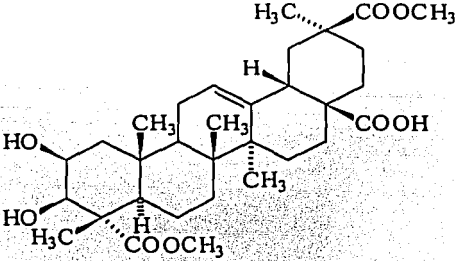
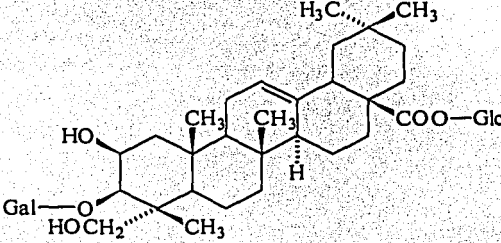
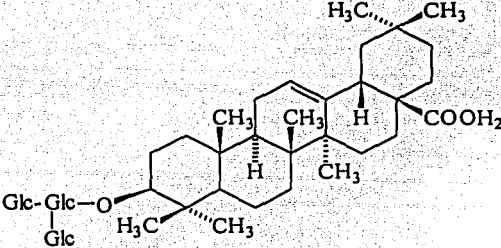
Nombre Químico	Fórmula	Referencia
Acinospesigenina		Spengel <i>et al.</i> , 1990.
Bayogenina		Perret <i>et al.</i> , 1999.
Oleanoglycotoxina-A		Perret <i>et al.</i> , 1999. Parkhurst <i>et al.</i> , 1973.

TABLA 3. Continuación.

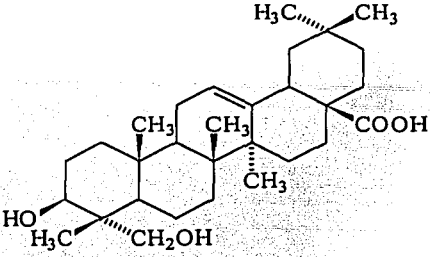
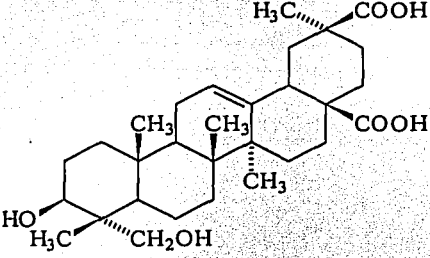
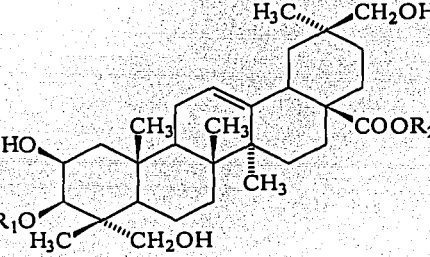
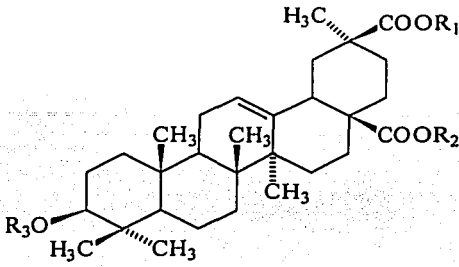
Nombre Químico	Fórmula	Referencia
Hederagenina		Spengel <i>et al.</i> , 1995.
Esculentósido H		Yang-Hua <i>et al.</i> , 1989.
Ácido esculantogénico (1) Esculantísida J (2) Esculetósidos (1) R ₁ = H, R ₂ = H (2) R ₁ = xyl-glc, R ₂ = glc		Yang-Hua <i>et al.</i> , 1990, 1991 y 1992.

TABLA 3. Continuación.

Nombre Químico	Fórmula	Referencia
<p>Ácido 3-O-β-D-glucopiranosilserjánico</p> <p>R₁ = CH₃</p> <p>R₂ = H</p> <p>R₃ = Glc</p>		<p>Treyvaud <i>et al.</i>, 2000.</p>

5.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DE *Phytolacca americana*.

Phytolacca americana contiene cerca de ocho saponinas triterpénicas, conocidas como phytolaccosidos, geninas identificadas como: ácido esculéntico, ácido jaligónico y ácido phytolaccagénico. Además de otros constituyentes como histamina (0.13 % al 0.16 %), ácido γ-amino butírico, espinasterol, betanina, americanol e isoamericanol, almidón, sacarosa, una cantidad considerable de resina, una cantidad apreciable de flavonoides y ácidos fenólicos (Bylka, 2001), cariofilina y sales de potasio entre otras sustancias². Los más importantes metabolitos secundarios aislados en *Phytolacca americana* son representados en la Tabla 4 por las siguientes estructuras químicas.

² Información recabada del boletín emitido por The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (Veterinary Medicines Evaluation Unit). April 1999. www.eudra.org/emea.html

TABLA 4. Principales metabolitos secundarios aislados en *Phytolacca americana*.

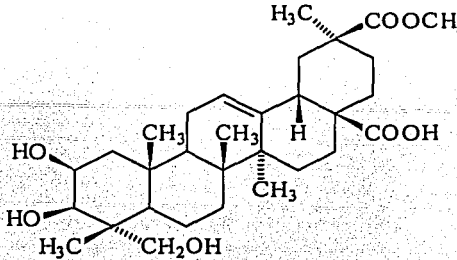
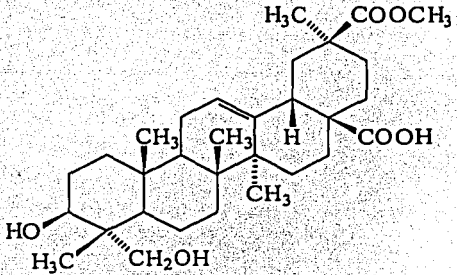
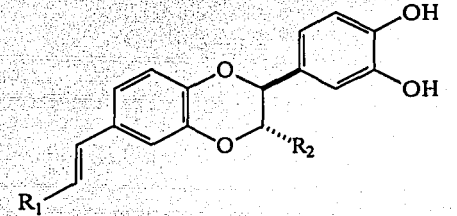
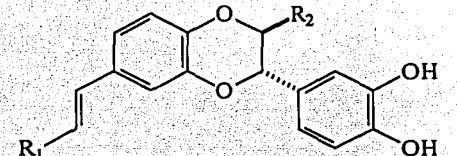
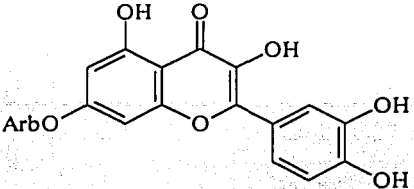
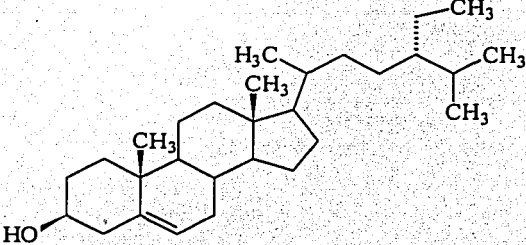
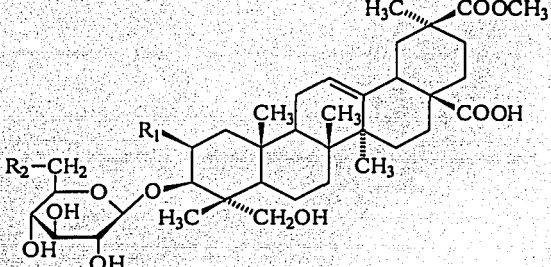
Nombre Químico	Fórmula	Referencia
<p>Fitolacagenina; 2β,3β,23-trihidroxi-12-oleaneno-28,30-ácido dioco 30-monometil Ester.</p>		<p>Spengel <i>et al.</i>, 1990, 1992. Harbone, 1991. Stout <i>et al.</i>, 1964.</p>
<p>Ácido fitolacacínico: 3β,23-dihidroxi-12-oleaneno-28,30-ácido dioco 30-monometil Ester</p>		<p>Spengel <i>et al.</i>, 1992. Harbone, 1991. Duke, 1992.</p>
<p>Americanol A (1) Americanina (3) (1) R₁ = R₂ = CH₂OH (3) R₁ = CHO, R₂ = CH₂OH</p>		<p>Matsumoto <i>et al.</i>, 1999. Takahashi <i>et al.</i>, 2000.</p>
<p>Isoamericanol A (2) Isoamericanina (4) (2) R₁ = R₂ CH₂OH (4) R₁ = CHO, R₂ = CH₂OH</p>		<p>Matsumoto <i>et al.</i>, 1999.</p>

TABLA 4. Continuación.

Nombre Químico	Fórmula	Referencia
Quercimeritrina		<p>Harbone, 1991. Duke, 1992.</p>
β-Sitosterol		<p>Duke, 1992.</p>
<p>fitolacósidos</p> <p>A (R₁ = H₂, R₂ = H) B (R₁ = H, OH, R₂=H) D (R₁ = H, R₂ = Glu) E (R₁ = H, OH, R₂ =Glu)</p>		<p>Woo <i>et al.</i>, 1978.</p>
<p>Proteasas:</p> <p>Phytolacafina G</p> <p>Phytolacafina R</p>	<p>Secuencia: (H₂N-SLPKHVDWRDS....)</p> <p>(H₂N-NLPSYIDWRNN....)</p>	<p>Uchikoba <i>et al.</i>, 2000</p> <p>Kaneda <i>et al.</i>, 1988, 1994 y 1995.</p>

Además de los compuestos ya descritos anteriormente *Phytolacca americana* contiene en menor proporción (Duke, 1992):

- 1) ÁCIDO 3-ACETILALEURITOLICO.
- 2) ÁCIDO 3-ACETILOLEANÓLICO.
- 3) ÁCIDO 3-OXO-CARBOXI-24-NOROLEAN-12-EN-29-ÓICO.
- 4) ALCALOIDES.
- 5) α -ESPINASTEROL.
- 6) ANTHOCIANINA.
- 7) ASTRAGALINA.
- 8) BETANINA.
- 9) ALDEHÍDO CAFÉICO.
- 10) CARIOFILENO.
- 11) ÁCIDO ESCULÉNTICO.
- 12) ISOBETANINA.
- 13) ISOQUERCETINA.

Phytolacca americana es una fuente importante de saponinas, geninas y heterósidos las cuales poseen la propiedad de ser solubles en agua e insolubles en disolventes no polares, estas pueden ser también extraídas con soluciones hidroalcohólicas, tras una eliminación parcial de los lípidos que acompañan a estos compuestos, pero cuando se trata de concentrar las soluciones que poseen estos compuestos, resulta difícil por la formación de espuma en la solución. La separación de los saponósidos teniendo en cuenta su elevado peso molecular y las diferencias a veces muy pequeñas entre los constituyentes de la mezcla homogénea, es una tarea ardua, la que necesita una amplia utilización de técnicas cromatográficas en alúmina, gel de sílice o Sephadex, la CLAR, especialmente en fase reversa resulta muy útil para la purificación de estos compuestos. La cromatografía en capa fina también es una herramienta útil para separar algunos de estos compuestos (Bruneton, 1992; Woo *et al.*, 1978; Stuart *et al.*, 1981; Keville, 1995; Matsumoto *et al.*, 1999; Kaneda *et al.*, 1995; Stout *et al.*, 1964; Takahashi *et al.*, 2001).

5.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GENERO *Phytolacca*.

Debido a que este género posee propiedades medicinales muy variadas entre las distintas especies, sólo se mencionaran las especies más importantes:

5.3.1 *Phytolacca dodecandra*.

Esta especie es utilizada por la medicina tradicional Africana, para el combate de parásitos como es la bilharzia y la esquistosomiasis, provocada por ciertas especies de caracoles las cuales son portadores de estos parásitos (Steiner, 1986; Parkhurts *et al.*, 1973).

5.3.2 *Phytolacca icosandra*.

Especie utilizada en Sudamérica por los indios del Amazonas para el tratamiento de parásitos de la piel como son la escabiasis, dermatitis y ciertas infecciones fúngicas que atacan a la piel, además de combatir la esquistosomiasis ciertos autores en botánica indican que *P. americana* es sinónimo de esta especie (Treyvaud *et al.*, 2000).

5.3.3 *Phytolacca esculenta*

Especie utilizada por la medicina tradicional China, empleada para el tratamiento de edema, bronquitis y ciertos tumores cancerosos (Yang-Hua *et al.*, 1989).

5.3.4 *Phytolacca accinosa*.

Especie que crece en la India y China utilizada por la medicina tradicional para el tratamiento de artritis y reumatismo (Spengel *et al.*, 1990).

5.3.5 *Phytolacca rivinoides*.

Especie Sudamericana utilizada por los indios Guaranies de Ecuador como agente antiinflamatorio y se ha descubierto que posee propiedades antioxidantes con efectos hepatoprotectores (De las Heras *et al.*, 1998).

5.3.6 *Phytolacca americana*.

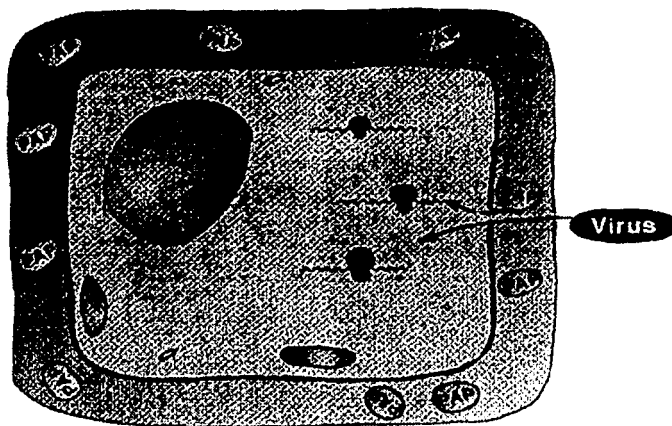
Quizá de todo el género *Phytolacca*, *P. americana* es la especie más estudiada a nivel químico y biológico, se han observado varios efectos farmacológicos en donde las saponinas triterpénicas son las responsables de esta actividad, algunas de ellas son fuertes irritantes. Posee actividad antifúngica (Shao *et al.*, 1999). Se ha encontrado que los extractos de la raíz de *Phytolacca americana* poseen actividad espermicida (D'Cruz *et al.*, 2001).

Se ha encontrado que los fitolaccósidos poseen actividad antiinflamatoria (Duke, 1992), probada en los modelos de edema agudo en rata y ratón, así como la reducción del edema hasta en un 50%, en el modelo de inflamación por carragenina en rata.^[3]

La proteína aislada denominada (PAP) es un potente inhibidor de ribosomas, y como potente agente antiviral contra virus animales y vegetales incluyendo el Virus de Inmunodeficiencia Humana en estudios *in vitro*, así como las sustancias mitógenas aisladas que pueden estimular el sistema inmunológico, especialmente sobre la proliferación de linfocitos T y B y puede inhibir el crecimiento de tumores cancerosos en la figura 7 se representa el mecanismo de acción de la proteína antiviral (Tomlinson *et al.*, 1974; Desvoyes *et al.*, 1997; Uchikoba *et al.*, 2000; Shlick *et al.*, 1999; Kaneda *et al.*, 1994; Rajamohan *et al.*, 1999).

³ Información recabada del boletín emitido por The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (Veterinary Medicines Evaluation Unit). April 1999 www.eudra.org/emea.html

Célula de
Phytolacca.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 7. Mecanismo de acción de la Pokeweed Antiviral Protein (PAP): Mecanismo suicida: la PAP esta presente en la pared celular, cuando hay una infección viral; la PAP destruye los ribosomas; la célula muere; no hay replicación viral (Mabry, 2001).

Dentro de la medicina tradicional *Phytolacca americana* es utilizada por los indios de Estados Unidos, aplicando el jugo del fruto a ciertos tumores cancerosos de piel, así como ungüentos o decocciones para el reumatismo, se ha observado que los preparados son eméticos, catárticos, laxantes y ligeramente narcóticos, en el sur de México hasta Centroamérica se ha utilizado como remedio para el catarro, dismenorrea, dispepsia, sífilis, tonsilitis, conjuntivitis granular, laringitis, lombrices así como erupciones y úlceras en la piel y micosis dérmicas (Duke, 2000; Fernández, 1994).

De las semillas del fruto de *Phytolacca americana* se han aislado potentes agentes neurotrópicos como el americanol e isoamericanol y americanina A, esta última exhibe actividad antiinflamatoria (Takahashi *et al.*, 2001; Matsumoto *et al.*, 1999; Lee, 2001).

Se ha establecido que ciertos derivados de la PAP pueden modificar la funcionalidad del útero durante la implantación del óvulo fecundado, lo que indica que puede tener propiedades abortivas (Niklaus *et al.*, 1999).

Recientemente Nathan y Stermitz, (2000) desarrollaron derivados semisintéticos de la americanina A los cuales resultaron ser potentes inhibidores del crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

Henderson (1998), desarrolló un derivado de la PWM (Pokeweed Mitogen Factor) proteína aislada de las hojas de *P. americana*, la cual es una fitohemaglutinina mitógena, y esta posee actividad contra la leucemia limfoblástica aguda, además tiene la capacidad de inhibir el desarrollo de ciertos tipos de tumores (Schlick *et al.*, 2000).

La raíz se emplea sobre todo internamente en el tratamiento de las infecciones de garganta asociada con hinchazón de glándulas; actúa especialmente a nivel de sistema linfático. Se emplea también en casos de reumatismo crónico e infecciones en la parte superior del tracto respiratorio. Externamente se aplica como ungüento o cataplasma en caso de infecciones fúngicas, úlceras, hemorroides y escabiasis (Stuart, 1981; Shao *et al.*, 1999; Jeon *et al.*, 1999; De las Heras *et al.*, 1998).

VI. GÉNERO *Alnus*.

6.1 DESCRIPCIÓN DEL GÉNERO *Alnus*. (Betulaceae).

Árboles o arbustos monoicos. Hojas alternas, simples, pecioladas pinnatinervadas, generalmente aserradas o dentadas; estípulas libres, caducas. Inflorescencias generalmente de simulas reducidas, espiraladas sobre un eje prolongado formando amentos o en dicasios, la floración antes o con el desarrollo de las hojas nuevas; flores masculinas 1-3 en la axila de cada bráctea, en amentos péndulos; perianto de un solo verticilo, los integrantes libres o unidos, o ausentes; estambres 2-14, los filamentos libres, las dos tecas completa o parcialmente separadas; inflorescencias femeninas en amentos o estrobiliformes, generalmente, con 2-3 flores en diminutas, persistente sobre ápice del fruto; ovario ínfero, 2-3 locular, con 1-2 óvulos péndulos en cada lóculo, los estilos y estigmas 2. Fruto una nuez monosperma, alada y con dispersión libre (*Alnus* y *Betula*), ovoide, comprimido y sostenido por una bráctea aliforme persistente (*Carpinus*) o envuelto en una bráctea sacciforme, vesicular (*Ostrya*) (Cano y Marroquín, 1994).

6.1.1 *Alnus acuminata* Subsp *arguta* (Schldtl).

La subespecie *arguta* se restringe en su distribución a América del Sur. Se extiende desde el noroeste de México hasta el norte de Argentina y los andes de Perú y Bolivia. Se ha introducido en Chile y Nueva Zelanda (Rzedowski, 1979).

Esta especie comprende árboles de hasta 30 metros de altura, generalmente con varios troncos; yemas cubiertas por resina. Hojas con lámina ovalada 6-15 cm de largo, 3-8 cm de ancha, el haz glabro en la madurez, en envés esparcidamente pubescente, especialmente a lo largo de los nervios, glabro con la edad, moderadamente glandular, con glándulas sésiles amarillas a morenas, el margen agudamente biserrado, el ápice acuminado, la base aguda, cuneada o redondeada; pecíolos de 10-20mm de largo. Inflorescencias masculinas en amentos de 5-10 cm de largo, generalmente en agrupaciones de 3; flores masculinas con 4 segmentos en el perianto; estambres con anteras de 1.2-2 mm

de largo, las tecas fusionadas en más o menos mitad de su longitud; inflorescencias femeninas 3-4 en racimos, 3-8 mm de largo en anthesis; conos de 11 a 28 mm de largo; 8-12 mm de diámetro, los pedúnculos de 1-10 mm de largo; escamas de 3-4.5 mm de largo, 3-4.5 mm de ancho en el ápice. Frutos con alas angostas, éstas de 2-2.3 mm largo 0.2-1 mm de ancho, el cuerpo de 1.5-3mm de largo, 1.5-1.8 mm de ancho (Rzedowski, 1979).

Esta especie se distribuye desde la parte central de Sonora pasando por la sierra Madre Occidental hasta la parte central de México donde se distribuye ampliamente (Figura 8); ausente del Istmo de Tehuantepec; presente en Chiapas, Guatemala, el Salvador, la parte central de Costa Rica y el oeste de Panamá. En Chiapas se le conoce con el nombre de "Ilite", "Aile", en Yucatán: "Aliso" y "Abedul" en Veracruz, "Palo de Águila" en Tabasco (Martinez, 1984).

