



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Sedum praealtum*
SIEMPREVIVA EN LA RATA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

MIRIAM SANDRA BUENDÍA ROMERO

D I R E C T O R A D E T E S I S

DRA. MARIA ESTELA MELÉNDEZ CAMARGO



LOS REYES IZTACALA, MÉXICO.

MÉXICO 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

La presente investigación se realizó bajo la asesoría de la Dra. María Estela Meléndez Camargo, en el laboratorio de Farmacología y Toxicología Renal y Hepática en el Departamento de Farmacia de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional, dentro del proyecto titulado Evaluación de plantas medicinales y sustancias de interés en farmacia con clave: CGPI 20030246 y 20040048.

A mis padres Jaime y María Reyes

Doy las gracias por tener a los mejores padres del mundo, porque a ustedes debo lo que soy y lo que tengo, no me alcanzaría el tiempo para devolverles un poco de lo que he recibido. Les pido perdón por no entender su posición de padres, se que algún día lo entenderé. Los amo y siempre les estaré agradecida.

Gracias a mi hermano Jaime, por ser un hombre trabajador y honesto. Y porque gracias a tú esfuerzo pude terminar la licenciatura, y gracias porque aunque no lo dices, sabemos que somos tus hermanas consentidas.

Agradezco a Nayeli por ser mi confidente, por compartir mis sueños, por conocer todos mis secretos; pero sobre todo gracias por ser mi hermana, te quiero mucho.

Porque de ti tome la fuerza que necesite para seguir, porque tengo muy grabada tu imagen en mi mente, porque se que tuviste que irte para dejarnos el mejor de los recuerdos. Gracias Bebe

Agradezco a mi sobrinita Ximena porque con su presencia nos cambio la vida.

Con todo mi amor a Delfino

Te doy las gracias por ser el más grande de mis motivos para seguir....

En cada hoja , en cada párrafo, en cada letra estabas tú, dándome ese impulso que necesitaba para terminar, no fue fácil pero gracias a tu gran cariño y a la confianza que depositaste en mi pude llegar al final, te agradezco tus palabras de aliento, de regaño y cada momento juntos..... te amo

Doy las gracias por tener la fortuna de que el mejor de los hombres este a mi lado.

Doy las gracias a la Dra. Estela por haberme apoyado tanto y por la gran oportunidad que me dio al haber aceptado dirigir este trabajo.

Rosalba gracias por enseñarme, que cuando se desea algo con todas tus fuerzas se llega al final... porque ni el tiempo ha podido impedir tus objetivos, estoy segura de que vas a llegar muy lejos. Te quiero mucho amiga. ¡Mucha suerte!

Agradezco a Marisol por los momentos compartidos, por saber escuchar sin juzgar; porque de ti aprendí mucho, gracias por tú gran aprecio hacia a mi y por darme tu amistad.

Agradezco a mi amiga Elvia por los sueños, las tristezas y las alegrías compartidas, nunca lo voy a olvidar, porque sé que nuestra amistad es de las que dura para siempre.

Muchas gracias a mi amiga Lorena por ser siempre uno de mis principales apoyos, y por creer tanto en mí. Sé que a las dos nos esperan cosas muy lindas y sé también que estaremos juntas para compartirlas.

Angélica porque aunque seguimos caminos diferentes siempre hubo un momento en la vida para encontrarnos y sé que así será por siempre.

Muchas gracias Leticia, por nunca olvidar un cumpleaños, por dar tanto sin esperar nada, por ser tan noble, tan agradecida por ser tú gracias Leti. Eres de las pocas personas que conoce el significado de la amistad.

Agradezco a Horacio por brindarme una verdadera amistad, con admiración porque aunque sus pasos son lentos, siempre supo hacia donde ir y como llegar al final.

Por ser tan inteligente, por ser tan buena persona, pero sobre todo por ser un gran amigo te doy las gracias. Ghyto

A Cesar, por tus locuras que muchas veces no entendía, pero que para ti tenía un significado muy grande....gracias.

Laura fueron pocos los momentos compartidos pero muy valiosos, te agradezco el haberme escuchado siempre que lo necesite.

Gracias a Pamela por tan divertida, tan compartida y por creer tanto en la amistad.

Muchas gracias a Olga por saber siempre que decir y por ser siempre tan alegre aunque las circunstancias no fueran las mejores.

De todos ustedes guardo el más grato recuerdo en mi corazón ...

INDICE
RESUMEN

9

I. INTRODUCCIÓN	
- Medicina tradicional	10
- Plantas medicinales con actividad antiinflamatoria	10
- Descripción de <i>Sedum praealtum</i> DC.	12
- Inflamación	14
- Inflamación aguda	16
- Participación celular: exudación leucocitaria y fagocitosis	16
- Inflamación crónica	17
- Emigración y quimiotaxis	18
- Mediadores químicos de la inflamación	19
- Fármacos antiinflamatorios	20
- Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)	21
- Química y farmacodinética	21
- Farmacodinamia	23
- Indometacina	25
- Didofenaco (voltaren)	27
- Modelos biológicos para corroborar la actividad antiinflamatoria	29
	31
II. JUSTIFICACIÓN	35
III. OBJETIVOS	36
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	
- Obtención del liofilizado	37
- Estudio farmacológico	37
- Análisis hematológico	37
- Análisis histológico	38
- Determinación de la dosis letal cincuenta (DL50)	39
- Análisis estadístico	39
V. RESULTADOS	
- Efecto antiinflamatorio de <i>Sedum praealtum</i>	40
- Estudio histológico del efecto antiinflamatorio de <i>Sedum praealtum</i> en tejido subcutáneo de rata	41
	44
VI. DISCUSIÓN	55
VII. CONCLUSIONES	59
VIII. BIBLIOGRAFÍA	60
IX. APÉNDICE 1	67
X. APÉNDICE 2	70
XI. APÉNDICE 3	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

1. Distribución geográfica de *Sedum praedaltum* 14
2. Efecto de *Sedum praedaltum* sobre el peso húmedo del granuloma 42
3. Efecto de *Sedum praedaltum* sobre el peso seco del granuloma 43
4. Efecto de *Sedum praedaltum* sobre el peso final del granuloma 44

ÍNDICE DE TABLAS	Página
1. Mediadores químicos y mecánicos de la inflamación	19
2. Principales mediadores químicos de la inflamación que controlan el aporte sanguíneo y la permeabilidad vascular o que modulan el movimiento de las células	22
3. Efecto antiinflamatorio de <i>Sedum praecaltum</i> en tejido de rata	41
4. Cuenta de leucocitos totales en sangre de ratas tratadas con el liofilizado de <i>Sedum praecaltum</i>	53
5. Evaluación de la toxicidad aguda (DL ₅₀) de <i>Sedum praecaltum</i> DC.	53
6. Cuentas diferenciales en sangre de ratas, tratadas con el liofilizado de <i>Sedum praecaltum</i> al inicio y final del experimento.	54

ÍNDICE DE FOTOGRAFÍAS

Página

1. <i>Sedum praecaltum</i> DC. (siempreviva)	15
2. Testigo negativo. Corte de piel de rata en contacto con el granuloma	45
3. Reacción inflamatoria. Tinción H-E. Aumento 40x	45
4. Reacción inflamatoria tratada con indometacina. Aumento 10x	46
5. Corte de piel de rata tratada con indometacina. Tinción H-E. Aumento 40x	47
6. Reacción inflamatoria tratada con didofenaco (voltaren). Aumento 10x	47
7. Testigo positivo. Tratada con didofenaco (voltaren). Técnica H-E. Aumento 40x	48
8. Reacción inflamatoria tratada con el liofilizado de <i>Sedum praecaltum</i> (100 mg/kg de p. c.). Aumento 40x	49
9. Corte del área en contacto con el granuloma, a mayor aumento 40x. Liofilizado (100 mg/kg de p. c.)	49
10. Liofilizado de <i>Sedum praecaltum</i> (200 mg/kg de p. c.). Aumento 10x	50
11. Reacción inflamatoria tratada con <i>Sedum praecaltum</i> (200 mg/kg de p.c.) Técnica H-E. Aumento 40x	50
12. <i>Sedum praecaltum</i> (300 mg/kg de p. c.) Aumento 10x	51
13. Reacción inflamatoria tratada con <i>Sedum praecaltum</i> (300 mg/kg de p. c.). Técnica H-E. Aumento 40x	52

RESUMEN

Herederas de una larga tradición prehispánica las culturas indígenas de México han preservado y difundido formas y procedimientos eficaces para resolver problemas de salud de la población. Son varios los usos que con frecuencia se le atribuyen a la gran diversidad de plantas existentes en México, tal es el caso de *Sedum praecaltum* Crassulaceae conocida comúnmente como siempreviva, planta de ornato a la cual se la atribuyen efectos contra el dolor de dientes, encías inflamadas, amigdalitis, por lo cual se consideró de interés estudiar el efecto antiinflamatorio de la siempreviva a diferentes concentraciones en ratas a las cuales se les indujo la inflamación.