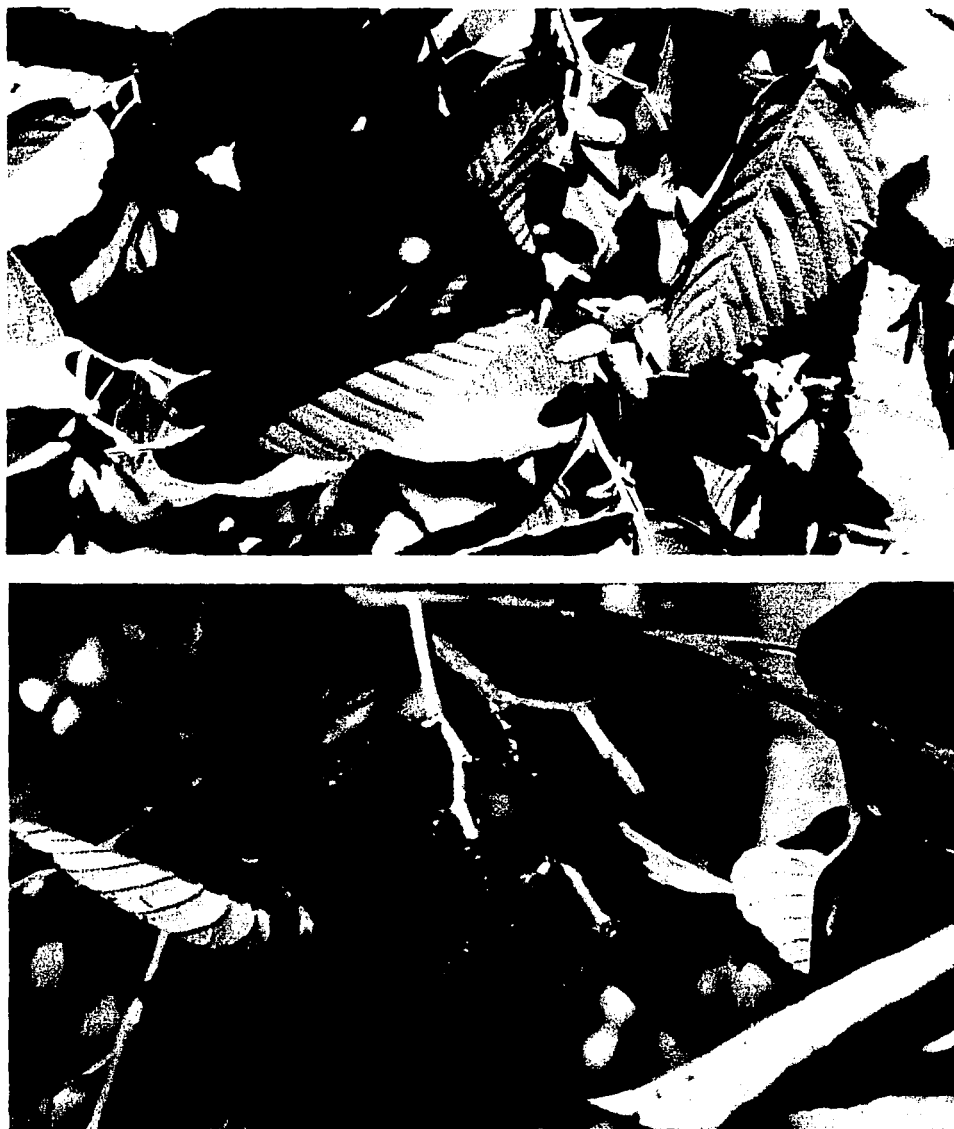


Figura 8. *Alnus acuminata* subsp. *arguta* (hojas y frutos).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL GÉNERO *Alnus*.

La familia de las Betuláceas poseen compuestos químicos de interés científico y medicinal entre ellos la corteza presenta una cantidad apreciable de alquitrán y de aceites esenciales (monoterpenos), los más conocidos son el α -betulenol y el β -betulenol, también encontrados en *Alnus* (Dermici *et al.*, 2000), contiene también compuestos denominados saponinas, ácido betulínico y betulina (Mañes *et al.*, 1997; Duke, 1992), de las hojas se extrae un flavonoide (Acacetina), la corteza también es fuente de resinas y compuestos con estructuras fenólicas (Rhododendrina, miricetina, delfinidina y ácido elágico), estos compuestos son los más comunes dentro del género *Alnus* y son usados como una herramienta para clasificar a las distintas especies por quimiotaxonomía (Evans, 1985), además de poseer esteroides como β -sitosterol y dammaranos (Tyler, 1979). En la Tabla 5 se presentan algunos de los metabolitos secundarios encontrados en el género *Alnus*.

Tabla 5. Metabolitos secundarios mayoritarios encontrados en el género *Alnus*.

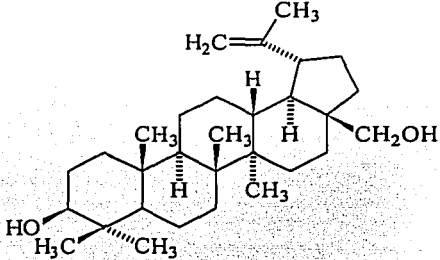
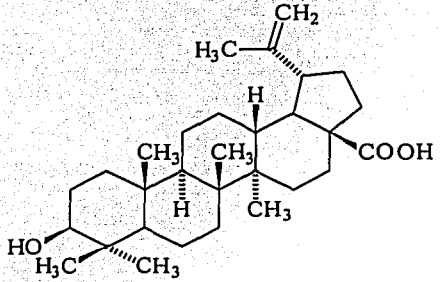
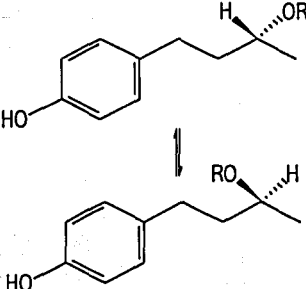
Nombre Químico	Fórmula	Referencia
<p>Betulina; Betulol; Betulinol; Trochol.</p> <p>20(29)-lupeno-3β,28-diol</p>		<p>Evans, 1985.</p> <p>Harbone, 1991.</p> <p>Duke, 1992.</p> <p>Mañes <i>et al.</i>, 1997.</p> <p>Huguet <i>et al.</i>, 2000.</p>
<p>Ácido betulínico:</p> <p>3β-hidroxi-20(29)-lupan- 28-oico ácido.</p>		<p>Galgon <i>et al.</i>, 1999.</p> <p>Duke, 1992.</p> <p>Huguet <i>et al.</i>, 2000.</p> <p>Mañes <i>et al.</i>, 1997.</p> <p>Steele <i>et al.</i>, 1999.</p>
<p>Rhododendrina:</p> <p>(-)-Rhododendrol : R = H Rhododendrina: R = Glc</p> <p>(+)-Rhododendrol: R = H Rhododendrina: R = Glc</p>		<p>Harbone, 1991.</p> <p>Santamour <i>et al.</i>, 1997.</p> <p>Klischies <i>et al.</i>, 1978.</p>

Tabla 5. Continuación.

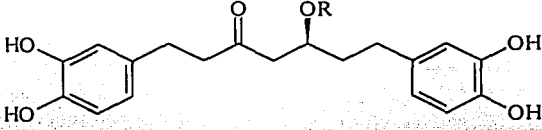
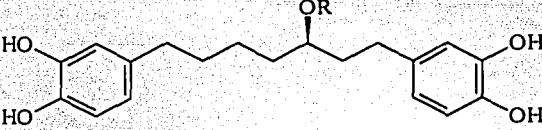
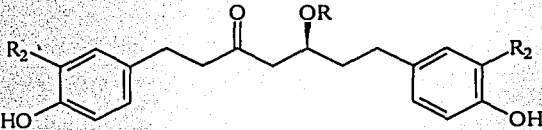
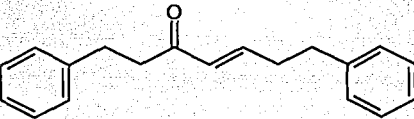
Nombre Químico	Fórmula	Referencia
<p>Hannokina R = Xyl R = H</p>		<p>Min-Won <i>et al.</i>, 2000.</p>
<p>Oregonina R = Xyl R = Glc</p>		<p>Min-Won <i>et al.</i>, 2000.</p>
<p>Platipilósida R₁ = GlcPyr, R₂ = H R₁ = GlcPyr, R₂ = OH R₁ = Xyl, R₂ = H R₁ = H, R₂ = H</p>		<p>Chen <i>et al.</i>, 2000. Matsuda <i>et al.</i>, 1998.</p>
<p>deshidroyashabushiketol</p>		<p>Tori <i>et al.</i>, 1995.</p>

Tabla 5. Continuación.

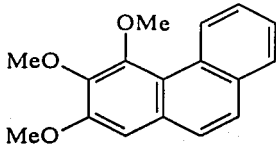
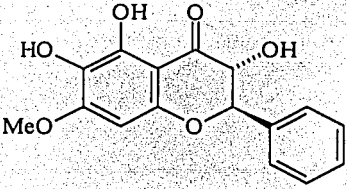
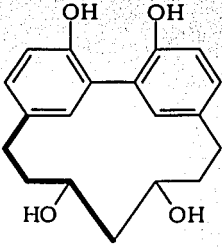
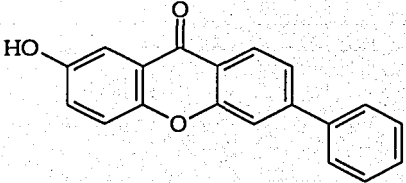
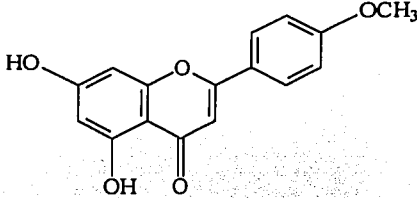
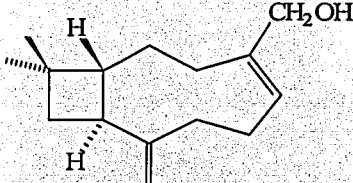
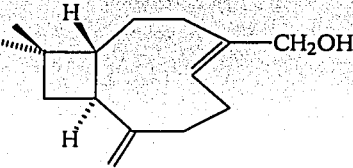
Nombre Químico	Fórmula	Referencia
2,3,4-Trimetoxifenatreno		Tori <i>et al.</i> , 1995.
Alnustinol		Duke, 1992.
Alnusdiol		Hanawa <i>et al.</i> , 1997.
Glutanxona		Peres <i>et al.</i> , 2000.

Tabla 5. Continuación.

Nombre Químico	Fórmula	Referencia
Acacetina; Linarigenina: 4-metil éter apigenina		Harbone, 1991. Evans, 1985. Keinänen <i>et al.</i> , 1998.
α -betulenol		Demirci <i>et al.</i> , 2000. Evans, 1985.
β -betulenol		Demirci <i>et al.</i> , 2000. Evans, 1985.

6.3 ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL GÉNERO *Alnus*.

Dentro de este género hay varias especies que poseen propiedades medicinales, sólo se mencionarán las especies más importantes:

6.3.1 *Alnus hirsuta* var. *sibirica*.

Especie Asiática la cual se distribuye en China y Corea, esta especie ha sido utilizada por la medicina tradicional de esos países para el tratamiento de cáncer de seno, se ha descubierto que los compuestos aislados de la corteza, son potentes inhibidores de la inflamación vía inhibición de ciclooxigenasa-2, además en modelos de laboratorio tiene una inhibición significativa del edema producido por TPA en la piel de ratones (Min-Won *et al.*, 2000).

6.3.2 *Alnus rubra*.

Especie nativa de la Columbia Británica (Canadá), los nativos de Canadá han usado esta especie para infecciones fúngicas, en estudios de laboratorio se han podido aislar a partir de la corteza y hojas, sustancias con actividad antibiótica contra distintos tipos de bacterias, en años recientes ha demostrado ser eficaz contra el cáncer de piel (McCutcheon *et al*, 1992, 1994; Chen *et al*, 2000).

6.3.3 *Alnus oregona*.

Especie del sur de los Estados Unidos de Norteamérica, ha sido utilizada por los indígenas de ese país para el tratamiento de ciertos tipos de tumores cancerosos, de la cual se ha aislado un compuesto llamado oregonina esta sustancia es la responsable de la actividad anticancerosa en estudios de laboratorio (Bianchi *et al*, 1973).

6.3.4 *Alnus incana*.

Especie del sur de Canadá, es utilizada por los indígenas de esa región para el tratamiento de la leucemia y cáncer de útero y piel, en decocciones y en forma de unguento, la corteza y las hojas son utilizadas para el tratamiento de parásitos e infecciones dérmicas (Richt-Krc *et al*, 1996).

6.3.5 *Alnus hirsuta*.

Especie que se encuentra en el Japón, la medicina tradicional de ese país le atribuye propiedades contra la fiebre, diarrea y contra el alcoholismo, en estudios recientes ha demostrado que puede inhibir de síntesis de óxido nítrico *in vitro* en modelos murinos de inflamación (Min-Won *et al*, 2000).

6.3.6 *Alnus maximowiczii*.

Especie que predomina en China y Norte de India, ha sido utilizada por la medicina tradicional para el combate de infecciones por parásitos intestinales e infecciones dérmicas por hongos (Tori *et al.*, 1995).

6.3.7 *Alnus glutinosa*.

Especie que predomina en Canadá, esta especie posee propiedades antiinflamatorias, antisépticas, inmunosupresoras y antitumorales (Duke, 1992).

6.3.8 *Alnus acuminata* Subsp *arguta*.

Esta especie es utilizada en la medicina tradicional mexicana del Sureste del país, se le atribuyen propiedades como antiescrofulosa, astringente y antiinflamatoria en afecciones cutáneas, para la sífilis y para infecciones bacterianas (Martínez, 1984).

Hasta el día de hoy no se tiene un estudio clínico que demuestre las propiedades terapéuticas de esta especie, así como un estudio químico que indique el tipo de metabolitos que contiene *Alnus acuminata* Subsp *arguta*.

VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

La especie *Phytolacca americana* ha sido objeto de numerosos estudios debido a que es fuente de una cantidad apreciable de sustancias –productos naturales- con propiedades medicinales.

Dichos estudios se han centrado especialmente al aislamiento y elucidación estructural de sus metabolitos secundarios.

Phytolacca americana es una especie vegetal usada en la medicina tradicional Mexicana, para diversos padecimientos, además de que existen estudios que indican que esta especie muestra una posible potencialidad como agente antiinflamatorio.

Sin embargo, *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* es utilizada por la medicina tradicional Mexicana, de la que no hay referencias de estudios científicos que demuestren las propiedades terapéuticas de esta especie así como un estudio químico que también indique el tipo de metabolitos que contiene dicha especie.

Por lo tanto, el presente proyecto fue encaminado a realizar un estudio para evaluar el efecto antiinflamatorio de los extractos metanólicos crudos por separado, así como la mezcla de dichos extractos para determinar una posible interacción farmacológica entre *Alnus acuminata* y *Phytolacca americana*, de tal forma que tenga acción antiinflamatoria en rata Wistar como organismo de prueba, mediante el modelo de inducción de inflamación por carragenina y con la finalidad de establecer su potencialidad como agentes antiinflamatorios y aportar el primer estudio farmacológico preliminar para *Alnus acuminata* Subsp *arguta*.

VIII. HIPÓTESIS.

En un modelo de inflamación inducido por carragenina en rata Wistar, al aplicar los extractos metanólicos crudos de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* por separado ejercerán actividad antiinflamatoria, esperándose que una combinación de ambos extractos de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* presenten interacción sinérgica antiinflamatoria.

IX. OBJETIVOS.

GENERAL.

Realizar la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos crudos de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* y *Phytolacca americana*; así como la de su posible interacción sinérgica antiinflamatoria en rata Wistar utilizando el modelo de inducción de edema por carragenina.

PARTICULARES.

- Colectar el material vegetal: *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* y *Phytolacca americana* L.
- Preparar los diferentes extractos metanólicos, por medio de extracciones sólido-líquido.
- Determinar la toxicidad (DL₅₀) de los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* (corteza y hojas) y *Phytolacca americana* (planta íntegra) en ratón albino.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos crudos por separado en el modelo de inducción de edema por carragenina en rata Wistar.
- Evaluar la interacción de una mezcla de ambos extractos para determinar un posible sinergismo antiinflamatorio, comparado contra indometacina como fármaco antiinflamatorio de referencia.

X. MATERIAL Y MÉTODOS.

10.1 Material vegetal.

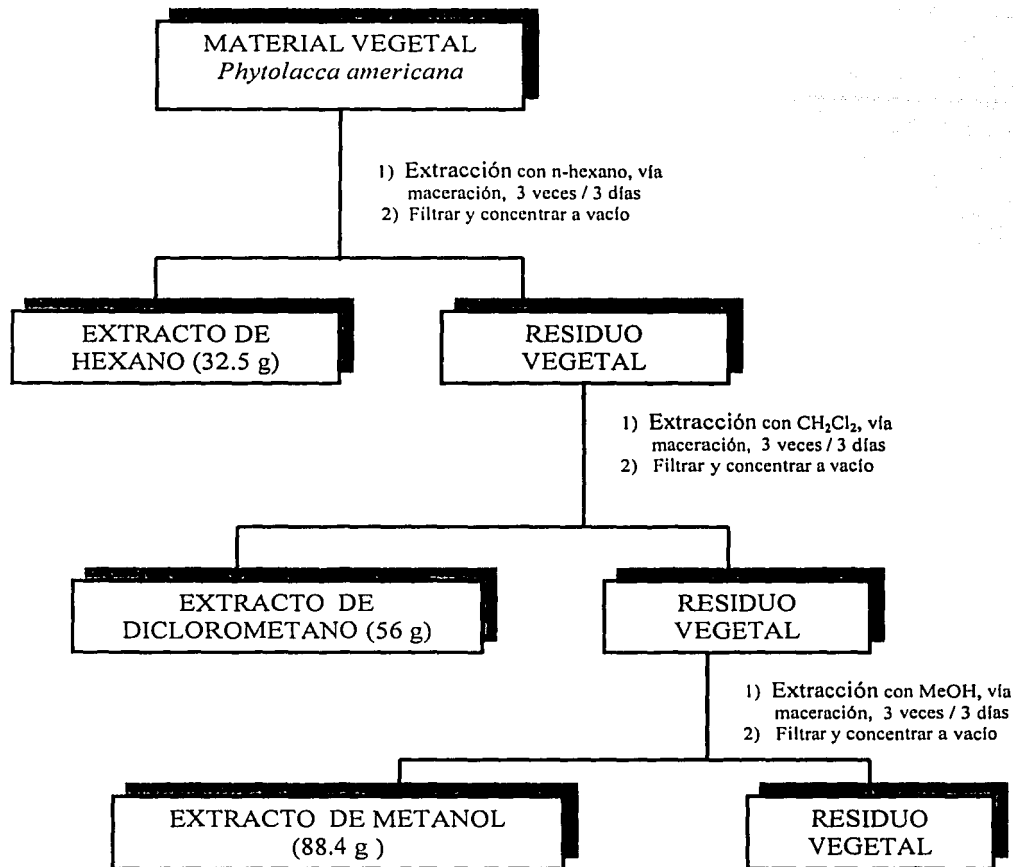
La corteza y las hojas de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* fueron colectadas en el municipio de Huistan, Chiapas, se secaron a temperatura ambiente y a la sombra, las hojas y tallos de *Phytolacca americana* fueron colectadas en el municipio de Ocosingo, Chiapas, la identificación del material vegetal fue realizada por el Dr. Mario Ishiki Ishihara del Herbario de El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Chiapas.

El material vegetal se molió hasta la obtención de trozos pequeños, los frutos de ambas especies vegetales se eliminaron.

10.2 PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VEGETALES.

10.2.1 Preparación del extracto metanólico de *Phytolacca americana*.

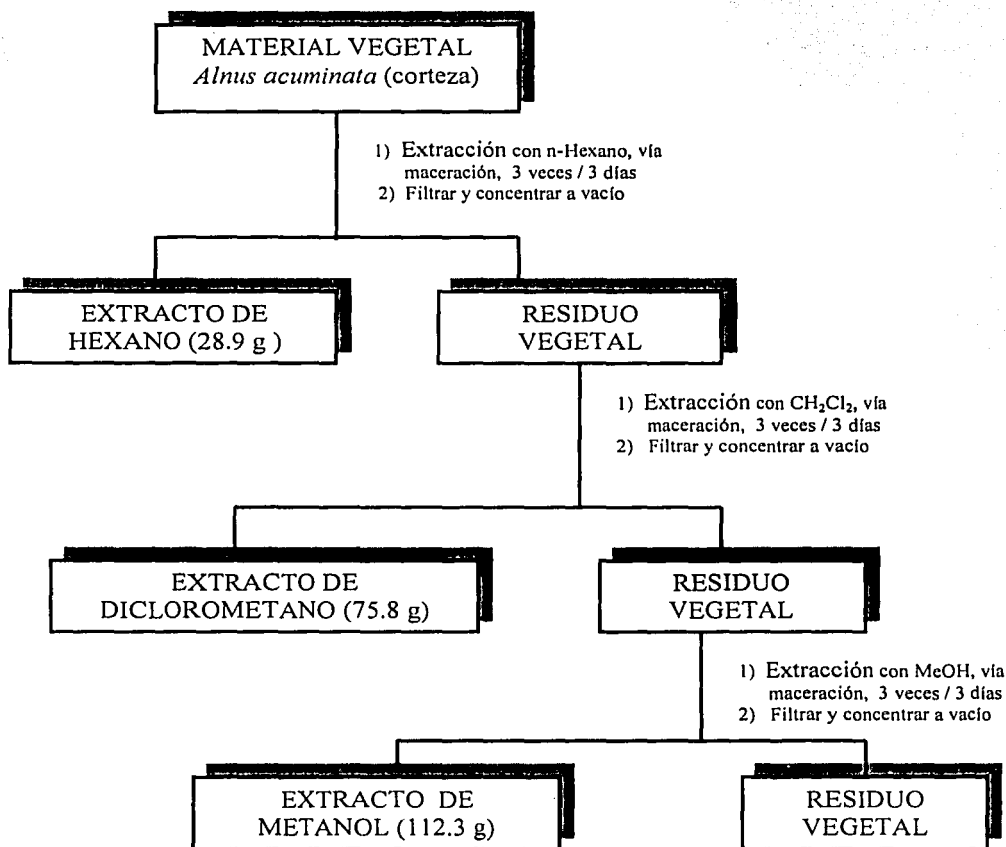
El material vegetal seco y molido (400 g) de *Phytolacca americana*, (hojas y tallos), se extrajo mediante un proceso de maceraciones sucesivas con n-hexano, diclorometano y metanol (se utilizó un volumen de 1000 mL de cada disolvente para la extracción). En el Esquema 1 se resume el procedimiento experimental de extracción.



Esquema 1. Proceso de extracción de *Phytolacca americana*.