La planta se identificó y se obtuvo el liofilizado. Se utilizaron(ratas Wistar hembras de 180 ± 20 g de p. c. a las cuales se les indujo la inflamación por el modelo del granuloma (inserción subcutánea del pellet de algodón en la rata). Se formaron seis grupos, el testigo y dos testigos positivos uno tratado con indometacina y otro con didofenaco 5 mg/Kg de p. c. para ambos grupos), tres lotes tratados con el liofilizado de *Sedum praecaltum* a diferentes concentraciones (100, 200 y 300 mg/Kg de p. c. respectivamente). El tratamiento se realizó durante siete días, al término del cual las ratas fueron sacrificadas, se retiraron los granulomas y se pesaron para obtener por diferencia el peso ganado (peso húmedo y peso seco). Al inicio y final del tratamiento se tomaron muestras de sangre para la cuenta de leucocitos totales y la lectura de las diferenciales (para determinar los diferentes tipos celulares).

Análisis histológico. Se tomaron muestras de tejido del área en contacto con el granuloma y se depositaron en una solución de formaldehído al 10 % , posteriormente fueron inducidas en parafina, se hicieron cortes de 6 micras, los cuales fueron teñidos con la técnica de Hematoxilina – Eosina. Finalmente fueron observadas al microscopio óptico.

Determinación de la DL_{50} . Se utilizaron 20 ratas Wistar de 200 ± 10 g de p. c. las cuales fueron distribuidas al azar en cinco grupos, 4 ratas por lote, a estos grupos se les administró el liofilizado de *Sedum praecaltum* en concentraciones de 500, 1500, 2000 y 3000 mg/Kg de p. c., al término de los siete días se registro el número de animales vivos.

Los resultados obtenidos nos muestran una disminución en la inflamación, en el grupo tratado con indometacina, voltaren y el liofilizado de la siempreviva a las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de p. c. con respecto al grupo testigo, obteniendo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$), estos resultados fueron apoyados por los resultados histológicos y hematológicos.

No se observaron efectos tóxicos ni se registraron muertes a las dosis utilizadas.

Los resultados obtenidos permiten sugerir que el liofilizado de *Sedum praecaltum* presenta efecto antiinflamatorio.

I. INTRODUCCIÓN

Medicina tradicional

La medicina tradicional mexicana es una importante manifestación cultural, característica de la vida del país. Sus prácticas y recursos, profundamente arraigados en la sociedad, son un aporte más a la configuración pluricultural de México. Herederas de una larga tradición prehispánica, las culturas indígenas de México han preservado y difundido formas y procedimientos eficaces para resolver importantes problemas de salud de la población. La diversidad ecológica que determina la rica flora que posee el país y la igualmente rica diversidad cultural que nos caracteriza, se funden en un crisol de conocimientos y prácticas populares que es necesario valorar, rescatar y desarrollar científicamente en beneficio de la salud (Aguilar, 1994).

El uso de las plantas medicinales con fines curativos se remonta al principio de la historia de la humanidad. El hombre recurría a la naturaleza en busca de su alimento y de su salud. Por medio de aciertos y errores aprendió a conocer las plantas que lo curaban; este conocimiento se transmitió de generación en generación y fue incrementándose con la experiencia. Sin los recursos que ofreció la naturaleza, el hombre no hubiera sobrevivido (Hernández y Gally, 1988).

En la actualidad la fitoterapia, se ha convertido en una ciencia. Lo que antaño no era más que empirismo se explica hoy mediante la determinación de las sustancias activas y la investigación de sus efectos (Pahlow, 1991).

Gradualmente el hombre, al dominar a la naturaleza, ha roto muchos de los lazos que lo unen a ella. Hoy, la medicina utiliza fármacos sintéticos para aliviar todas las enfermedades. Muchos de estos fármacos son benéficos, pero también muchos por su mal uso o abuso, han perdido la eficacia y en incontables casos han provocado efectos secundarios nocivos.

Por fortuna en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza y por lo tanto es necesario construir una nueva relación con nuestro ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación sino también para aliviar nuestras enfermedades (Hernández y Gally, 1988).

Las plantas medicinales son eficaces, y sobre este punto no existen dudas. Pero su grado de eficacia depende del uso correcto que se haga de ellas (Pahlow, 1991).