10.2.2 Preparación del extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata* Subsp *arguta*.

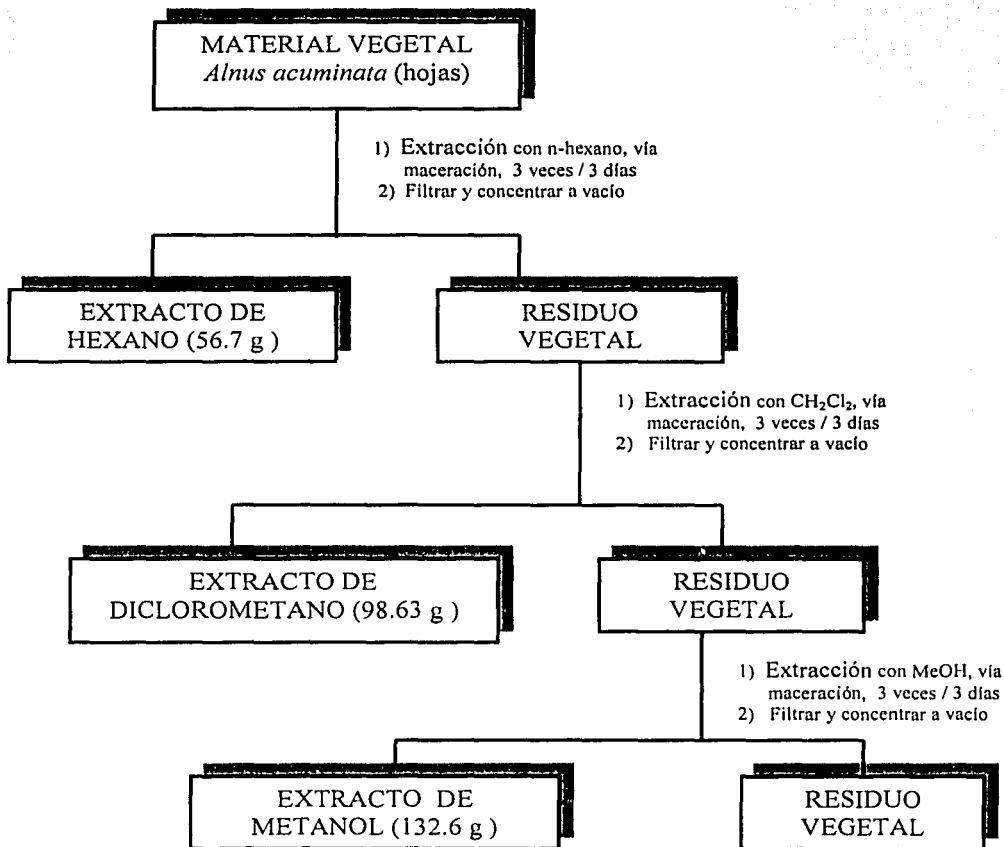
El material vegetal seco y molido (500 g) de la corteza de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta*, se extrajo mediante un proceso de maceraciones sucesivas con n-hexano, diclorometano y metanol (se utilizó un volumen de 1000 mL de cada disolvente para la extracción). En el Esquema 2 se resume el procedimiento experimental de extracción.



Esquema 2. Proceso de extracción de la corteza de *Alnus acuminata*.

10.2.3 Preparación del extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta*.

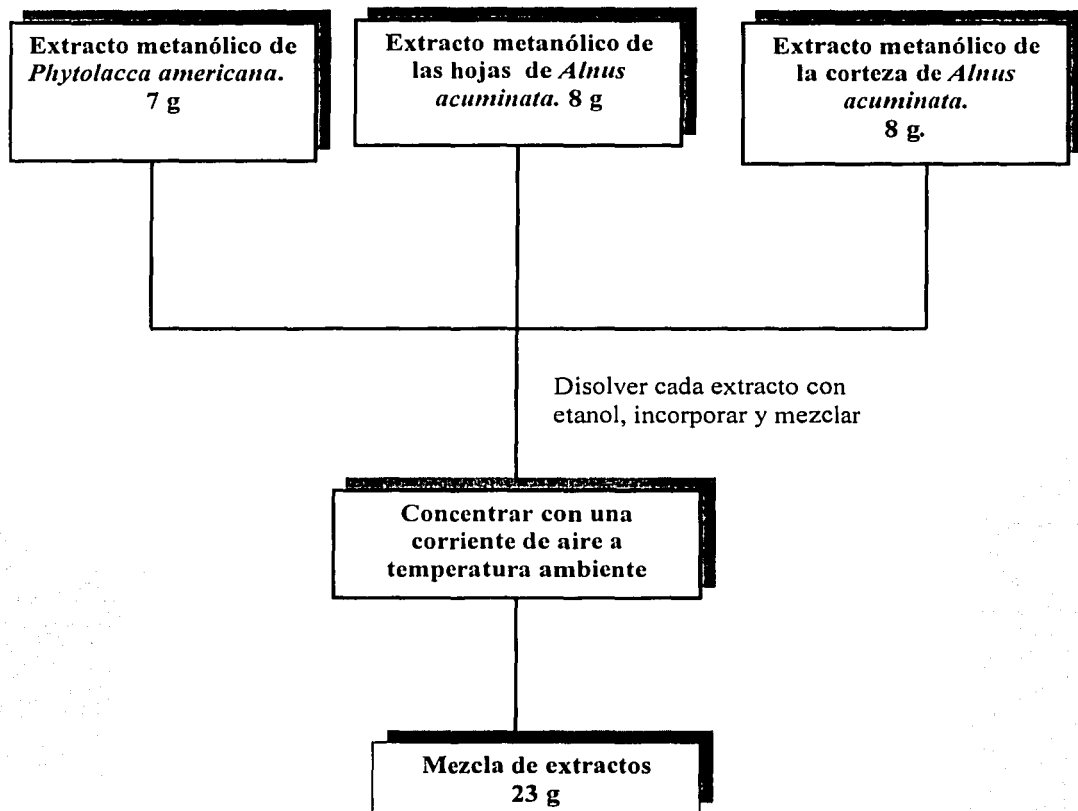
El material vegetal seco y molido (950 g) de las hojas de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta*, se extrajo mediante un proceso de maceraciones sucesivas con n-hexano, diclorometano y metanol (se utilizó un volumen de 2500 mL de cada disolvente empleado para la extracción). En el Esquema 3 se resume el procedimiento experimental de extracción.



Esquema 3. Proceso de extracción de las hojas de *Alnus acuminata*.

10.2.4 Preparación de la mezcla de los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* Subsp *arguta* y *Phytolacca americana*.

La proporción de extractos vegetales para formar la mezcla fue sugerida Dr. Nikolay Martínez Castillejos del Centro Fitoterapéutico de Investigaciones Biomédicas A.C. de Mérida Yucatán. En el Esquema 4 se resume la forma de preparación de la mezcla.



Esquema 4. Elaboración de la mezcla de extractos metanólicos.

10.3 DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD (DL₅₀) DE LOS EXTRACTOS METANÓLICOS DE *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata* Subsp. *arguta*.

10.3.1 Método de estimación de la toxicidad (DL₅₀) para compuestos desconocidos.

El método de Lorke, (1983) fue utilizado para determinar la DL₅₀ en sustancias desconocidas, es útil para extractos vegetales en donde no se conocen los componentes que lo integran, se utilizó una cantidad pequeña de animales, una n = 3 por dosis, para ello se emplearon ratones albinos de 18 a 22 g y 60 días de edad, obtenidos de la compañía Harlan México A.C.

En la tabla 6 se reportan los valores de dosis empleados para la estimación de la DL₅₀.

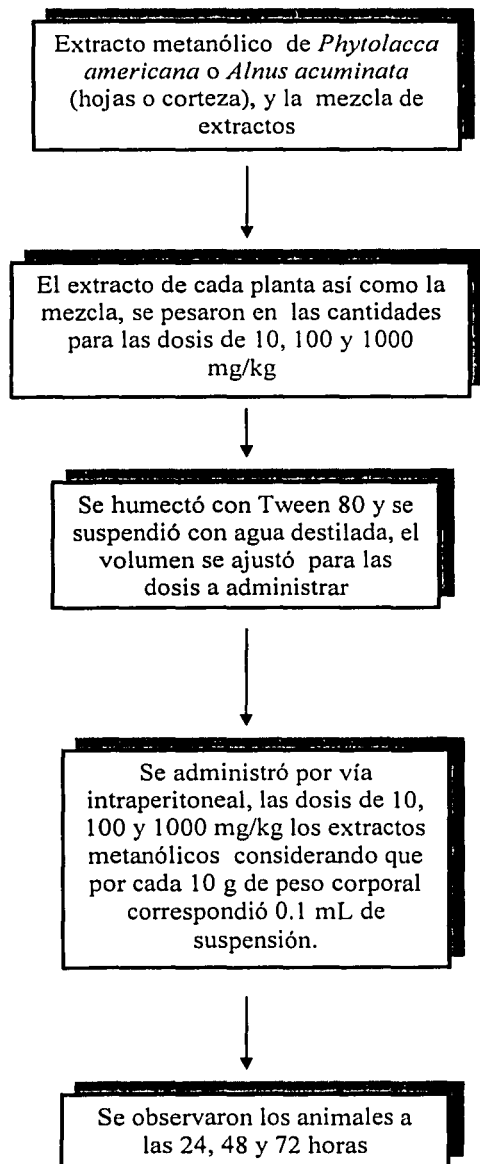
Tabla 6. Estimación de la DL₅₀ por la técnica de Lorke, (1983).

Dosis en mg/kg peso corporal Resultado de la estimación inicial			Dosis para la segunda estimación			
10	100	1000				
0*/3*	0/3	0/3		1600	2900	5000
0/3	0/3	1/3	600	** 1000	1600	2900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1600
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600
0/3	1/3	3/3	50	** 100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	** 10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8

* Número de animales que mueren / Número de animales usados

** El resultado de las primeras estimaciones se toman sobre estas dosis

Se administraron las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg por vía intraperitoneal, de los extractos metanólicos de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata* (corteza y hojas) y la mezcla de los extractos, el procedimiento general se describe en el esquema 5.



Esquema 5. Metodología seguida para la determinación de la DL₅₀ de los extractos metanólicos de *Phytolacca americana*, *Alnus acuminata* y la mezcla de extractos.

10.4 MODELO DE INFLAMACIÓN INDUCIDA POR CARRAGENINA EN RATAS.

Para la determinación del efecto antiinflamatorio de los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* (corteza y hojas) y *Phytolacca americana*, así como una mezcla de éstos, se utilizaron ratas Wistar machos de 180 a 220 g de peso y 60 días de edad, obtenidos de la compañía Harlan México A.C., administrando por vía oral la dosis de 30, 100 y 300 mg/kg de los respectivos extractos así como de la mezcla, además se administró indometacina como fármaco antiinflamatorio de referencia a las dosis de 1, 10, 30 y 100 mg/kg, cada lote de animales llevó su respectivo control. Se administraron 30 minutos antes de aplicar 0.1 ml de una suspensión de carragenina al 3 % en el cojinete plantar de la pata derecha de la rata (jeringa Plastipack, aguja # 27) en el Esquema 6 se resume la técnica empleada (Winter *et al.*, 1962; Van Arman *et al.*, 1965).

El equipo para las mediciones que se utilizó fue un polígrafo (figura 9) modelo MP 100 Manager de la compañía BIOPAC System Inc. Las mediciones se realizaron con un transductor de presión modelo TD 104 de la compañía BIOPAC System Inc y una cápsula de vidrio para mercurio. Se utilizó el software AcqKnowledge versión 3.5 de la compañía BIOPAC System Inc. Se registraron las lecturas del miembro inflamado a los tiempos de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 horas.

10.4.1 Determinación de la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* Subsp *arguta* y *Phytolacca americana*.

Las ratas se pusieron en ayuno, (con agua *ad libitum*) 24 horas antes de realizar el estudio. Durante el experimento, no se les proporcionó agua ni alimento. Los animales se pesaron y marcaron con tinta indeleble en el "codo" de la pata trasera derecha de la rata; esta marca sirve de referencia (tope) para introducir la pata al mercurio y para asegurar la reproducibilidad entre las mediciones (Figura 10). En cada sesión se calibró el polígrafo de 10 a 50 mmHg con objetos de volumen conocido, antes de comenzar el experimento, seguido de la toma de basales o volumen de la extremidad al tiempo cero, la conversión de

los mmHg obtenidos se interpolaron por regresión lineal para transformar a unidades de volumen expresados en mL.

Por vía oral se administraron los extractos vegetales, así como la indometacina en suspensión, y 30 minutos después se administró en la pata derecha una inyección de carragenina (al 3 % p/v disuelta en solución salina fisiológica) de fracción lambda (forma no gelatinizante) tipo IV (Sigma Chem. Co.). A la pata izquierda sólo se le administró una inyección de 0.1 mL de solución salina misma que sirvió como referencia visual de la misma rata.

Con los resultados obtenidos se calculó el delta volumen (ΔV) en donde:

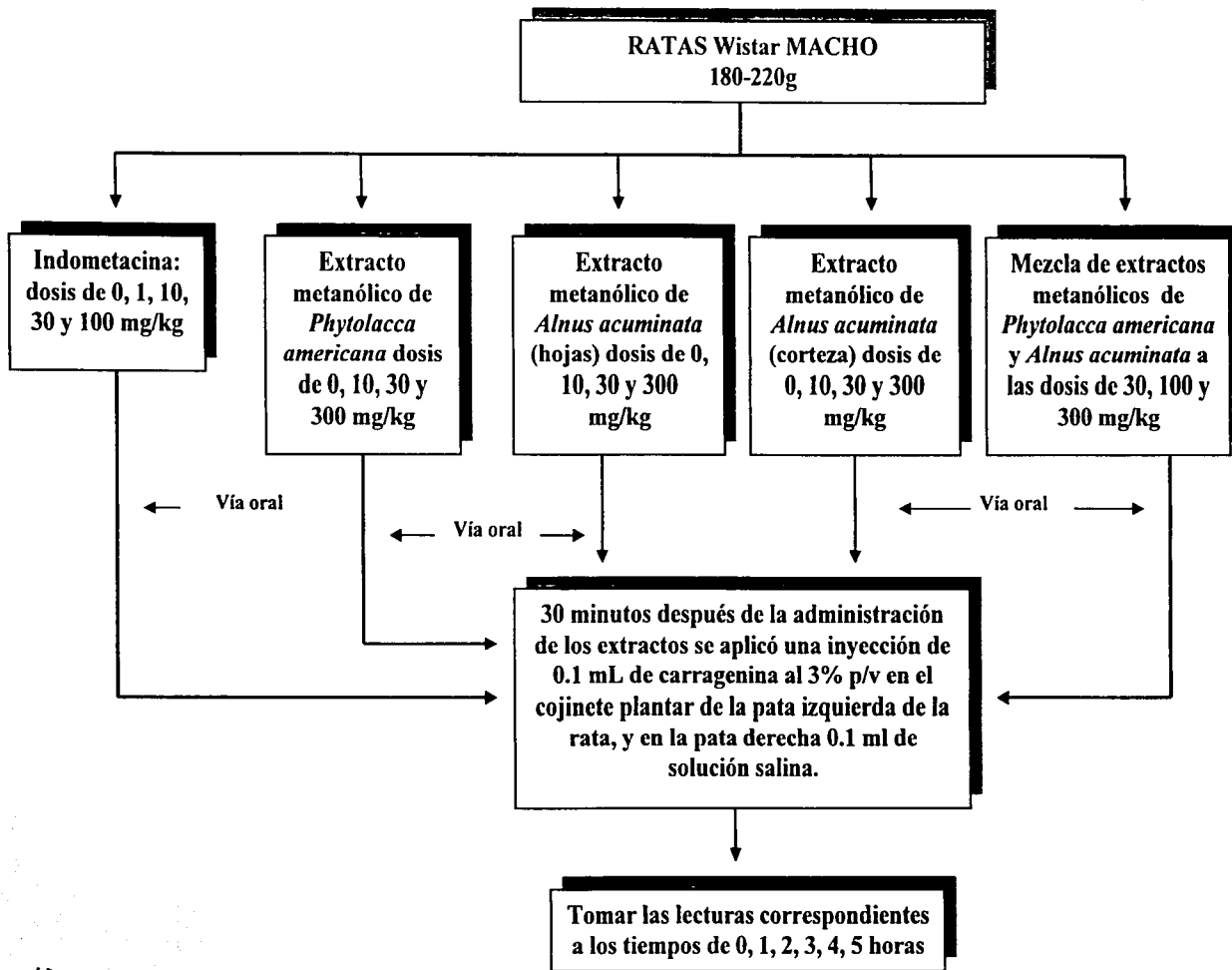
$$\Delta V = V_f - V_i$$

V_f = Volumen final de la extremidad inflamada

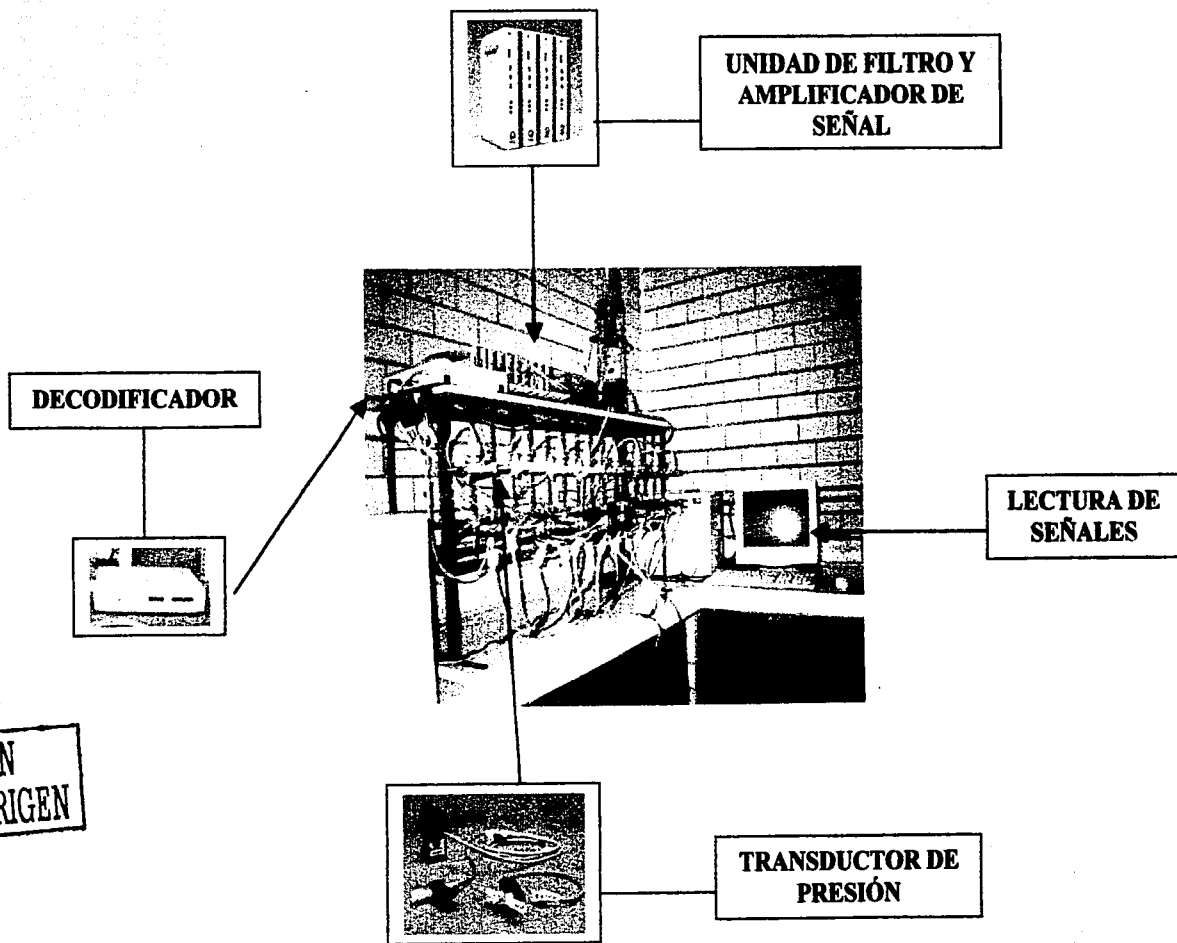
V_i = Volumen inicial de la extremidad inflamada

10.5 Análisis estadístico.

Los resultados se analizaron estadísticamente por un análisis de varianza de un factor, seguida de la comparación de medias por el método de Dunnett. Se consideraron diferencias significativas para una $p < 0.05$.



Esquema 6. Determinación de la actividad antiinflamatoria de los extractos.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Figura 9. Polígrafo MP 100 de Biopac System Inc.

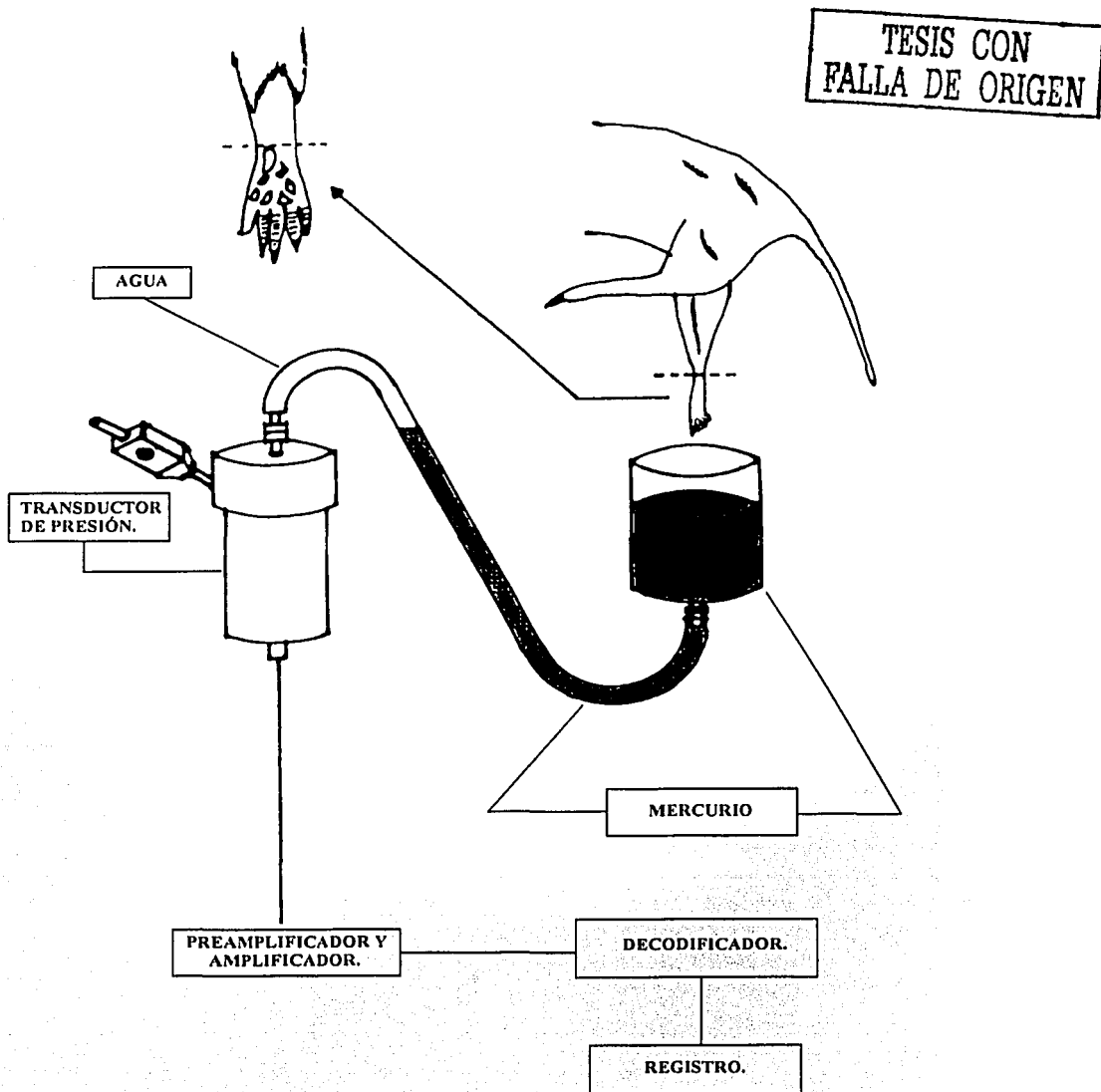


Figura 10. Diagrama para el registro de la inflamación en ratas Wistar (Winter *et al.*, 1962; Van Arman *et al.*, 1965).

XI. RESULTADOS.

11.1 Estimación de la toxicidad (DL₅₀) de los extractos metanólicos.

El extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* Subsp *arguta* no produjo efecto tóxico en el lote de animales empleado la dosis de hasta 5 g/kg, en la tabla 7 se describen las dosis evaluadas.

Tabla 7. Estimación de la toxicidad (DL₅₀) del extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* administrado por vía intraperitoneal.

DOSIS INICIAL EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
10	3	0
100	3	0
1000	3	0
DOSIS PARA LA SEGUNDA ESTIMACIÓN EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
1600	3	0
2900	3	0
5000	3	0

El extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata* Subsp *arguta* tampoco produjo efecto tóxico en el lote de animales empleado la dosis de hasta 5 g/kg, en la tabla 8 se describen las dosis evaluadas.

Tabla 8. Estimación de la toxicidad (DL₅₀) del extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata* administrado por vía intraperitoneal.

DOSIS INICIAL EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
10	3	0
100	3	0
1000	3	0
DOSIS PARA LA SEGUNDA ESTIMACIÓN EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
1600	3	0
2900	3	0
5000	3	0

El extracto metanólico de *Phytolacca americana* desarrolló efecto tóxico en el lote de animales empleado, en la tabla 9 se describen las dosis evaluadas.

Tabla 9. Estimación de la toxicidad (DL₅₀) del extracto metanólico de *Phytolacca americana* administrado por vía intraperitoneal.

DOSIS INICIAL EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
10	3	0
100	3	0
1000	0	3
DOSIS PARA LA SEGUNDA ESTIMACIÓN EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
140	3	0
225	3	0
370	1	2
600	0	3

Se aplicó la metodología descrita por Lorke, (1983), en donde se indicó que para obtener la DL₅₀ del extracto metanólico de *Phytolacca americana*, las dosis evaluadas en la segunda estimación (140, 225, 370 y 600 mg/kg) se calculó la media geométrica de 225, 370 y 600 mg/kg, donde se obtuvo el valor de DL₅₀ de 368.28 mg/kg.

La mezcla de los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* y *Phytolacca americana* no se produjo ningún efecto tóxico en el lote de animales empleado la dosis de hasta 5 g/kg, en la tabla 10 se describen las dosis evaluadas.

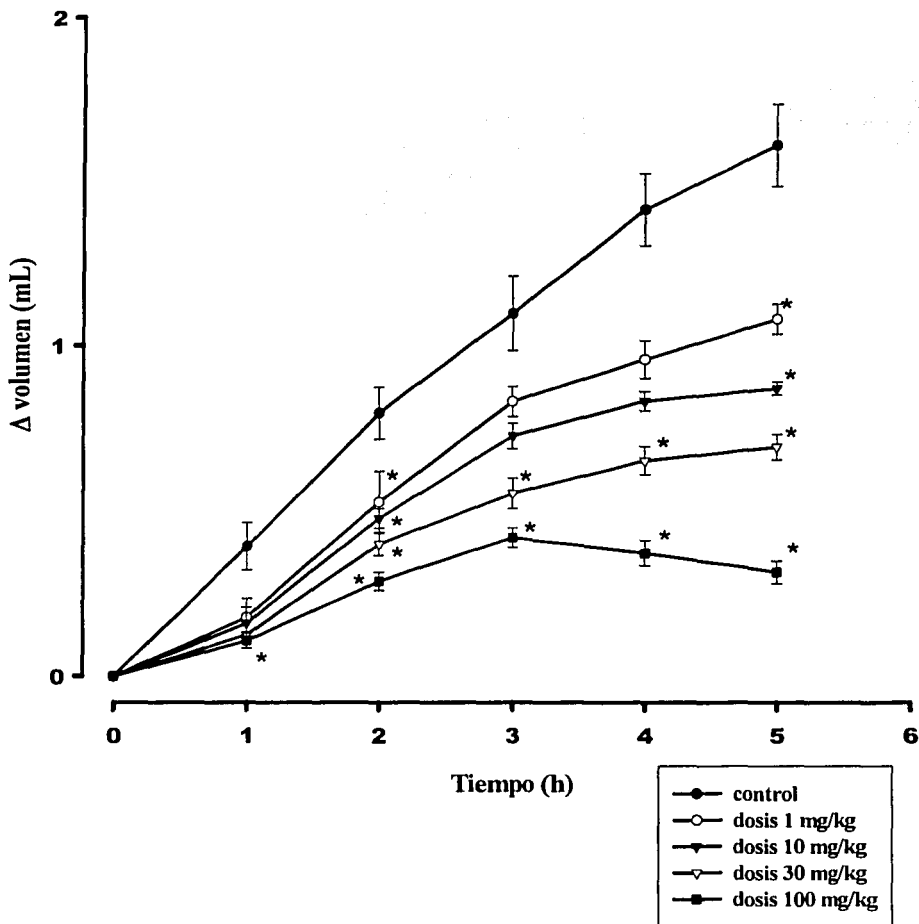
Tabla 10. Estimación de la toxicidad (DL₅₀) de la mezcla de los extractos de *Alnus acuminata* y *Phytolacca americana* administrados por vía intraperitoneal.

DOSIS INICIAL EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
10	3	0
100	3	0
1000	3	0
DOSIS PARA LA SEGUNDA ESTIMACIÓN EN mg/kg	ANIMALES VIVOS	ANIMALES MUERTOS
1600	3	0
2900	3	0
5000	3	0

11.2 Determinación del efecto antiinflamatorio de los extractos metanólicos en el modelo de inflamación inducida por carragenina.

11.2.1 Indometacina como fármaco antiinflamatorio de referencia.

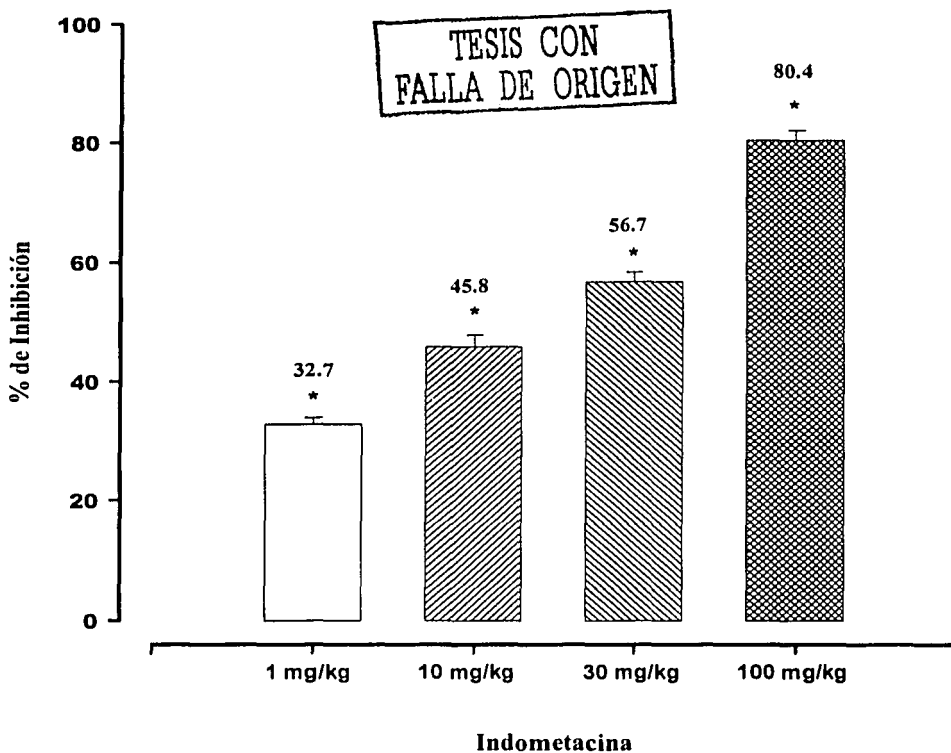
Se realizó la curva dosis-respuesta con indometacina como fármaco antiinflamatorio de referencia, en la gráfica 1 se describe el curso del edema inducido por carragenina frente al fármaco de referencia, en donde los valores obtenidos por el desplazamiento de mercurio y convertido a volumen (ml) y este posteriormente convertido a delta volumen (ΔV) para los grupos tratados con las diferentes dosis de indometacina y para el grupo control que no recibió tratamiento alguno.



GRÁFICA 1. Curva curso-temporal del efecto antiinflamatorio de indometacina en el incremento del volumen en el miembro derecho (Δ volumen) después de una inyección de carragenina intra-plantar en la pata trasera de las ratas, en el grupo control y los tratados con indometacina. Cada línea es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

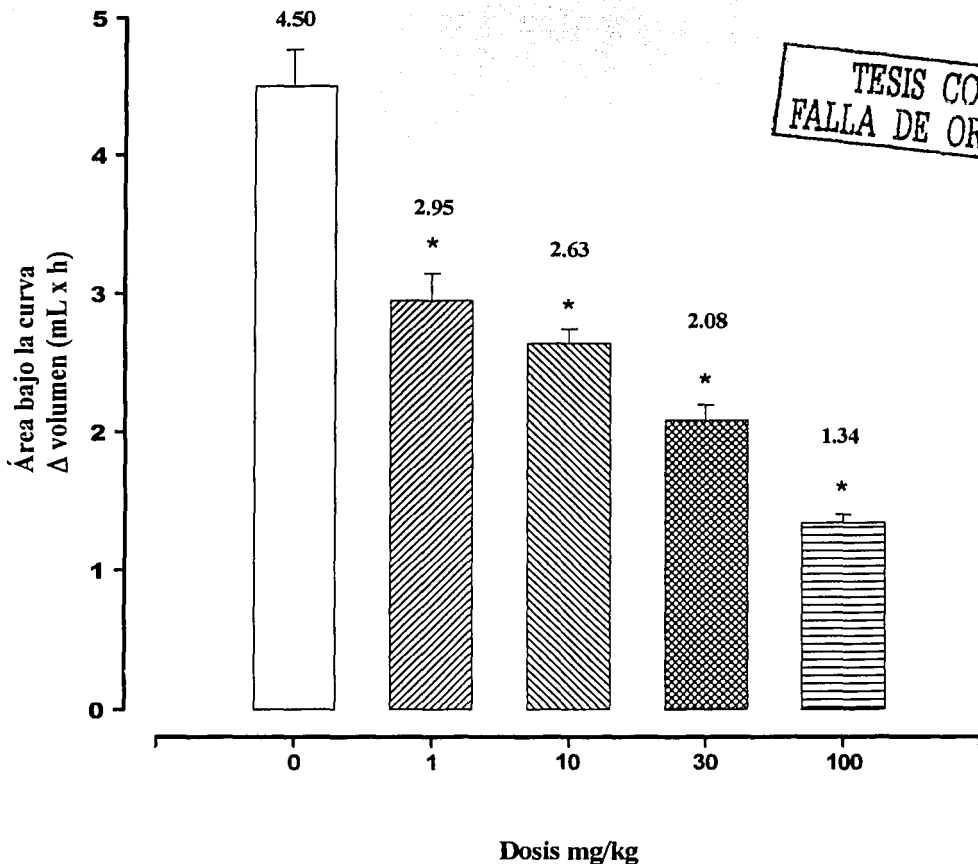
En la gráfica 2 se reporta el porciento de inhibición del edema inducido por carragenina a las 5 horas, se encontró diferencia significativa en todas las dosis probadas con respecto al control, se consideró al control como el 100 % del edema, mediante la siguiente fórmula se calculó el % de inhibición del edema (Liso *et al.*, 1996).

$$\% \text{ de inhibición de edema} = \frac{(\Delta \text{ volumen})_{\text{control}} - (\Delta \text{ volumen})_{\text{tratado}}}{(\Delta \text{ volumen})_{\text{control}}} \times 100$$



GRÁFICA 2. Porcentaje de inhibición (dosis-efecto) del edema inducido con carragenina a las 5 horas, en comparación a las diferentes dosis administradas de indometacina. Cada barra es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.

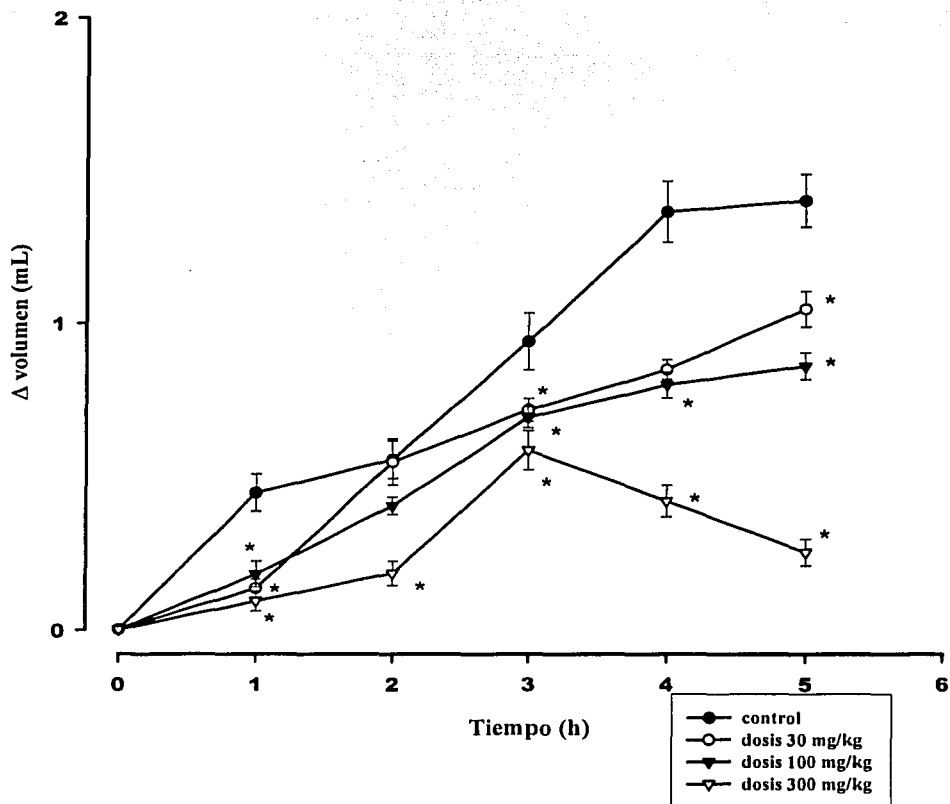
Se determinó la relación de las áreas bajo la curva (ΔV vs. t) a las diferentes dosis de indometacina (gráfica 3). Un área bajo la curva menor indica menor inflamación o mayor efecto antiinflamatorio. El efecto antiinflamatorio fue significativo desde la dosis de 1 mg/kg hasta 100 mg/kg.



GRÁFICA 3. Relación de áreas bajo la curva de la gráfica de ΔV vs. t de las diferentes dosis de indometacina administradas, se observó una relación entre la dosis y el efecto antiinflamatorio en el modelo de edema por carragenina. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

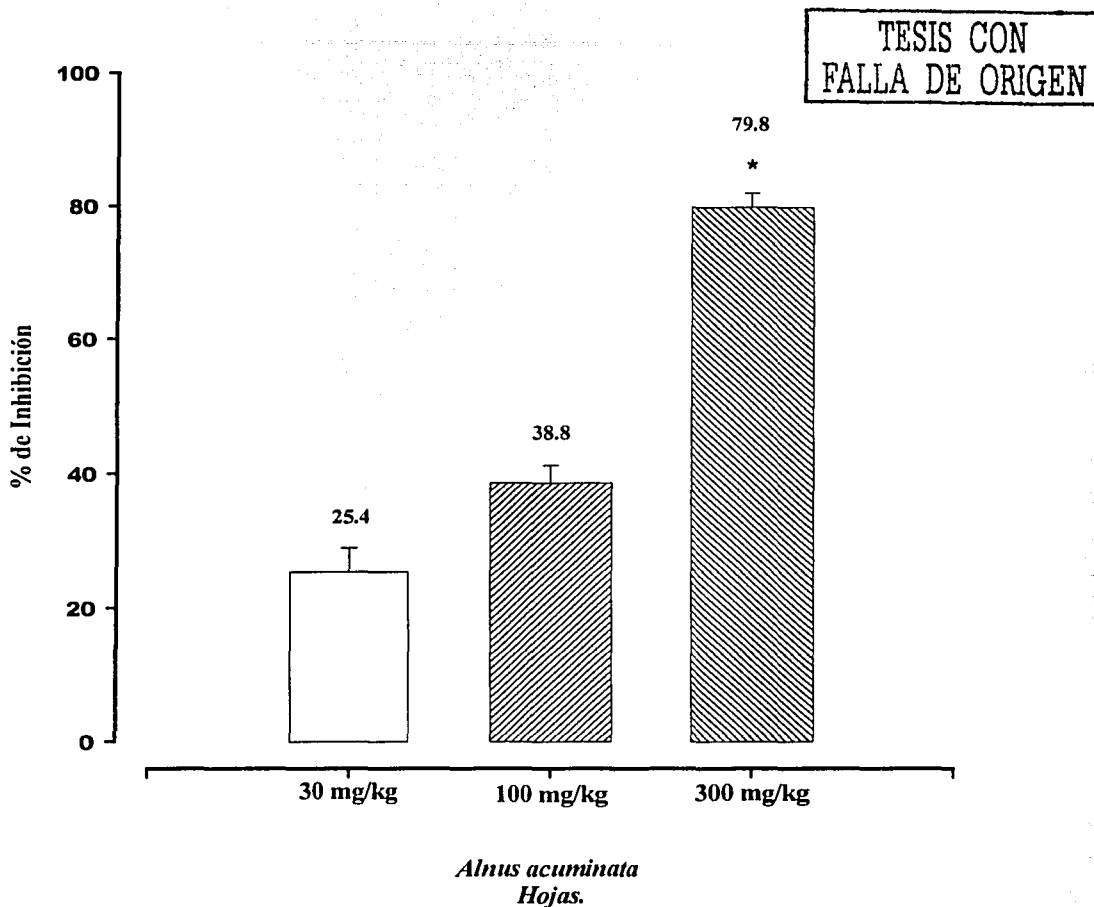
11.2.2 Actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta*.

Sé probó la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* a las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg. El grupo control recibió vehículo, en la gráfica 4 se observa el curso del edema inducido por carragenina.



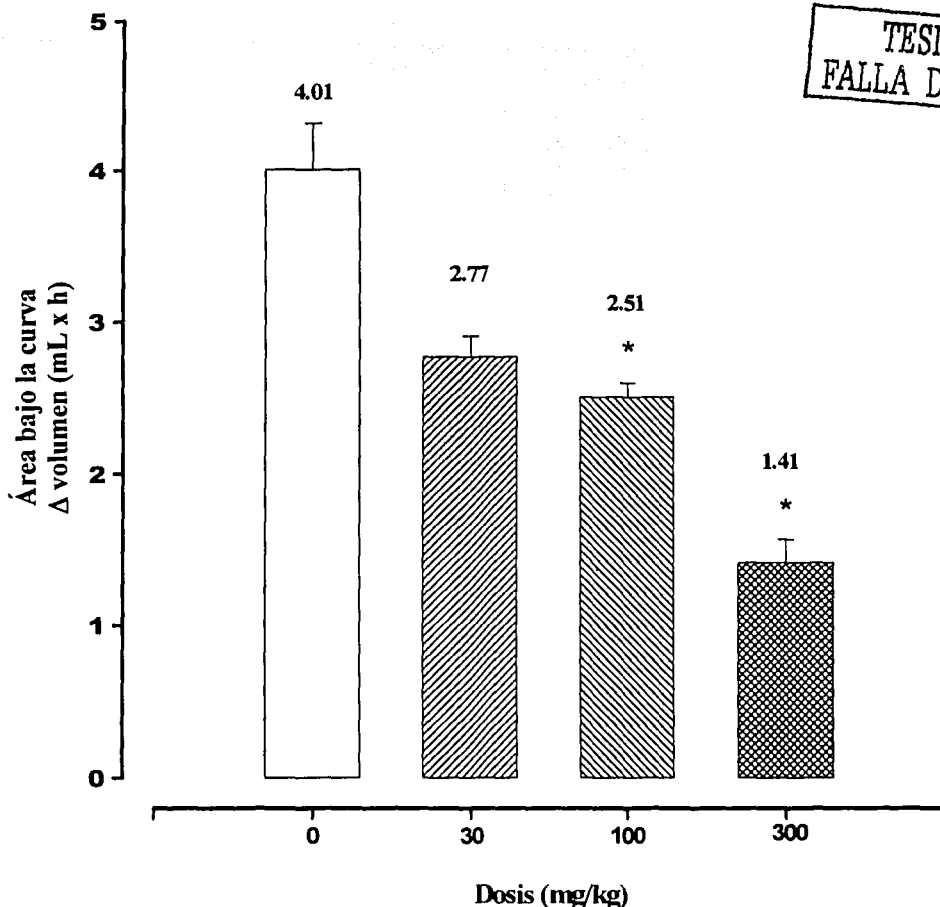
GRÁFICA 4. Curva curso-temporal del Incremento del volumen en las patas traseras de las ratas (Δ volumen) después de la inyección de carragenina intra-plantar del grupo control y los tratados con el extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata*. Cada línea representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

En la gráfica 5 se reporta el porcentaje de inhibición del edema inducido por carragenina del extracto metanólico de las hojas *Alnus acuminata*, se considero al control como el 100 % de edema. Únicamente la dosis de 300 mg/kg presentó efecto antiinflamatorio estadísticamente significativo.