De las plantas, las hojas constituyen uno de los órganos más interesantes, ya que en ellas se realiza la mayor parte de los procesos metabólicos de la misma. A través de la fotosíntesis, la planta elabora dos clases de compuestos nitrogenados: las proteínas o principios inmediatos y los alcaloides o principios activos, de acción fisiológica específica y energética. Los principios activos son sustancias cuya principal actividad es la de servir como fármaco o como medicamento que alivie la enfermedad o restablezca la salud perdida, es decir tiende a disminuir o neutralizar el desequilibrio orgánico que es la enfermedad. Todas las partes del vegetal contienen principios activos (semillas, frutos y hojas etc.). Los principios activos son entonces los que dan

las propiedades terapéuticas a las plantas, en base a ellos se clasifican y seleccionan.

La actividad terapéutica de las plantas se evalúa utilizando la parte de la planta a la que se le ha asignado el efecto farmacológico, usándola de manera similar a como la utiliza la población, cocimiento, infusión, etc., (Rzedowski y Rzedowski, 1979)

Las plantas con actividad antiinflamatoria generalmente son evaluadas extrayendo las sustancias presentes en el material vegetal, tratando de eliminar el mayor contenido de agua posible, ventaja que permite dosificar y observar el posible efecto terapéutico.

Actualmente existen en el país una gran diversidad de plantas con acción farmacológica probada.

Plantas medicinales con actividad antiinflamatoria

En la literatura científica internacional, son numerosas las especies vegetales que son reconocidas por su actividad antiinflamatoria nativa, entre los que podemos citar: *Euphorbia próstata* (golondrina rastrera, botoncito y leche de sapo), cuyo extracto metanólico mostró inhibición significativa del edema inducido con carragenina, (Singla y Pathak, 1989). El extracto acuoso de *Euphorbia hirta* (hierba de la golondrina), produjo actividad analgésica y antipirética, además de un potente efecto antiinflamatorio en los procesos agudos (Lanhers y col., 1991). La evaluación de las propiedades antiinflamatorias de las raíces de *Uncaria tomentosa* (uña de gato), mostró una inhibición del edema inducido por carragenina en la rata (Aquino y col., 1991).

Del extracto metanólico de las partes aéreas de *Celastrus orbiculatus* (diana), se aisló epiafzelequina, compuesto que inhibe a la ciclooxigenasa COX-1 (Min y col., 1999).

Agave intermixta y *Cissus sicyoides* (moloqui y temecatl), dos especies, tropicales usadas en la medicina tradicional de la República Dominicana, fueron evaluadas y los extractos acuosos de ambas especies, administrados por vía oral, inhibieron en un 50% el edema inducido con carragenina (García y col., 2000).

En México también han sido evaluadas plantas con actividad antiinflamatoria por ejemplo: *Achillea millefolium* (reina), cuyo extracto metanólico administrado a la dosis de 400 mg/kg intraperitonealmente, inhibió en un 65% el edema producido por carragenina. La actividad fue atribuida a un conjunto de lactonas sesquiterpénicas, flavonoides y al sistosterol. Otros

metabolitos secundarios aislados de *Heterotheca inuloides* (acahua, acahual y acahualli), (cariotano- 9,9-diol y la quercetina). Inhibieron en forma dosis dependiente, la inflamación del edema inducido con ácido tetrahidro forbol (TPA) en la oreja de ratón (Delgado y col., 2001). Sin embargo, existen muchas especies que empíricamente se utilizan como antiinflamatorios pero que no han sido evaluadas científicamente, tal es el caso de *Sedum praealtum* (siempreviva).

El uso de la siempreviva es muy antiguo en la Medicina Tradicional Mexicana. Sahagún (1954) en su libro de Historia General de las Cosas de la Nueva España la cita contra el dolor de ojos y cataratas, este último efecto también ha sido descrito por Estrada (1985); Linares (1988) describe su uso tradicional contra la fiebre, para blanquear los dientes, para adorar los ojos y como dentífrico, Ramos y col., (1998) citan su uso como anticonceptivo en el Estado de Morelos. Hernández (2000), encontró que el extracto fresco de *Sedum praealtum* indujo un pequeño efecto antiinflamatorio en la rata. Silva y col., (2003), demostraron la actividad espermicida de la siempreviva. Por los posibles efectos señalados se decidió evaluar el efecto antiinflamatorio de la siempreviva.

Descripción de *Sedum praetium* DC.

Son varios los usos que con frecuencia se le atribuyen a la gran diversidad de plantas existentes en México, tal es el caso de *Sedum praetium*; Crassulaceae, conocida comúnmente como siempreviva. Distribuida desde el Centro de México hasta Guatemala, figura 1.