GRÁFICA 5. Porcentaje de inhibición del edema inducido con carragenina a las 5 horas, del extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* administradas. Cada barra es la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.

Considerando las áreas bajo la curva (gráfica 6) a las diferentes dosis de extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* se observa que el efecto antiinflamatorio es significativo a las dosis de 100 y 300 mg/kg.

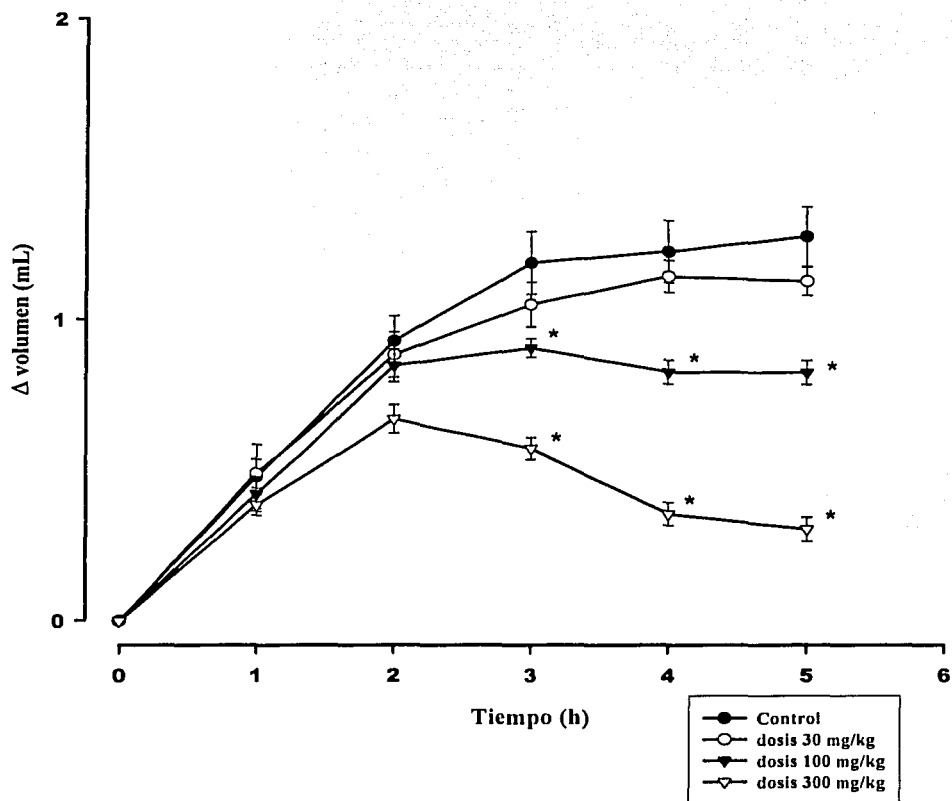


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

GRÁFICA 6. Relación de áreas bajo la curva de la gráfica de (ΔV vs. t) a las diferentes dosis del extracto metanólico administrado de las hojas de *Alnus acuminata*. De su efecto antiinflamatorio en el modelo de edema por carragenina. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.

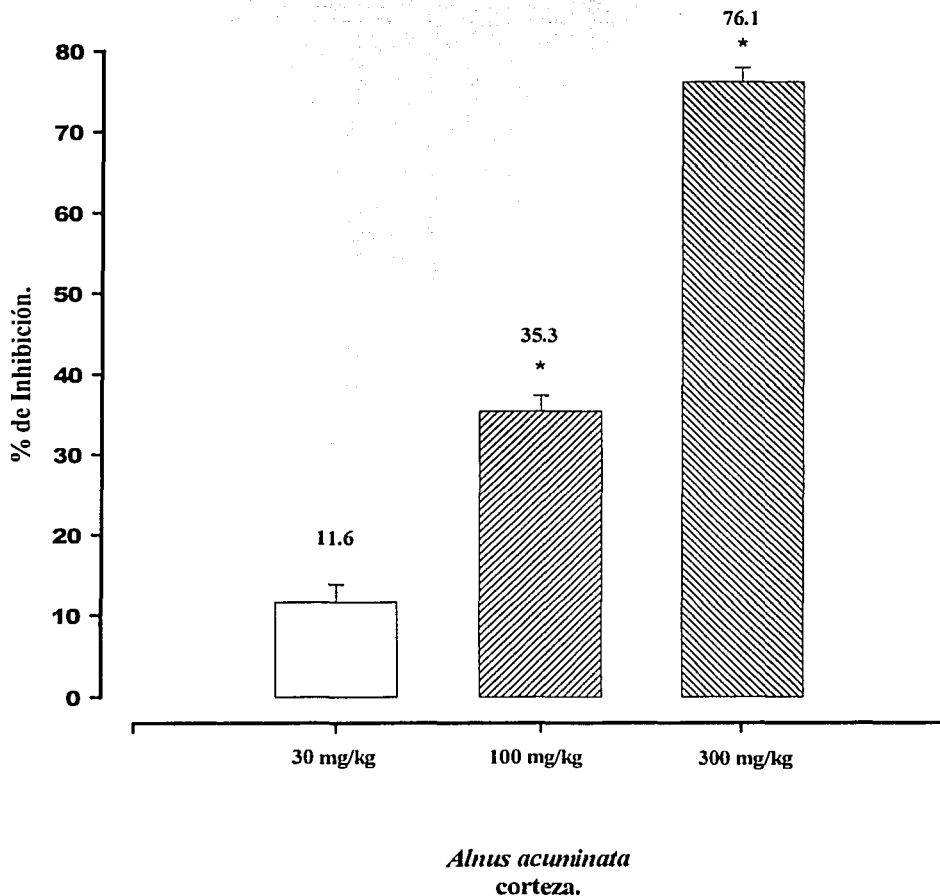
11.2.3 Actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta*.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata* a las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg, en la gráfica 7 se observa el curso del edema inducido por carragenina.



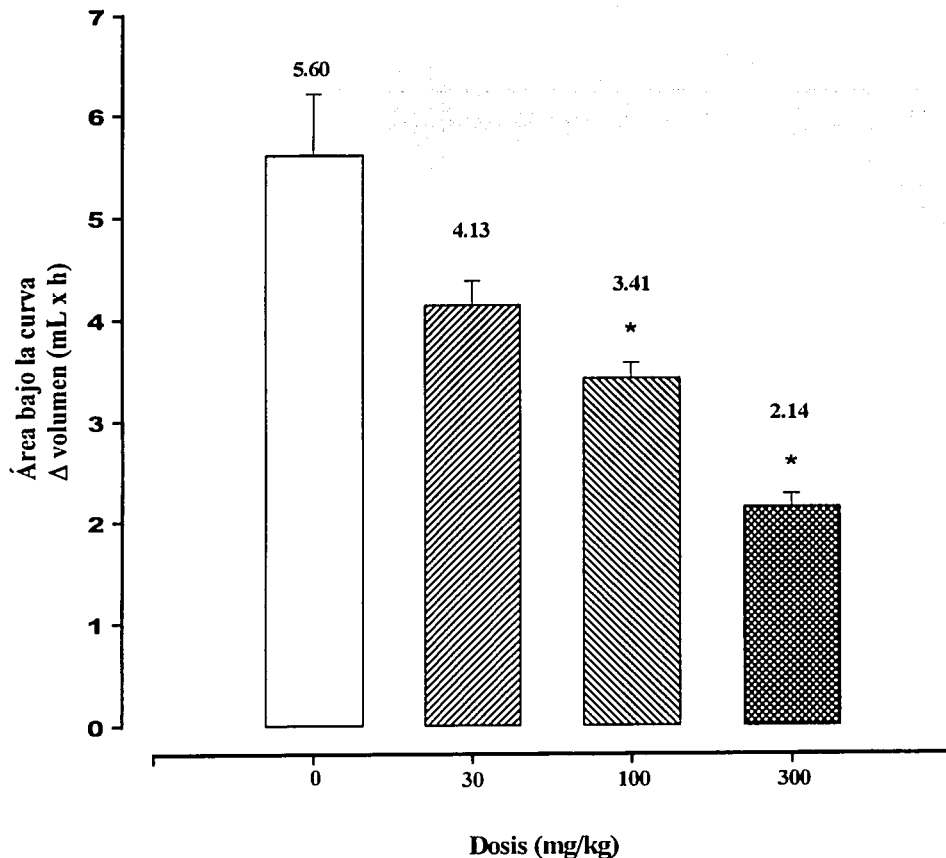
GRÁFICA 7. Curva curso-temporal del incremento del volumen en las pata trasera de las ratas (Δ volumen) después de la inyección de carragenina intra-plantar, del grupo control y los tratados con el extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata*. Cada línea representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.

En la gráfica 8 se reporta el porciento de inhibición del edema inducido por carragenina del extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata* a las 5 horas, a la dosis de 100 mg/kg presentó 35 % de inhibición de la inflamación y la dosis de 300 mg/kg presentó una inhibición del edema de 76 % y la dosis de 30 mg/kg no se observó efecto antiinflamatorio ($p > 0.05$)



GRÁFICA 8. Porcentaje de inhibición del edema inducido con carragenina a las diferentes dosis administradas del extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata*. Cada barra es la media \pm EEM de 6 animales. * $p > 0.05$ respecto al control.

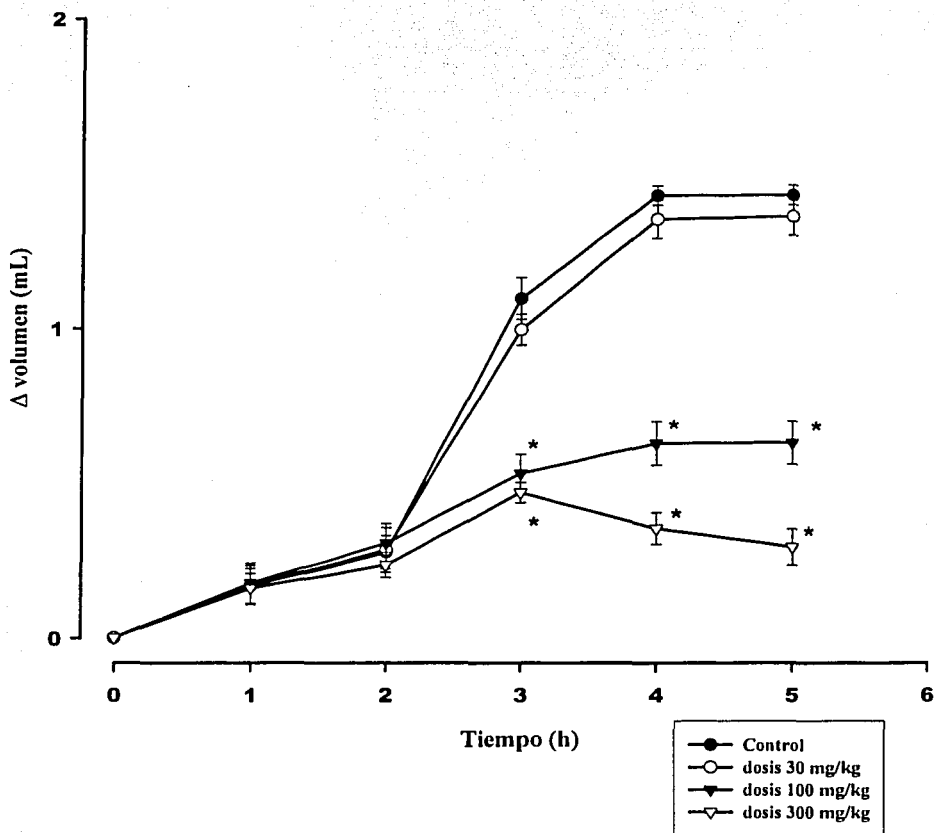
Considerando las áreas bajo la curva (gráfica 9) se encontró diferencia significativa del efecto antiinflamatorio a las dosis de 100 y 300 mg/kg.



GRÁFICA 9. Relación de las áreas bajo la curva de las diferentes dosis del extracto metanólico administrado de la corteza de *Alnus acuminata*, en el modelo de edema por carragenina. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.

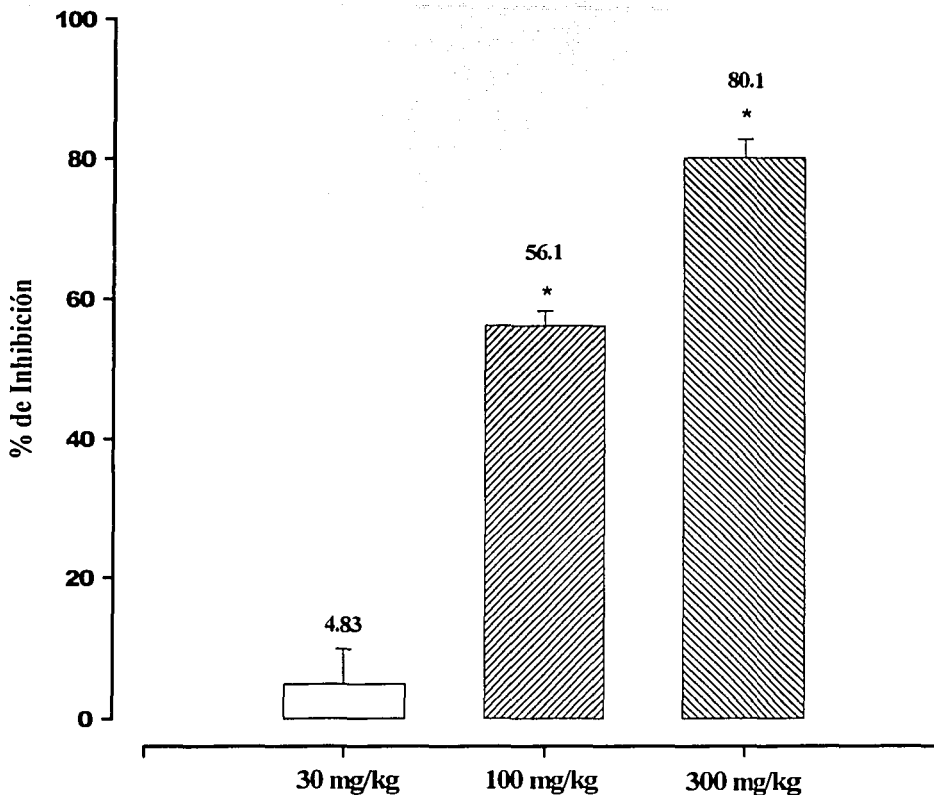
11.2.4 Actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *Phytolacca americana*.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *Phytolacca americana* a las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg, en donde el grupo control no fue tratado con el extracto, en la gráfica 10 se observa el curso del edema inducido por carragenina.



GRÁFICA 10. Curva curso-temporal del incremento del volumen en la pata trasera de las ratas (Δ volumen) después de la inyección de carragenina intra-plantar, del grupo control y los tratados con el extracto metanólico de *Phytolacca americana*. Cada línea representa la media \pm la EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ respecto al control.

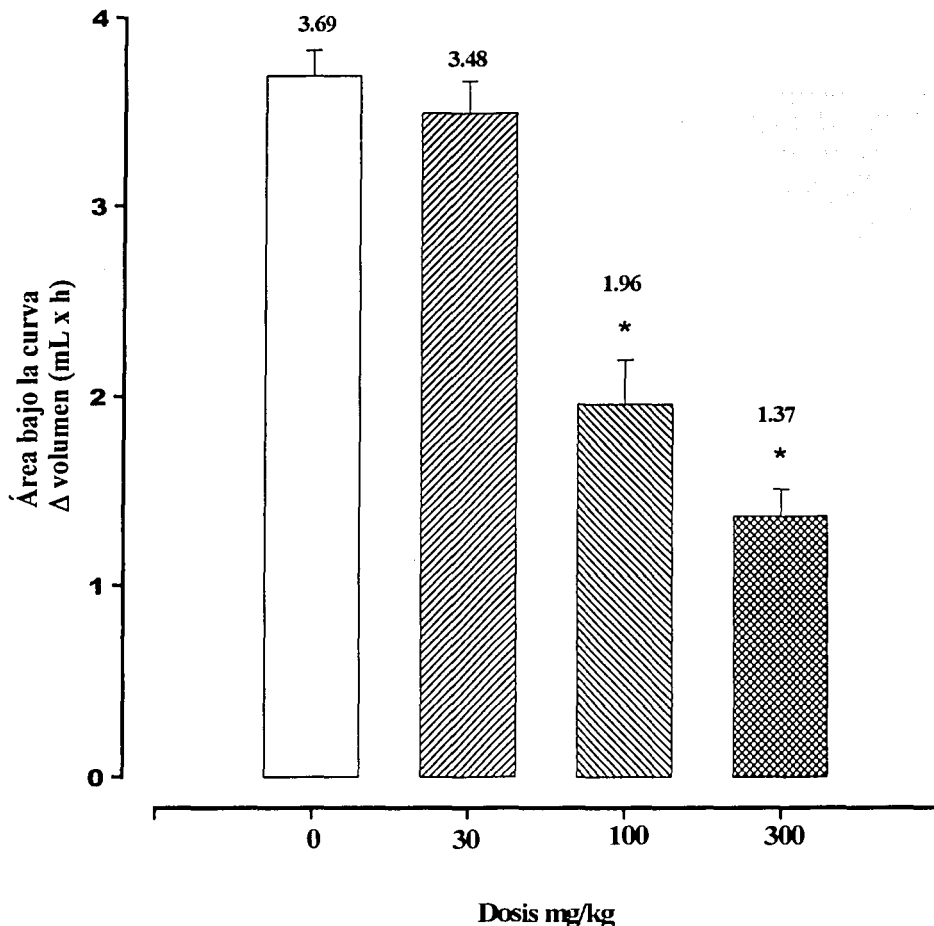
En la gráfica 11 se indica el porcentaje de inhibición del edema inducido por carragenina a las 5 horas del extracto metanólico de *Phytolacca americana*, a las dosis de 100 mg/kg presentó 56 % de inhibición de la inflamación y a dosis de 300 mg/kg presentó una inhibición de 80 % y la dosis de 30 mg/kg no presentó efecto antiinflamatorio.



Phytolacca americana.

GRÁFICA 11. Porcentaje de inhibición de edema inducido con carragenina a las 5 horas del extracto metanólico de *Phytolacca americana*. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $p < 0.05$ respecto al control.

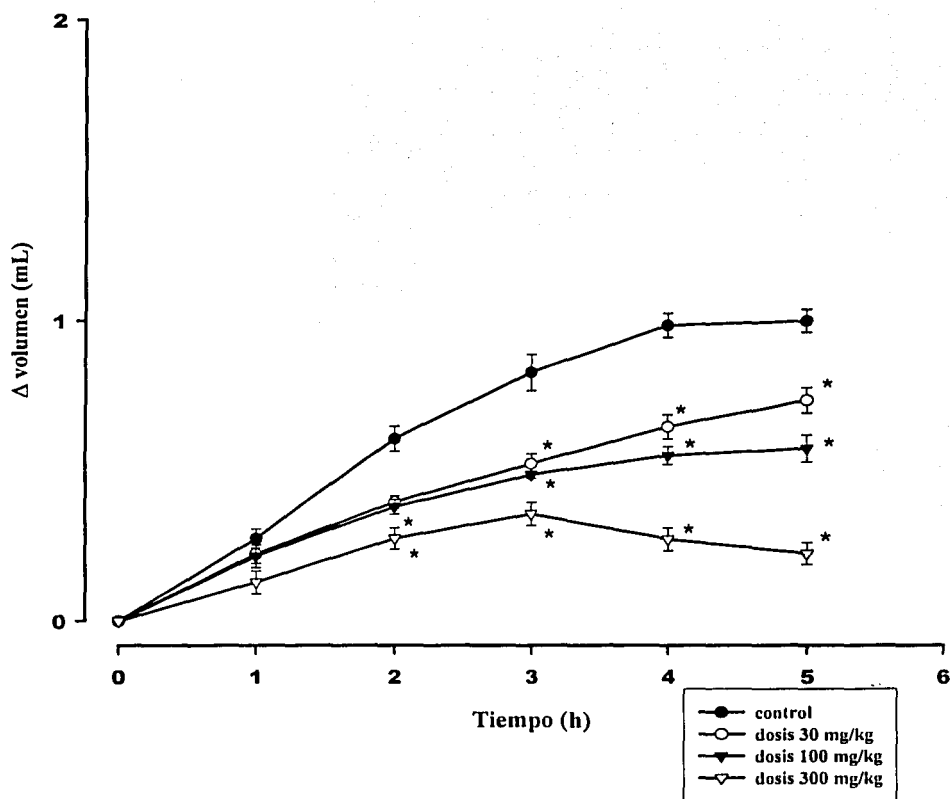
Considerando las áreas bajo la curva (gráfica 12) se encontró diferencia significativa del efecto antiinflamatorio a las dosis de 100 y 300 mg/kg.