Figura 1. Distribución geográfica de *S. praetium*

Sedum praetium es una planta arbustiva, erecta o colgante de 0.6 m a 5 m de longitud, tallo liso ramificado dicotómicamente, de color café claro grisáceo, hojas sésiles, pero con frecuencia con la base angosta, alternas dispuestas en espiral, enteras, aplanadas, ovaladas a espatuladas, de 1 a 6 cm de largo por alrededor de 1 cm de ancho, ápice redondeado, a veces mucronado, de color verde lustroso con manchas verdes sobre todo en el

borde; inflorescencias en ápice de ramas axilares, cimoso –paniculadas, de 5 a 15 cm de largo por 10 cm o menos de ancho; flores sésiles o cortamente pediceladas, generalmente pentámeras, cáliz de 5 lóbulos ovalados de 1.5 a 3 mm de largo, pétalos de color amarillo, lanceolados mucronados, de 2 a 9 mm de largo, de 2 a 3.5 mm de ancho; nectarios cortos y anchos; 10 estambres, ovario de 5 carpelos amarillos, erectos divergentes, estilo manifiesto, estigma pequeño, globoso; folículos café, ampliamente divergentes, con engrosamiento manifiesto en la parte ventral; semillas numerosas, elípticas, café de casi 1 mm de largo, finamente verrucosas fotografía 1, (Rzedowski y Rzedowski, 1979).



Fotografía 1. *Sedum praealtum*

Inflamación

La inflamación es una respuesta fisiopatológica fundamental cuyo objetivo es la eliminación de cualquier estímulo nocivo introducido en el huésped. Estos estímulos nocivos incluyen agentes radiantes, químicos, físicos, infecciosos e inmunes (Insel, 1996).

El proceso inflamatorio tiene tres fases: Iniciación, consolidación y resolución. La primera se origina por la acción de células como los polimorfonucleares, los neutrófilos y los basófilos y de los factores producidos por ellas. La segunda fase ocurre gracias a la participación de los macrófagos y de los linfocitos, y la tercera o de resolución se debe a la interacción entre macrófagos, eosinófilos y fibroblastos (Rojas, 1985).

La inflamación se divide en aguda y crónica, términos útiles, siempre que se tengan en cuenta ciertas características de su significación.

Inflamación aguda

La inflamación aguda tiene una duración relativamente corta, desde unos minutos a varias horas o uno o dos días, y sus principales características son la exudación de líquidos y proteínas plasmáticas (edema) y la emigración leucocitaria, predominantemente de neutrófilos, independientemente del agente lesivo (Robbins, 1990).

Los signos clínicos de la inflamación aguda son el rubor, calor, tumor y dolor, inmortalizado por Celso. Un quinto signo clínico es la pérdida de la función. Estos signos de la respuesta inflamatoria son inducidos por 1) *cambios del flujo y calibre vascular* (denominados también cambios hemodinámicos), 2)

cambios de la permeabilidad vascular y 3) exudación leucocitaria. Estas tres reacciones pueden presentarse simultáneamente y algunas comparten mecanismos mediadores.

Rubor. Es la manifestación inicial del proceso y se debe a la vasodilatación, que aumenta el flujo sanguíneo a la zona afectada. Ese mecanismo tiene por objeto asegurar un adecuado suministro al sitio de agresión de factores plasmáticos como anticuerpos, complementos de células como polimorfonucleares, macrófagos y linfocitos. El incremento del flujo sanguíneo en la zona afectada trae como consecuencia el aumento local de la temperatura o **calor**.

Tumor. Ocurre como consecuencia de la exudación de líquidos y la migración de células de los tejidos capilares. Los cambios ultraestructurales consistentes en aumento del espacio entre células endoteliales adyacentes permiten esta exudación. Estos cambios tienen lugar especialmente a nivel de las vénulas y son producidos por varios de los mediadores de la inflamación. El exudado plasmático sigue el proceso de infiltración celular, que en las primeras horas está dado por polimorfonucleares, neutrófilos y luego por macrófagos y linfocitos.

Finalmente el **dolor** se debe a la activación del sistema de las quininas y de las prostaglandinas (Rojas, 1985).

Participación celular: Exudación leucocitaria y fagocitosis

El acúmulo de leucocitos principalmente neutrófilos y monocitos es el rasgo más importante de la reacción inflamatoria. Los leucocitos engloban y

degradan bacterias, inmunocomplejos y restos celulares necróticos y sus enzimas lisosómicas contribuyen de otras formas en la respuesta defensiva. Sin embargo, los leucocitos pueden a su vez prolongar la inflamación y aumentar el daño tisular por la liberación de enzimas, mediadores químicos y radicales tóxicos (tabla 1).