GRÁFICA 12. Relación de áreas bajo la curva de las diferentes dosis del extracto metanólico administrado de *Phytolacca americana* en el modelo de inflamación por carragenina. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

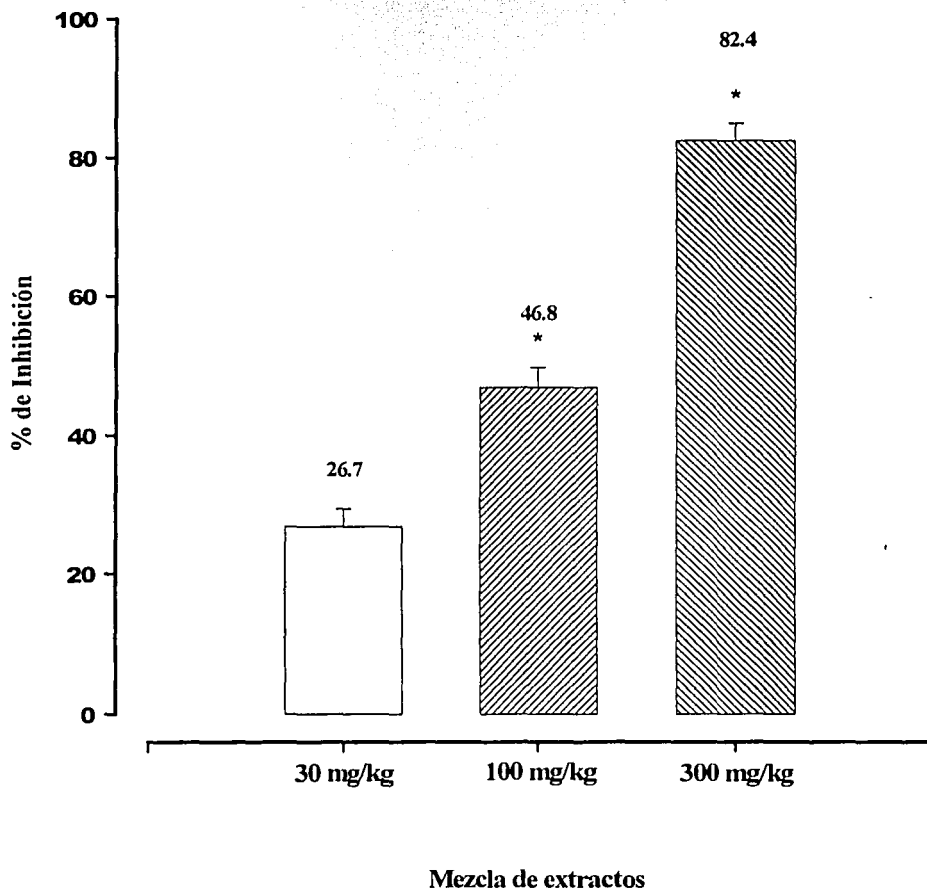
11.2.5 Actividad antiinflamatoria de la mezcla de extractos metanólicos de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta* y *Phytolacca americana*.

Se determinó la acción antiinflamatoria de la mezcla de extractos metanólicos a las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg, en la gráfica 13 se observa el curso del edema frente a la mezcla de extractos.



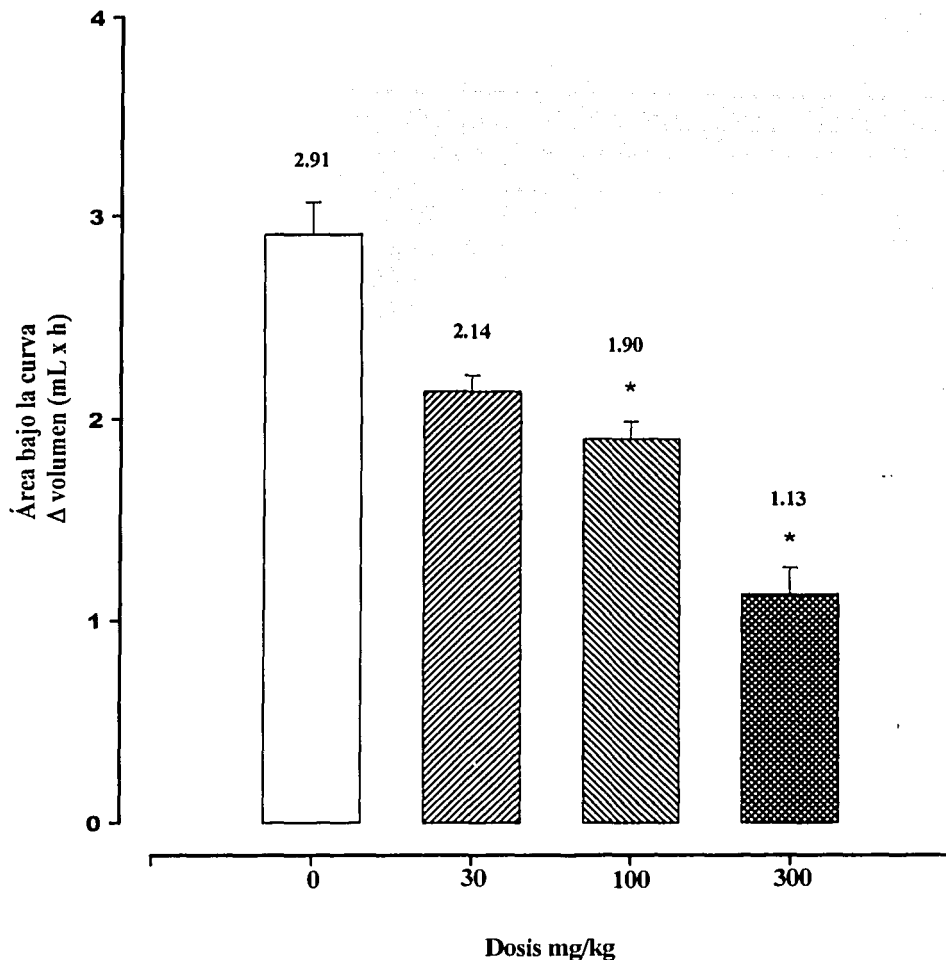
GRÁFICA 13. Curva curso-temporal del incremento del volumen en las patas traseras de las ratas (Δ volumen) después de la administración de carragenina intra-plantar, del grupo control y los tratados con la mezcla de extractos de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata*. Cada línea representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

En la gráfica 14 se observa el porcentaje de inhibición del edema inducido por carragenina por la mezcla de extractos metanólicos (*Alnus acuminata* hojas, corteza y *Phytolacca americana* (1:1:1), en donde la dosis de 100 mg/kg presenta 46 % de inhibición de la inflamación y a la dosis de 300 mg/kg una inhibición del 82 %, la dosis de 30 mg/kg no se observa un efecto significativo.



GRÁFICA 14. Porcentaje de inhibición de edema inducido con carragenina a las diferentes dosis administradas de la mezcla de extractos metanólicos. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control

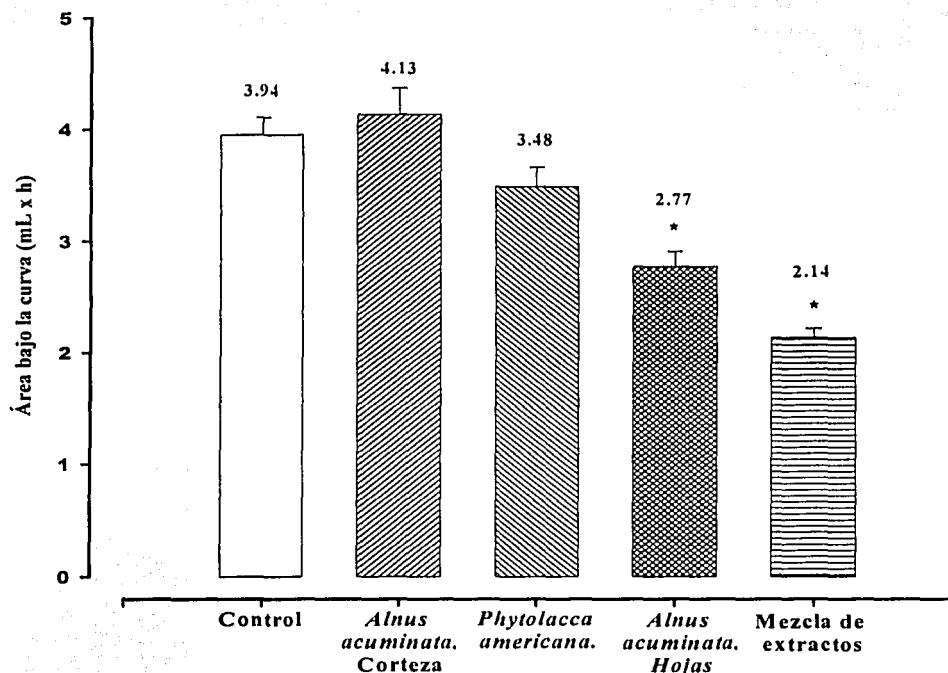
Considerando las áreas bajo la curva (grafica 15) se encontró diferencia significativa del efecto antiinflamatorio a las dosis de 100 y 300 mg/kg.



GRÁFICA 15. Relación de áreas bajo la curva de las diferentes dosis de la mezcla de extractos metanólicos, en el modelo de inflamación por carragenina. Cada barra representa la media \pm EEM de 6 animales. * $P < 0.05$ con respecto al grupo control.

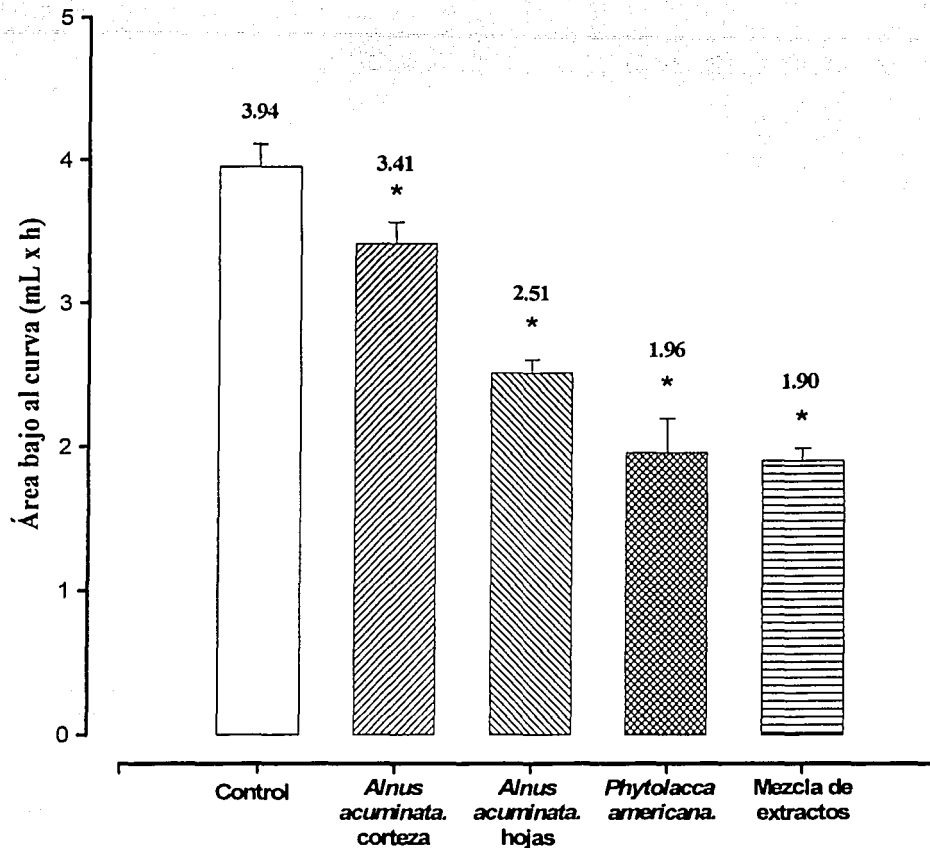
11.2.6 Determinación de sinergismo entre los extractos y la mezcla de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata* a un mismo nivel de dosis.

Se compararon las áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos así como de la mezcla de extractos (gráfica 16) a un mismo nivel de dosis (30 mg/kg). El control fue utilizado como referencia, se obtuvo un promedio de todos los controles, en donde se encontró que el extracto de *Phytolacca americana* y la mezcla de extractos presentan diferencias significativas.



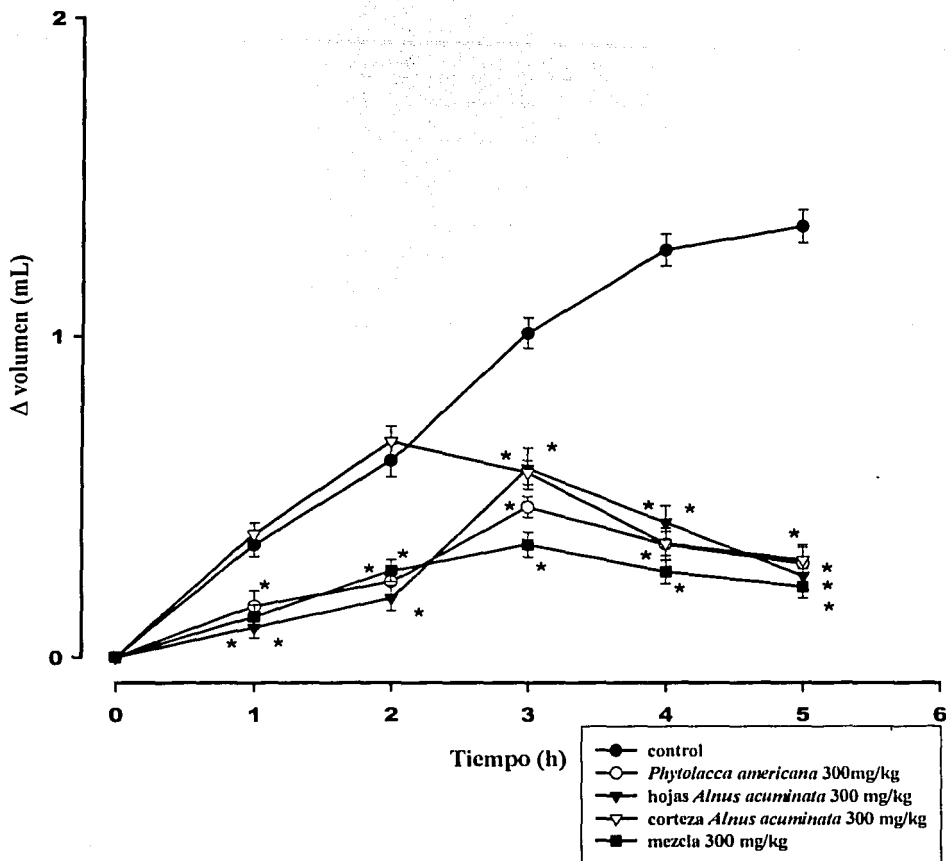
GRÁFICA 16. Comparación de áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos a un mismo nivel de dosis de 30 mg/kg, en el modelo de inflamación por carragenina. Cada barra representa la media de \pm EEM de 6 animales, el control es la media \pm EEM de 30 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

Considerando las áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos así como de la mezcla de extractos (gráfica 17) a la dosis de (100 mg/kg) se encuentra que hay una diferencia significativa en el efecto antiinflamatorio en todos los extractos evaluados.



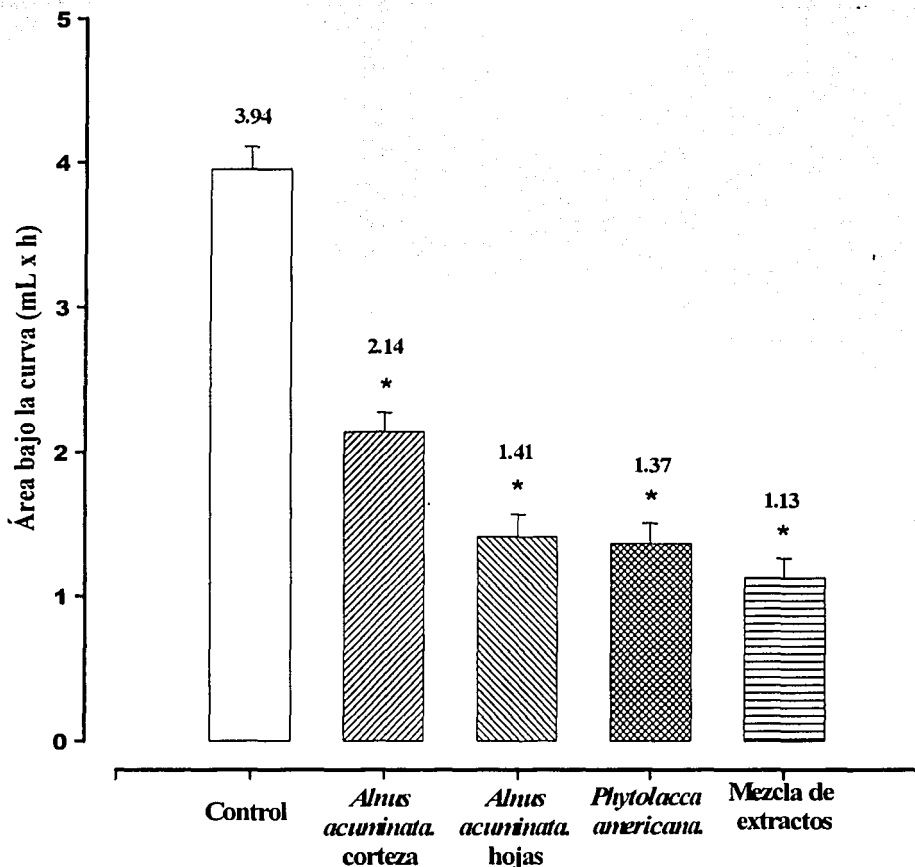
GRÁFICA 17. Comparación de áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos a un mismo nivel de dosis de 100 mg/kg, se observa la relación dosis-efecto antiinflamatorio, en el modelo de inflamación por carragenina. Cada barra representa la media de \pm EEM de 6 animales, el control es la media \pm EEM de 30 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

Se compararon todos los extractos a un mismo nivel de dosis de 300 mg/kg, se gráfico en función del delta volumen, se observa que hay un patrón similar entre los extractos y la mezcla de extractos a partir de la tercera hora.



GRÁFICA 18. Curva curso-temporal de comparación de extractos y mezcla a la dosis de 300 mg/kg, se reportó como él (Δ volumen) del curso del edema. Cada línea representa la media \pm EEM de 6 animales, el control es la media \pm EEM de 30 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

La comparación de las áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos así como de la mezcla de extractos (gráfica 19) a un mismo nivel de dosis (300 mg/kg), en donde se encuentra que todos los extractos evaluados presentaron diferencia significativa del efecto antiinflamatorio respecto al control, sin embargo entre los diferentes tratamientos no se observan diferencias.



GRÁFICA 19. Relación de áreas bajo la curva de los diferentes extractos metanólicos a un mismo nivel de dosis de 300 mg/kg, en el modelo de inflamación por carragenina. Cada barra representa la media de \pm EEM de 6 animales, el control es la media \pm EEM de 30 animales. * $P < 0.05$ con respecto al control.

Dado que el efecto antiinflamatorio resulto ser significativo para los extractos metanólicos de *P. Americana* y *A. acuminata* así como de la mezcla de ellos, se calculó la dosis efectiva media (DE_{50}) a partir del porciento de inhibición, para ello se utilizó la ecuación (1) de Hill (Tallarida, 2000):

$$\text{Log}\left(\frac{E}{E_{\max} - E}\right) = p\text{Log}D - p\text{Log}DE_{50} \quad \text{Ecuación 1}$$

donde:

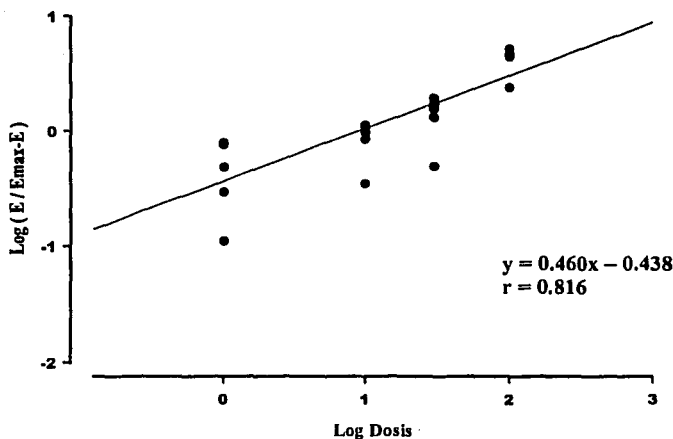
E = efecto (porciento de Inhibición)

E_{\max} = Efecto máximo.

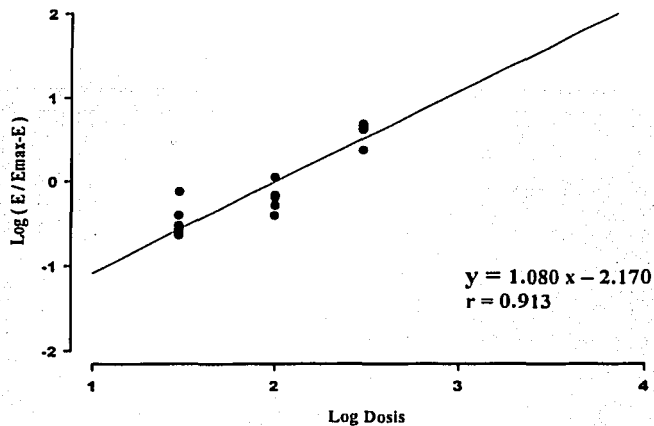
D = dosis administrada

p = Número de Hill.