La secuencia de estos acontecimientos leucocitarios puede ser dividida en: 1) marginación, 2) adherencia, 3) migración según el estímulo quimiotáctico, 4) fagocitosis y degranulación intracelular y 5) liberación de productos leucocitarios.

Inflamación crónica

Es menos uniforme, de mayor duración la inflamación crónica se asocia histológicamente a la presencia de linfocitos, macrófagos y tejido conjuntivo. Sin embargo, existen muchos factores que pueden modificar el curso y el aspecto histológico de la inflamación crónica.

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. La evolución de la respuesta inflamatoria se ve influida por una serie de mediadores químicos, actuando conjunta o secuencialmente.

El terreno de la respuesta inflamatoria es el tejido conjuntivo vascularizado, incluyendo el plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y los componentes celulares y extracelulares del tejido conjuntivo.

Las células circulantes que tienen importancia en la inflamación son los *neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas*. Las células

del tejido conjuntivo son las *células cebadas* que están en íntima relación con los *vasos sanguíneos*, los *fibroblastos* del tejido conjuntivo y los ocasionales linfocitos y macrófagos del mismo. Los componentes extracelulares del tejido conjuntivo son la *membrana basal* y los distintos tipos de *colágeno*, *elastina* y *proteoglicanos*. La fibronectina y la laminina son glucoproteínas que existen en las membranas basales, junto a algunos tipos de colágeno (IV y V) (Robbins, 1990).

Tabla 1. Mediadores químicos y mecánicos de la inflamación

QUÍMICOS	MECÁNICOS
<ul style="list-style-type: none"> • Productos bacterianos (endotoxinas) • Fragmentos del complemento (C5a) • Péptidos quimiotácticos • Leucotrieno B4 (LB4) • Factor activador de las plaquetas • Transferrina • Citocinas (IL-1 y TNF) 	<ul style="list-style-type: none"> • Estimulación de las moléculas de adherencia leucocitaria (C5a, LTB4). • Estimulación de las moléculas de adherencia endotelial (LI-1, endotoxinas). • Ambos efectos (FNT)

(Roit 1996)

Migración y quimiotaxis

La migración alude al proceso mediante el cual los glóbulos blancos móviles escapan de los vasos hacia los tejidos perivasculares. Todos los neutrófilos, eosinófilos, basófilos y linfocitos, utilizan la misma vía.

El tipo celular presente en la respuesta inflamatoria varía según la edad de la lesión y el tipo de estímulo. En la mayoría de los casos en la inflamación aguda predominan los neutrófilos en las primeras 6 a 24 horas, siendo sustituidos por monocitos a las 24 y 48 horas. Esta secuencia puede explicarse de la siguiente forma: 1) los neutrófilos, de vida corta, se desintegran y

desaparecen en 24-48 horas, en tanto que los monocitos sobreviven mucho más tiempo en los tejidos; 2) la migración de los monocitos se mantiene mucho después de haber cesado la de los neutrófilos, y 3) los factores quimiotácticos para los leucocitos y monocitos son activados en momentos diferentes de la reacción.

La *quimiotaxis* se define como la emigración unidireccional de las células hacia una atracción, más simplemente, la locomoción orientada según un gradiente químico. Los agentes quimotácticos más significativos para los neutrófilos son: 1) productos bacterianos, 2) componentes del sistema del complemento, particularmente C5a y 3) productos de la vía de la lipooxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico, especialmente el leucotrieno B.

Mediadores químicos de la inflamación

Las lesiones precipitan la respuesta inflamatoria y las sustancias químicas segregadas son quienes la median. Su existencia fue sospechada durante mucho tiempo, debido a dos razones:

1. Independientemente de la naturaleza de la agresión, los cambios inflamatorios resultantes son bastante uniformes, casi estereotipados.
 2. La inflamación puede producirse en los tejidos sin conexiones nerviosas.
- La lista de posibles mediadores casi todos ellos descubiertos en estudios *in vitro*. Los mediadores pueden generarse en el plasma, en las células, probablemente en los tejidos lesionados. Pueden dividirse en los siguientes grupos: aminas vasoactivas: histaminas y serotonina; proteasas plasmáticas: el sistema de cininas (bradícina y calicreína), el

sistema de complemento (C3a, C5a,C5B-C9), el sistema fibrinolítico de la coagulación (fibrinopéptidos productos de degradación de la fibrina), los metabolitos del ácido araquidónico (AA): vía ciclooxigenasa (endoperóxidos, prostaglandinas y tromboxanos), vía lipooxigenasa leucotrienos: (HPETE,HETE), constituyentes lisosómicos (proteasas), radicales libres derivados del oxígeno, factores activadores de las plaquetas, citocininas, factores de crecimiento (tabla 2)(Robbins, 1990).

Fármacos antiinflamatorios

Se ha señalado anteriormente la importancia del proceso inflamatorio como un mecanismo de defensa del organismo ante la existencia de alguna lesión o infección. Sin embargo, también es cierto que bajo algunas circunstancias, la misma respuesta inflamatoria puede prologarse de manera excesiva hasta convertirse en un proceso altamente nocivo y/o permanecer en un estado crónico degenerativo, como sucede con algunas enfermedades del tipo de la artritis reumatoide y de la tuberculosis. En estos casos, es necesario recurrir a tratamientos, de mayor efectividad. Lo cual se logra a través del uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos o esteroideos según sea el requerimiento

Antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Los salicilatos y otros fármacos similares utilizados para tratar las enfermedades reumáticas, comparten la propiedad de suprimir los signos y síntomas de la inflamación.

Tabla 2. Principales mediadores químicos de la inflamación que controlan el aporte sanguíneo y la permeabilidad vascular o que modulan el movimiento de las células

Mediador	Origen	Acción Biológica
Histamina	Celular	Aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, quimioinnesis.
5-Hidroxitriptamina (5-HT) (serotonina)	Celular	Aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso.
Factor activador de las plaquetas (PAF)	Celular	Liberación de mediadores plaquetarios aumento de la permeabilidad vascular, contracción del músculo liso, activación de los neutrófilos.
Factor quimiotáctico neutrofílico (NCF)	Celular	Quimiotaxis de los neutrófilos
IL-8	Celular	Localización de los monocitos
C3a		Degranulación de los mastocitos, contracción del músculo liso.
C5a	Plasmático	Degranulación de los mastocitos, quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos, activación de neutrófilos de la permeabilidad capilar.
Bradicinina	Plasmático	Vasodilatación, contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular, dolor
Fibrinopéptidos	Plasmático	Aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis de neutrófilos y macrófagos
Prostaglandina E ₂ (PGE ₂)	Celular	La vasodilatación potencia el aumento de la permeabilidad vascular producido por la histamina y la bradicinina
Leucotrieno B ₄ (LTB ₄)	Celular	Quimiotaxis de los neutrófilos en sinergia con PGE ₂ para aumentar la permeabilidad vascular
Leucotrieno D ₄ (LTD ₄)	Celular	Contracción del músculo liso, aumento de la permeabilidad vascular

(Roitt, 1996)

Estos fármacos también poseen efectos antipiréticos y analgésicos pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los vuelven útiles para el control de trastornos en los cuales el dolor se relaciona con la intensidad de los procesos inflamatorios (Payan, 1996).

Química y farmacocinética

Los AINE se agrupan en varias clases químicas. Esta diversidad química genera un intervalo amplio de características farmacológicas. Aunque existen muchas diferencias en la dinámica de los AINE, en general poseen algunas propiedades en común. Todos, menos uno de los AINE son ácidos orgánicos débiles tal como se administran, la excepción es un profármaco cetona que se metaboliza en fármaco ácido activo, la nabumetona.

La mayor parte de estos fármacos se absorben bien y no hay cambios en su biodisponibilidad por los alimentos. Muchos de los AINE son altamente metabolizados algunos mediante las fases I y II, y otros por glucuronidación directa (fase II). La biotransformación de muchos AINE proviene en parte, por vía de las familias CYP3A o CYP2C de las isoenzimas P450 en el hígado.

Mientras que la excreción renal es la vía más importante para la eliminación final casi todos son sometidos a varios grados de eliminación biliar y reabsorción. De hecho, el grado de irritación gastrointestinal baja se correlaciona con la cantidad de circulación enterohepática. Muchos de los AINE se unen a las proteínas ($\geq 98\%$) comúnmente a la albúmina.

Todos los AINE pueden encontrarse en los líquidos sinoviales después de dosis repetidas. Los fármacos con vidas medias cortas permanecen en las articulaciones más de lo que podría predecirse a partir de su vida media,

mientras que los fármacos con vidas medias prolongadas, desaparecen de los líquidos sinoviales en proporción a sus vidas medias.