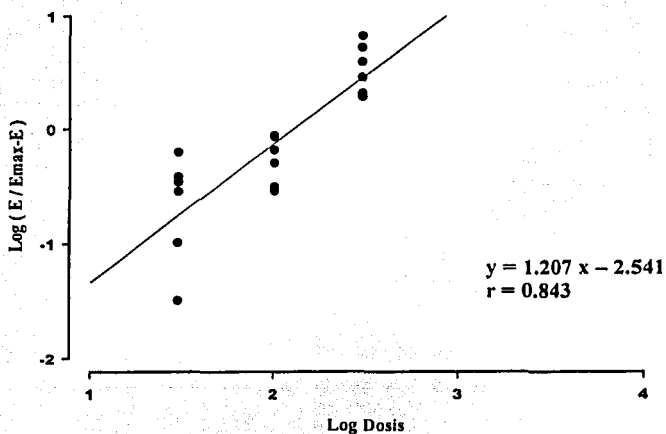
Realizando los cálculos adecuados se obtuvieron las siguientes gráficas:



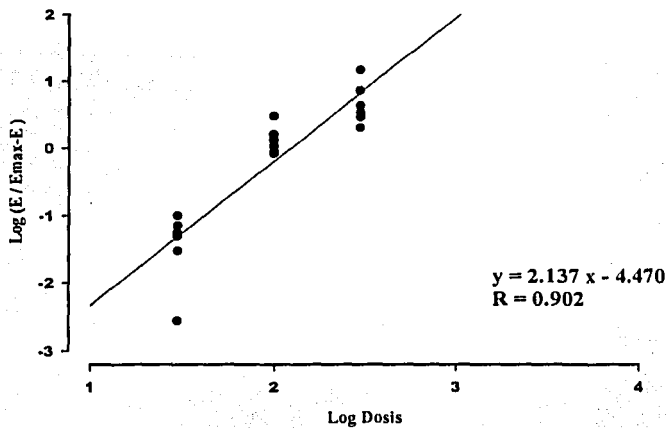
GRÁFICA 20. Grafica de Hill para indometacina.



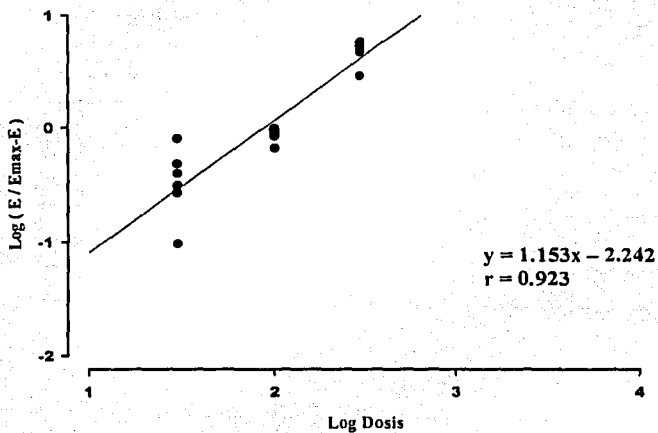
GRÁFICA 21. Gráfica de Hill para el extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata*.



GRÁFICA 22. Gráfica de Hill del extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata*.



GRÁFICA 23. Gráfica de Hill del extracto metanólico de *Phytolacca americana*.



GRÁFICA 24. Gráfica de Hill de la mezcla de extractos metanólicos.

Es importante mencionar que para el cálculo de la DE₅₀, en todos los extractos y mezcla probados, se realizó un análisis de varianza de la pendiente. En todos los casos la pendiente fue significativamente diferente de cero, por lo que se puede establecer que el efecto antiinflamatorio es dependiente de la dosis (Tallarida, 2000)

A partir de los datos de la regresión lineal de los datos de las gráficas anteriores se calculó la DE₅₀ del efecto antiinflamatorio de los extractos metanólicos así como de la mezcla. En la tabla 11 se reportan los valores obtenidos.

Tabla 11. Valores de DE₅₀ para los extractos metanólicos evaluados.

	Dosis efectiva media (DE ₅₀)	Número de Hill
Indometacina	8.95 ± 1.90 mg/kg	0.460
<i>Alnus acuminata</i> (hojas)	102.15 ± 11.53 mg/kg	1.080
<i>Alnus acuminata</i> (corteza)	127.41 ± 19.50 mg/kg	1.207
<i>Phytolacca americana</i>	123.51 ± 14.34 mg/kg	2.137
Mezcla de extractos	88.0 ± 9.57 mg/kg	1.153

Posteriormente, a partir del cálculo de las DE₅₀ y el número de Hill (p), se realizó un ajuste no lineal de los datos del porcentaje de inhibición del edema de los extractos, de la mezcla de estos, aplicado la ecuación número 2 se construyeron las gráficas 25-30.

$$E = \left(\frac{E_{\max} * 10^{(p)(\text{Log}D)}}{10^{(p)(\text{Log}D)} + DE_{50}^p} \right) \quad \text{Ecuación 2}$$

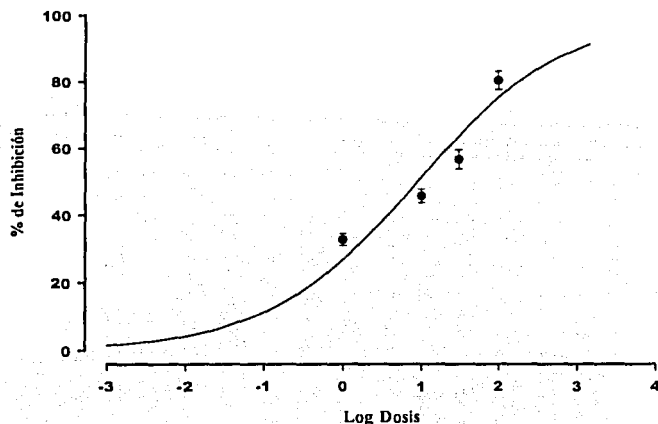
donde:

E = efecto

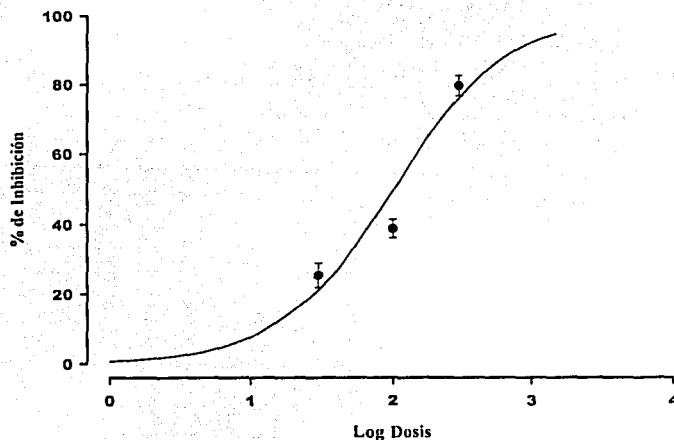
E_{max} = efecto máximo

p = número de Hill

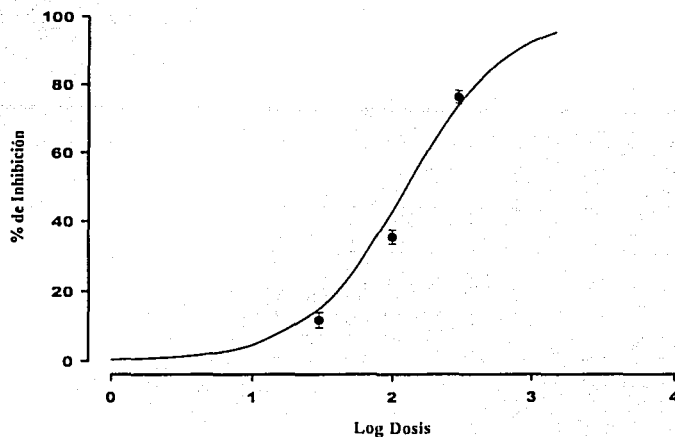
Log D = Logaritmo de la dosis.



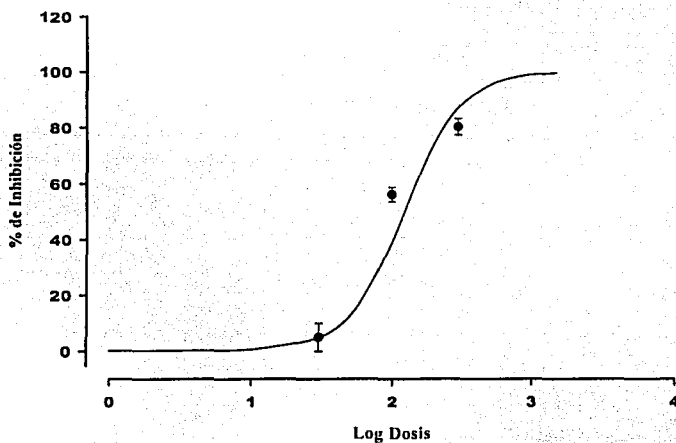
GRÁFICA 25. Curva Dosis-Respuesta Gradual para indometacina. La línea representa el ajuste no lineal y los puntos representan la media de los valores reales \pm EEM.



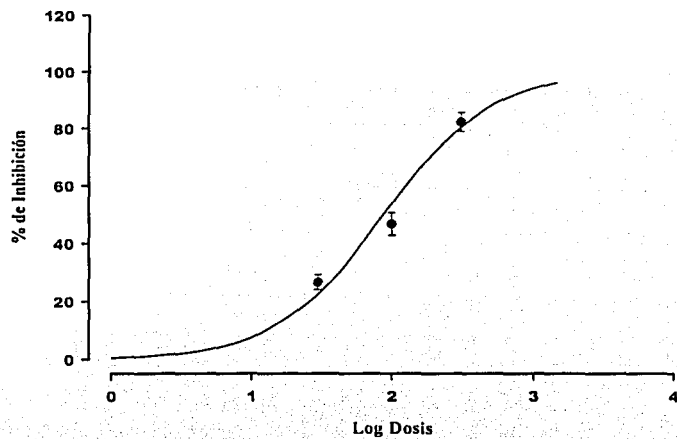
GRÁFICA 26. Curva Dosis-Respuesta Gradual para el extracto metanólico de *Alnus acuminata* (hojas). La línea representa el ajuste no lineal y los puntos representan la media de los valores reales \pm EEM.



GRÁFICA 27. Curva Dosis-Respuesta Gradual para el extracto metanólico de *Alnus acuminata* (corteza). La línea representa el ajuste no lineal y los puntos representan la media de los valores reales \pm EEM.

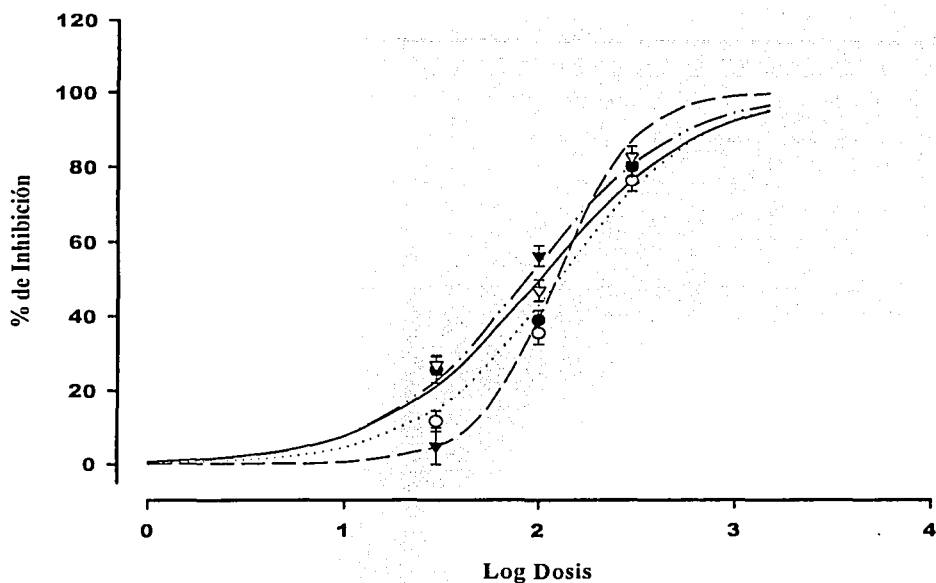


GRÁFICA 28. Curva Dosis-Respuesta Gradual para el extracto metanólico de *Phytolacca americana* (corteza). La línea representa el ajuste no lineal y los puntos representan la media de los valores reales \pm EEM.



GRÁFICA 29. Curva Dosis-Respuesta Gradual para la mezcla de extractos metanólicos. La línea representa el ajuste no lineal y los puntos representan la media de los valores reales \pm EEM.

Con base a los gráficos 25-29 se construyó la gráfica 30 donde se observa la comparación de las curvas dosis-respuesta gradual de los extractos y la mezcla de estos.



GRÁFICA 30. Curva Dosis-Respuesta Gradual para los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* (Hojas —●), *Alnus acuminata* (corteza ... ○), *Phytolacca americana* (— — ▼) y la mezcla de extractos — ··· ▽). Las líneas representan el ajuste no lineal y los puntos representan la media de los valores reales ± EEM.

XII. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.

12.1 Determinación de la toxicidad de los extractos metanólicos.

En la determinación de toxicidad de los extractos metanólicos de la corteza y hojas de *Alnus acuminata* (tablas 6 y 7) se probaron dosis de los 10 mg/kg hasta los 5000 mg/kg, en los cuales no se observó efecto tóxico aparente en el lote de animales probados, esto puede indicar que talvez el extracto de las hojas y la corteza no posean sustancias tóxicas o que estas no se encuentren en suficiente cantidad como para que produzcan efecto toxico, esto en base a que se probaron dosis elevadas desde los 1600 mg/kg hasta los 5000 mg/kg. Además de que se trató de una prueba de toxicidad aguda, se debería realizar un estudio de toxicidad crónico, para confirmar que en las hojas y corteza de *Alnus acuminata* no hay componentes que produzcan un efecto tóxico, además de que se trata de una especie vegetal que no ha sido previamente estudiada, estaría por demás realizar un estudio de la toxicidad de los extractos de hexano y de diclorometano así como el estudio fitoquímico que nos indique el tipo de sustancias que contenga esta especie vegetal, así como evaluación toxicológica de los componentes aislados en dicho estudio.

Para el extracto metanólico de *Phytolacca americana*, se observo un efecto tóxico a la dosis de 1000 mg/kg, se procedió al segundo intervalo de dosis, el efecto tóxico se presentó entre las dosis de 225 y 600 mg/kg, el valor de DL50 obtenido por la técnica ya descrita anteriormente fue de 368.28 mg/kg, un valor de consideración en cuanto a toxicidad, este efecto puede deberse a las saponinas presentes en el extracto, según Duke, (1992) la toxicidad de *Phytolacca americana* es producida por varias saponinas entre ellas el ácido fitolaccagénico, fitolacatoxina y a la fitolacagenina, las cuales pudieran estar presentes en este extracto, además la información que se conoce de esta planta⁴, indica que su DL₅₀ es de 258.20 mg/kg, el valor obtenido experimentalmente es ligeramente mayor al reportado Duke, (2000), esto puede ser debido a la variabilidad de la planta, ya que la DL₅₀ reportada es para plantas cultivadas en Norteamérica, la especie estudiada en este proyecto es de origen selvático (Sureste de México), por lo que las condiciones del clima y del suelo, pueden influir en la cantidad de sustancias tóxicas presentes en esta planta.

⁴ Información recabada del boletín emitido por The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products (Veterinary Medicines Evaluation Unit). April 1999 www.eudra.org/emea.html

Con la mezcla de los extractos de *Alnus acuminata* (hojas 8 g y corteza 8 g) y *Phytolacca americana* (7 g), no se observó efecto tóxico (tabla 9), esto indica que la mezcla no es tóxica aparentemente, pero al igual que en los extractos de *Alnus acuminata* faltaría realizar un estudio de toxicidad crónica para poder confirmar que la mezcla no es tóxica, una posible forma de observar esta falta aparente de toxicidad, sería por la proporción de extractos contenidos en la mezcla (1:2) en relación a *Phytolacca americana*, siendo que los componentes tóxicos de *P. americana* se pudieran "diluir" en la mezcla eliminando la posible toxicidad. Otra posible causa de aparente falta de toxicidad en la mezcla de los extractos, sería una interacción de tipo químico entre los componentes de cada especie vegetal, por consiguiente las sustancias que son tóxicas en *Phytolacca americana* se neutralizarían o formarían otros compuestos que no son tóxicos, (es importante mencionar que durante la preparación de los extractos metanólicos, se realizaron placas de CCF en donde se trato de observa si existía una posible interacción química entre componentes de la mezcla, pero no fue posible observarlo ya que en la mezcla se aprecia una cantidad considerable de pigmentos, otra observación es que cuando se mezclaba el extracto de *Phytolacca americana* con agua para su disolución y posterior administración por vía oral en los animales de prueba, había la formación de espuma abundante (esto es debido a las saponinas que contiene esta planta) pero la mezcla de extractos al contacto con el agua no formó espuma lo que puede interpretarse como la presencia de una interacción química entre los componentes de la mezcla.

Por el momento no se dispone de un método experimental que pueda demostrar y explicar este fenómeno de aparente ausencia de toxicidad en la mezcla de extractos.

12.2 Determinación del efecto antiinflamatorio en el modelo de inflamación inducida por carragenina y la DE₅₀.

Para la indometacina se observó una actividad antiinflamatoria, bastante marcada a las dosis de 1, 10, 30 y 100 mg/kg, presentando mayor actividad a las dosis de 30 y 100 mg/kg ($P < 0.05$), cabe señalar que el análisis estadístico fue efectuado por cada hora y cada punto de la gráfica 1. En la gráfica 2, donde todas las dosis evaluadas presentaron una diferencia significativa con respecto al control, siendo las dosis de 10, 30 y 100 mg/kg las que mayor actividad antiinflamatoria presentaron. La dosis de 1 mg/kg también presentó actividad pero a menor proporción que el resto de las demás dosis, Amann y Schuligoi, (2000) indican que la indometacina a una dosis de 5 a 10 mg/kg puede inhibir el edema por carragenina hasta en un 55% en un modelo de edema agudo, pero la carragenina utilizada, en este estudio fue de tipo IV la cual, causa un edema crónico y persistente (Mañes *et al.*, 1999) por ello sólo se observó mayor actividad a dosis de 30 y 100 mg/kg, en la dosis de 10 mg/kg esta se situó en el 45% de inhibición, dicho valor esta próximo a lo reportado en la literatura (Van Arman *et al.*, 1965).

En la gráfica 3 se determinó la relación de las áreas bajo la curva de las diferentes dosis de indometacina en donde se observó claramente una relación dosis-respuesta teniendo efecto máximo en la dosis de 100 mg/kg, además todas las dosis presentaron diferencias significativas a una $p < 0.05$.

La valoración farmacológica del extracto metanólico de las hojas de *Alnus acuminata* (gráficas 4, 5 y 6) indicaron que posee actividad antiinflamatoria significativa con respecto al grupo control. Siendo las dosis de 100 y 300 mg/kg las que presentaron un porcentaje de inhibición de edema del 38.8 y 79.8 % respectivamente. Las áreas bajo la curva indicaron que igualmente a 100 y 300 mg/kg tienen áreas menores indicando que poseen actividad antiinflamatoria significativa. En cuanto la gráfica 4 se observó claramente como la dosis de 300 mg/kg del extracto metanólico disminuye el edema de una manera significativa.

Igualmente para el extracto metanólico de la corteza de *Alnus acuminata* (gráficas 7, 8 y 9). En la gráfica 7 se observó el curso-temporal en donde igual al extracto de las hojas, las dosis de 100 y 300 disminuyen de manera significativa el edema. En cuanto al porcentaje de inhibición (gráfica 8) y las áreas bajo la curva (gráfica 9) se observó un 76 % de inhibición de edema así como un área menor en la dosis de 300 mg/kg respectivamente.

Para *Phytolacca americana* (gráficas 10, 11 y 12) se encontró una clara diferencia entre la dosis de 30, 100 y 300 mg/kg, siendo estas dos últimas dosis las de mayor efecto antiinflamatorio (gráfica 11) con 56.1 y 80.1 % de inhibición del edema.

En el caso de la mezcla de extractos metanólicos (gráficas 13, 14 y 15) se identificó claramente que a las dosis de 30, 100 y 300 mg/kg poseen actividad antiinflamatoria elevada, siendo las dosis de 100 y 300 las que mayor efecto significativo poseen.

Para identificar la forma de acción de la mezcla de extractos, estos se graficaron en base a sus áreas bajo la curva, en niveles de dosis iguales es decir 30, 100 y 300 mg/kg (gráficas 16, 17 y 19) respectivamente. Siendo *Phytolacca americana* y la mezcla de extractos las que mayor actividad antiinflamatoria poseen, además sus áreas bajo la curva de estos dos extractos son las menores, seguidas a excepción de la gráfica 16 siendo las hojas de *A. acuminata* las que presentaron una actividad mayor a la dosis de 30 mg/kg, seguida por la corteza de *Alnus acuminata* respectivamente. En la gráfica 18 se comparó en forma de curso-temporal en donde la mezcla de extractos presentó la mayor actividad tiene seguida de *P. americana*, las hojas y por último la corteza de *Alnus acuminata*, en esta gráfica de curso-temporal se pudo apreciar que la actividad antiinflamatoria se hizo apreciable desde la tercera hora de haber iniciado el experimento, y al parecer *P. americana* es la que define el patrón de actividad antiinflamatoria en la mezcla de extractos, ya que las líneas de la gráfica de *P. americana* y la mezcla de extractos tienen una forma muy similar.

Para poder definir si se trata de un sinergismo o sumación de efectos se calculó su DE_{50} mediante el método de Hill (Tallarida, 2000) gráficas 20-24. Los datos obtenidos se presentan en la tabla 11. La indometacina con 8.95 mg/kg produce la DE_{50} , un valor que

esta próximo al descrito en la literatura (5 a 10 mg/kg), el cual puede producir una inhibición de edema de hasta un 55% (Dawson, 1987).

Los gráficos 25-29 muestran los ajustes no lineales de los datos obtenidos, en ellos se observó que los datos se ajustan a la curva teórica, sin embargo es necesario evaluar más dosis (dos dosis adicionales a las probadas para tener un mínimo de cinco dosis), con el fin de tener una estimación de la DE_{50} mas confiable y con menos error de estimación.

En la gráfica 30 se obtuvo el ajuste no lineal de los datos de porcentaje de inhibición esperándose encontrar que si se trató de un sinergismo, la sigmoidea de la mezcla de extractos estaría desplazada hacia la izquierda de la gráfica (hacia el origen) y si fuera un antagonismo estaría desplazada a la derecha, pero la sigmoidea de la mezcla de extractos esta en medio, junto con los extractos solos, según Tallarida, (2000) se trata una sumación de efectos, por lo observado en la gráfica 30, se puede considerar como una sumación de efectos, y considerar que los extractos que integran la mezcla tienen actividad antiinflamatoria por separado. Es importante señalar que sólo se trabajaron 3 dosis, por lo que el error al estimar la DE_{50} puede ser considerable, por lo que se recomienda trabajar con otras dosis complementarias a las usadas en este estudio.

Para poder confirmar esta suposición se tendría que realizar el análisis por isobogramas (Tallarida, 2000), entre los extractos solos y la mezcla. Sin embargo se presenta una restricción. Los isobogramas son modelos aplicables a mezclas binarias, en este caso se trata de una mezcla terciaria por lo que no es posible aplicarlo correctamente para esta mezcla de extractos.

XIII. CONCLUSIONES.

1. Los extractos metanólicos de hojas y corteza de *Alnus acuminata* y de tallos y hojas de *Phytolacca americana* presentan actividad antiinflamatoria significativa en el modelo de edema (edema crónico) inducido por carragenina en rata Wistar.
2. La actividad antiinflamatoria de la mezcla de extractos es debida a una sumación de la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólicos de *Phytolacca americana* y *Alnus acuminata*.
3. El extracto metanólico de *Alnus acuminata*, no fue tóxico, hasta la dosis dosis de 5 g/kg i.p. en ratón, en tanto el extracto metanólico de *Phytolacca americana* presentó una DL₅₀ de 368.28 mg/kg.
4. El presente trabajo constituye el primer estudio farmacológico de *Alnus acuminata* Subsp. *arguta*.

XIV. PROPUESTAS Y / O RECOMENDACIONES.

- a) Se propone realizar un estudio biodirigido de los extractos metanólicos de *Alnus acuminata* y *Phytolacca americana*. Con el fin de aislar e identificar a los metabolitos secundarios responsables de la actividad antiinflamatoria de dichas especies vegetales.
- b) Se recomienda realizar el estudio fitoquímico de *Alnus acuminata* con el fin de establecer la composición química de esta especie, ya que en la literatura no se tiene reportado composición química ni actividad biológica para dicha especie.
- c) Se propone realizar el estudio antiinflamatorio de los extractos hexano y de diclorometano de *Alnus acuminata* y para comprobar si poseen actividad biológica.
- d) Se propone realizar experimentos con los extractos solos, así como con la mezcla de ellos a diferentes dosis que las empleadas en este trabajo para complementar la gráfica de curva dosis-respuesta con el fin de poder determinar con mayor exactitud la DE_{50} de los extractos vegetales.
- e) Comparar contra otros fármacos antiinflamatorios (AINE's y corticosteroides) con el fin de determinar que tan eficientes son los extractos vegetales así como la mezcla de ellos frente al modelo de edema por carragenina.

XV. BIBLIOGRAFÍA.

Amann R., Schuligoi, R. (2000); Inhibition of Carrageenan-Induced edema by Indomethacin or Sodium Salicylate Does Not Prevent the Increase of Nerve Growth Factor in the Rat Hind Paw, *Neuroscience Letters*, **278**, 173-176.

Assefa H., Nimrod A., Walker L., Sindelar R. (1999); Synthesis and Evaluation of Potential Complement Inhibitory Semisynthetic Analogs of Oleanolic Acid, *Bioorganic & Medic Chemistry Letters*, **9**, 1889-1894.

Atsufumi K., Fukuzumi Y., Fukushima Y & Tagaki H., (1992); Antinociceptive Effect of L-arginine on the Carrageenan-Induced Hyperalgesia of the Rat: Possible Involvement of Central Opioidergic Systems, *European Journal of Pharmacology*, **218**, 151-158.

Bianchi K, S., Wiedhopf R., Cole J.R. (1973); Antitumor Agents From *Alnus oregona*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **62**(1), 139-140.

Boughton-Smith N. K., Deakin, A. M., Follenfant, R. L., Whittle, B. J. R. & Garland L. G. (1993); Role of Oxygen Radicals and Arachidonic acid Metabolites in the Reverse Passive Arthus Reaction and Carrageenin Paw Oedema in the Rat, *British Journal of Pharmacology*, **110**, 869-902.

Bruenton J. (1988); *Elementos de Fitoquímica y Farmacognosia*. Editorial Acribia, España, 121- 325.

Bylka W. (2001); Flavonoids and Free Phenolic Acids from *Phytolacca americana* L. leaves. *Acta Polonica Pharmaceutica*, **58**(1), 69-72.

Cano y Cano, J., Marroquín S. J. (1994); *Taxonomía de Plantas Superiores*, Editorial Trillas, México D.F, 187-190.

Chen J., Gonzales-Laredo R., Karchesy J. J. (2000); Minor Diarylheptanoid Glycosides of *Alnus rubra* Bark, *Phytochemistry*, **53**, 971-973.

Chen S., Kang S. J., Kang W. H., Mark Co. L. and Hsiung L K. (1998); Anti-AIDS Agents 32. Synthesis and Anti-HIV Activity of Betulin Derivatives, *Bioorganic & Medic Chemistry Letters*, **8**, 1267-1272.

Clark W. G., Johnson A. (1997); *Farmacología Médica*. 13th edición, Editorial Mosby, España , 156-158.

Crunkhorn P., Meacock S. C. R. (1971); Mediators of the Inflammation Induced in the Rat Paw by Carrageenin, *British Journal of Pharmacology* **42**, 392-402.

D' Cruz J. O., Uckun M. F. (2001); Pokeweed Antiviral Protein: a Potential Nonspermicidal Prophylactic Antiviral Agent, *Fertility and Sterility*, **75**(1), 106-114.

Dawson W. (1987); Theories of Mechanism of action of anti-inflammatory compounds. In Williamson WRN, editor: *anti-inflammatory compounds*, New York, Marcel Dekker, 109-119.

De las Heras B., Slowing K., Benedic J., Carretero E., Ortega T., Toledo C., Bermejo P., Iglesias I., Abad M. J., Gómez-Serranillos P., Liso P.A., Villar A., Chiriboga X. (1998); Antiinflammatory and Antioxidant Activity of Plants Used in traditional Medicine in Ecuador, *Journal of Ethnopharmacology*, **61**, 161-166.

Demirci, B., Can-Baser H. (2000); Betulenols From Betula Species, *Planta Medica*, **66**, 490-493.

Desvoyes, B., Poyet J. L., Schlick J. L., Adami P., Jouvenot M., Dulieu P. (1997); Identification of a Biological Inactive Complex form of Pokeweed Antiviral Protein, *FEBS Letters*, **410**, 303-308.

Di Rosa M., Sorrentino L. (1968); The Mechanism of the Inflammatory Effect of Carrageenin, *Journal of Pharmacology*, **4**, 340-342.

Duke A. J. (2000); HandBook of Medicinal Herbs, CRC Press Inc. Boca Raton Florida USA, 145-148.

Duke A. J. (1992); Handbook of Phytochemical Constituents of GRAS Herbs and Other Economic Plants. Boca Raton, Florida. CRC Press, 123-456

Evans T. (1985); Farmacognosia, Editorial Interamericana-McGraw-Hill, Barcelona España, 179-180.

Fernández P. C. J. (1994); Plantas Medicinales (400 recetas para 600 Enfermedades), Ediciones Omega Barcelona, España 61-62.

Galgon T., Höke D. and Dräger B. (1999); Identification and Quantification of Betulinic Acid, *Phytochemical Analysis*, **10**, 187-190.

Hanawa F., Shiro M., Yoshioki H. (1997); Heartwood Constituents of *Betula maximowicziana*. *Phytochemistry*, **45**(3), 589-595.

Harbone B. (1985); *Dictionary of Organic Compounds*. 5th edition, Marcel Dekker, New York, 276-320.

Henderson W. (1998); Drug Development Animal Studies Examine Pokeweed For All, *Cancer Weekly Plus*, **Dec 7**, pNA

Henderson W. (1999); Pokeweed Antiviral Protein Shows Promise: Pokeweed antiviral protein (PAP), a natural product isolated from the pokeweed plant, shows great potential as a new anti-HIV drug, *AIDS Weekly*, **Dec 27**, pNA.

Hostettmann K. and Wolfender, J. L. (1997); The search for biologically Active Secondary Metabolites, *Pesticide Science*, **51**, 471-482.

Huguet A., Recio M., Mafies S., Giner R., Ríos J. (2000); Effect of Triterpenoids on the inflammation induced by protein Kinase C activators, Neuronally Acting Irritants and Other agents, *European Journal of Pharmacology*, **410**, 69-81.

Jean J., Byung-Chai, H., Young-Park S. and Darrick S. (1999); Preparation of Amino Acid Conjugates of Betulinic Acid With Activity Against Human Melanoma, *Bioorganic & Medic Chemistry Letters*, **9**, 1201-1204.

Jeon-Jin Y., Lee S., Jeong-Gwang, H. (1999); Induction of Inducible Nitric Oxide Synthase Gene Expression by Pokeweed Mitogen, *Chemico-Biological Interactions*, **118**, 113-125.

Ju-Chou K., Chang F. H., Min C., Shiung-Cheng J., Chung L., Ling T., Yui T., Ren-Jan C. (2000); Effect of Betulinic Acid on Intracellular (Free Ca²⁺) Levels in Madin Darby Canine Kidney Cells, *European Journal of Pharmacology*, **408**, 99-106.

Kaneda M., Arima K., Yonezawa H. and Uchikoba T. (1994); Purification and Properties of a Protease from the Sarcocarp of Bead tree Fruit, *Phytochemistry*, **35**(6), 1395-1398.

Kaneda M., Izumi S. F., Toyoko U. T. and Tominaga N. (1988); Isolation and Characterization of a Protease from *Phytolacca americana*. *Phytochemistry*, **27**(11), 3661-3662.

Kaneda M., Nagatome S. and Uchikoba T. (1988); Comparasion of Phytolacain R, a Cysteine Protease From *Phytolacca americana* With Papain, *Phytochemistry*, **39**(5), 997-999.

Keinänen M., Julkunen-Tiitto R. (1998); High-Performance Liquid Chromatographic determination of Flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* Leaves, *Journal of Chromatography A*, **793**, 370-377.

Keville K. (1995); *Herbs: an illustrated encyclopedia*. Magna Books, New York, 146-156.

Kim S. L. H., Pezzuto M. and Pisha E. (1998); Synthesis of Betulinic Acid Derivates With Activity Against Human Melanoma, *Bioorganic & Medic Chemistry Letters*, **8**, 1707-1712.

Klischies M., Zenk M. (1978); Stereochemistry of C-Methylation in the Biosynthesis of Rhododendrin in *Alnus* and *Betula*, *Phytochemistry*, **17**, 1281-1284.

Lee-Eun B. (2001); Anti-inflammatory of Americanin A with its Physiological Aspects, *Molecular Aspects of Asian Medicines*, **1**, 203-213.

Liso P.A., Rebuelta M., Gallardo A., Villar A.M. (1996); Polymeric Drugs Derived From Ibuprofen With Improved Antiinflammatory Profile, *Journal of Biomedical Materials Research*, **32**, 553-560.

Lorke D. (1983); A New Approach to Practical Acute Toxicity Testing, *Archives of Toxicology*, **54**, 275-287.

Máñes S., Recio M. C., Giner R., Ríos J. L. (1997); Effect of Selected Triterpenoids on Chronic Dermal Inflammation, *European Journal of Pharmacology*, **334**, 103-105.

Máñes S., Recio M. C., Gil I., Giner R., Gómez R M., Waterman P., Ríos J L. (1999); a Glycosyl Analogue of Diacylglycerol and Other Antiinflammatory Constituents from *Inula viscosa*. *Journal of Natural Products*, **62**, 601-604.

Martínez J. (1984); La Flora de Veracruz, editorial El Ateneo, Fascículo No 20, Xalapa Veracruz México, 128-136.

Matsuda H., Ishikado A., Nishida N., Ninomiya K., Fujiwara H., Kobayashi Y. and Masayuki Y. (1998); Hepatoprotective, Superoxide Scavenging, and Antioxidative Activities of Aromatic Constituents from the Bark of *Betula platyphylla* var. *Japonica*, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **8**, 2939-2944.

Matsumoto K., Takahashi H., Miyake Y. and Fukuyama Y. (1999); Convenient Syntheses of Neurotrophic Americanol A and Isoamericanol A by HRP Catalyzed Oxidative Coupling of Caffeic Acid, *Tetrahedron Letters*, **40**, 3185-3186.

McCutcheon A.R., Ellis S.M., Hancock R.E.W., Towers G.H.N. (1992); Antibiotic Screening of Medicinal Plants of the British Columbian Native Peoples, *Journal of Ethnopharmacology*, **37**, 213-223.

McCutcheon A.R., Ellis S.M., Hancock R.E.W., Towers G.H.N. (1994); Antifungal Screening of Medicinal Plants of British Columbian Native Peoples, *Journal of Ethnopharmacology*, **44**, 157-169.

Miller J. (1992); Aditivos y Conservadores Para Alimentos, Editorial Limusa-Wiley México D.F. 123-127.

Min-Won L., Jung-Hwan K., Dong-Wook J. Kyoung-Hwan A., Sang-Hak T., Young-Jonn S. (2000); Inhibition of Cyclooxygenase-2 Expression by Diarylheptanoid from the Bark of *Alnus hirsute* var. *sibirica*, *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, **23**(4), 517-518.

Min-Won L., Na-Young K., Myung-Shin P., Kyoung-Hwan A., Sang-Hak T., Dug-Ryoung H., Youn-Chul K., Hun-Taeg C. (2000); Diarylheptanoids With *In Vitro* Inducible Nitric Oxide Synthesis Inhibitory Activity from *Alnus hirsuta*. *Planta Medica*, **66**, 551-553.

Nathan R. G. and Stermitz R. F. (2000); Synthesis and Structures of Regioisometric Hydnocarpin-Type Flavonolignans, *Journal of Natural Products*, **63**, 1140-1145.

Niklaus, A. L., Raymond M., Lopata A. (1999); Ultrastructural Studies of Glycan Changes in the Apical Surface of the Uterine Epithelium During Pre-Ovulatory and Pre-Implantation Stages in the Marmoset Monkey, *The Anatomical Record*, **255**, 241-251.

Parkhurst M. R., Thomas W D. and Skinner A. W. (1973); Molluscicidal Saponins of *Phytolacca dodecandra*: Oleanoglycotoxin-A, *Phytochemistry*, **12**, 1437-1442.

Peres V., Tanus J., Faustino de Oliveira F. (2000); Tetraoxygenated Naturally Occurring Xanthones, *Phytochemistry*, **55**, 683-710.

Perret C, J., Wolfender L And Hostettmann K. (1999); LC/ES-MS Analysis of Triterpene Glycosides: Rapid Estimation of the Saponin Content of Dried Berries of *Phytolacca dodecandra*, *Phytochemical Analysis*, **10**, 272-278.

Rajamohan F., Venkatachalam T.K., Irvin J.D., Uckun F.M. (1999); Pokeweed Antiviral Protein Isoforms PAP-I, PAP-II, and PAP-III Depurinate RNA of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **260**(2), 453-458.

Ritch-Krc E. M., Turner, N.J., Towers G.H.N. (1996) Carrier Herbal Medicine: An Evaluation of The Antimicrobial and Anticancer activity in some Frequently used Remedies, *Journal of Ethnopharmacology*, **52**, 151-156.

Ritch-Krc E.M., Turner N.J., Towers G.H.N. (1996); Carrier Herbal Medicine: Traditional and Contemporary Plant Use, *Journal of Ethnopharmacology*, **52**, 85-94.

Robbins S., Cotran R. & Kumar V. (1990); " Patología Estructural y Funcional vols I Y II., 4ª ed. Editorial Interamericana Mc Graw-Hill., Madrid España., Vol I 11:14, 39:71, Vol II 994 -998.

Rzedowski J. (1979); Flora Fanerogámica del Valle de México, Editorial CECSA, México D.F, 80 -161.

Santamour F., Lundgren L. (1997); Rhododendrin in *Betula*: a Reappraisal, *Biochemical Systematics and Ecology*, **25**(4), 335-341.

Schlick J. L., Desvoyes B., Mehdi A., Dulieu P. (1999); Development of a Double Sandwich ELISA able to Discriminate between free PAP (Pokeweed Antiviral Protein) and Complexed PAP in Leaf Extracts, *Plant Science*, **140**, 1-8.

Schlick, J. L., Dulieu P., Desvoyes B., Adami P., Radom J., Jouvenot Mi. (2000); Cytotoxic Activity of a Recombinant GnRH-PAP Fusion Toxin on Human Tumor Cells Lines, *FEBS Letters*, **472**, 241-246.

Seibert K., Zhang Y. (1994); Pharmacological and Biochemical Demonstration of the Role of Cyclooxygenase-2 in Inflammation and Pain, *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, **91**, 12013-12017.

Shao F., Hu Z, Xiong Y., Huang Q., Wang Chun-G., Rong-Huan W. (1999); A New Antifungal Peptide from the Seeds of *Phytolacca Americana*. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1430**, 262-268.

Smith, C.M & Reynard A.M.(1992); "Textbook of Pharmacology". Edit Saunders College Co. Philadelphia U.S.A. 401-430.

Spengel S., Luterbacher S. and Schaffner E. (1992); Phytolaccagenin and Phytolaccagenic Acid from Berries, Roots, Leaves and Calli of *Phytolacca dodecandra*., *Planta Medica*, **58** (Suppl.) pags A684.

Spengel S., Luterbacher S. and Schaffner E. (1995); New Aspects on the Chemotaxonomy of *Phytolacca dodecandra* with Regard to the Isolation of Phytolaccagenin, Phytolaccagenic Acid and their Glycosides, *Planta Medica*, **61**, 385-386.

Spengel S., Schaffner W. (1990); Acinospesigenine: A New Triterpene from the Leaves of *Phytolacca acinosa*., *Planta Medica*, **56**, 284- 286.

Steele C.P, J., C. Warhurst D. C., Kirby G. and Simmonds M. (1999); *In Vitro* an *In Vivo* Evaluation of Betulinic Acid As an Antimalarial, *Phytotherapy Research*, **13**, 115-119.

Steiner P. R. (1986); Folk Medicine: The Art and the Science, The American Chemical Society, 113-124.

Stout H. G., Malofsky M. B. and Stout F. V. (1964); Phytolaccagenin: A Light Atom X-Ray Structure Proof Using Chemical Information, *Journal of American Chemical Society*, **86** (5), 957- 958.

Stuart M.(1981); *Enciclopedia de hierbas y herboristería*. Ediciones Omega; España, 162-238.

Syntex, Simposium. (1987); "Inflamación y antiinflamatorios: actualizaciones". 23:29, 61- 83, 97: 99.

Takahashi H., Namikawa Y. (2001); Triterpene Glycosides from the Cultures of *Phytolacca americana*, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, **49** (2), 246-248.

Tallarida R. J. (2000); Drug Synergism and Dose-Effect Analysis. Chapman & Hall/CRC Press. U.S.A, 119-125.

Tomlinson J.A., Walker M. V., Flewet H.T., Barclay R. G. (1974); The Inhibition of infection by Cucumber Mosaic Virus and Influenza Virus by Extracts from *Phytolacca Americana*, *Journal of General Virology*, **22**, 225-232.

Tori M., Kasushi H., Yoshinori A. (1995); Diarylheptanoids, Flavonoids, Stilbenoids, Sesquiterpenoids and Phenanthrene from *Alnus maximowiczii*, *Phytochemistry*, **40** (4), 1263-1264.

Treyvaud V., Marston A., Dyatmiko W., Hostettmann K. (2000); Molluscicidal Saponins from *Phytolacca icosandra*. *Phytochemistry* **55**, 603-609.

Tyler E. V. (1979); Farmacognosia, Editorial Librería el Ateneo, Buenos Aires Argentina 406-415.

Uchikoba T., Arima Kazunari Y. H., Shimada M., Kaneda M. (2000); Amino Acid Sequence and Some Properties of Phytolacain G, A Cysteine Protease From Growing Fruit of Pokeweed, *Phytolacca Americana*. *Biochemica et Biophysica Acta*, **1523**, 254-260.

Van Arman C. G., Begany A. J. (1965); Some Details of the Inflammation Caused By Yeast and Carrageenin (With Appendix on Kinetics of the Reactions), *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **150**, 328-334.

Williamson M. E., Okpako T. D., Evans R. (1996); Pharmacological Methods in Phytotherapy Research: Selection, Preparation and Pharmacological Evaluation of Plant Material, John Wiley & Sons, Volume 1, 131-155.

Winter CA., Risley EA.(1962); Carrageenin-Induce Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs, *Proceedings of Society of Biology Medical*. **111**, 544-547.

Woo S., Kang S. S., Wagner H., Seligman O., Mohan C. V. (1978); Triterpenoid Saponins From The Roots of *Phytolacca americana*. *Planta Medica*, **34**, 87-92.

Yang-Hua Y., Chu-lu, W. (1989); A New Active Saponin from *Phytolacca esculenta*. *Planta Medica*, **55**, 551-552.

Yang-Hua Y., Fu-Bao D. (1991); A New Triterpenoid and its Glycoside from *Phytolacca esculenta*. *Planta Medica*, **57**, 162-164.

Yang-Hua Y. (1990); Esculentoside L and K: Two New Saponins from *Phytolacca esculenta*. *Planta Medica*, **56**, 301-303.

Yang-Hua Y. (1992); Two New Saponins from the Roots of *Phytolacca esculenta*. *Planta Medica*, **58**, 99-101.

Zhang Y., Shaffer A., Portanova J., Seibert K., Isakson P. (1997); Inhibition of cyclooxygenase-2 rapidly reverses inflammatory hiperalgesia and prostaglandin E₂ production, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **283**(3), 1069-1075.