Las **ciclooxigenasas COX** forman una familia de isoenzimas, de las que recientemente, se han identificado dos isoenzimas, **COX-1** y **COX-2** o **PGHS-1** y **PGHS-2**, ambas capaces de catalizar PGH₂ a partir de ácido araquidónico (AAr_q). Juegan un papel crucial en la degradación del ácido araquidónico a intermediarios muy inestables (de vida media breve, no mayor a 15 segundos), denominados endoperóxidos, PGG₂ y PGH₂, que son casi inmediatamente transformados en los productos finales responsables de los efectos biológicos de las PGs. Estas isoenzimas son codificadas por genes separados localizados en distintos cromosomas, que son regulados en forma diferente en las células. Sin embargo, presentan ciertas características comunes. Su estructura es similar, siendo las secuencias idénticas en más del 60% y conservando las regiones importantes para la función enzimática. La principal diferencia entre las 2 isoenzimas está en la regulación de su actividad enzimática. Se puede considerar a la COX-1 como una enzima constitutiva, presente en la mayoría de los tejidos y que estaría involucrada en el mantenimiento de las funciones fisiológicas, tales como la regulación del metabolismo renal del H₂O y sodio, la secreción de ácido gástrico y la hemostasis. Mientras que la COX-2, está presente sólo en algunos tejidos como el cerebro y la próstata. Cada isoenzima juega un rol diferente y la inhibición de cada una de ellas tiene consecuencias que no son idénticas: la inhibición de COX-1 producirá una disminución de PGs que participan en la homeostasis, la de la COX-2 no debía provocar sino una disminución de las PGs

producidas en situaciones de inflamación. Es así como ha surgido la hipótesis que la toxicidad asociada a AINE se debe a la inhibición de la forma constitutiva de COX en los tejidos normales, mientras los beneficios terapéuticos derivan de la inhibición de la enzima inducible, COX-2, en el sitio de inflamación.

Especialidad farmacéutica

Entre los inhibidores más potentes de COX-1 que de COX-2 podemos citar a la **Aspirina**, **indometacina** y **piroxicam**. En cambio, la **nabumetona** o **nimesulida** tendrían efectos más potentes sobre la COX-2. El **diclofenaco** y el **ibuprofeno** tendrían efectos equivalentes sobre las dos enzimas (Insel, 1996).

Farmacodinamia

La actividad antiinflamatoria de los AINE es mediada por la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas. Varios AINE tienen un posible mecanismo de acción adicional, incluyendo la inhibición de la quimiotaxis, la regulación a la baja de la producción interleucina-1, disminución de radicales libres y superóxido, e interferencia con los eventos intercelulares mediados por calcio. La aspirina acetila de manera irreversible y bloquea a la ciclooxigenasa plaquetaria, pero los demás AINE son inhibidores reversibles. La selectividad para COX-1 contra la COX-2 es variable e incompleta para los miembros más antiguos pero están disponibles inhibidores de la COX-2 altamente selectivos (celecoxib y rofecoxib). En pruebas utilizando sangre total humana se encontró que la aspirina, indometacina, piroxicam y sulindac fueron consideradas más

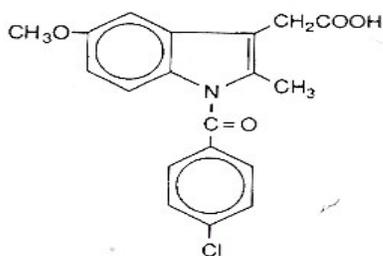
eficaces para la inhibición de COX-1, el ibuprofeno y el medofenamato inhibieron a las dos isoenzimas de manera aproximadamente igual. Es limitada la inhibición de la síntesis de lipooxigenasa que efectúan los AINE más recientes, lo que constituye un efecto deseable en un antiinflamatorio pero puede ser mayor que con la aspirina. De los AINE disponibles se ha comunicado que la indometacina y el didofenaco reducen la síntesis tanto de prostaglandinas como de leucotrienos. La importancia clínica de la selectividad de COX-2 se investiga en la actualidad. La eficacia probablemente no sea afectada, pero la seguridad gastrointestinal puede mejorarse.

Durante la terapéutica con estos fármacos, la inflamación se reduce por la disminución en la liberación de los mediadores de los granulocitos, basófilos y células plasmáticas. Los AINE disminuyen la sensibilidad de los vasos a la bradicinina e histamina, afectan la producción de linfocina a partir de los linfocitos T y revierten la vasodilatación. En grados variables, todos los AINE recientes son analgésicos, antiinflamatorios y antipiréticos, todos (excepto el fármaco selectivo COX-2), inhiben la agresión plaquetaria. También son irritantes gástricos, aunque como grupo tienden a originar menos irritación gástrica que la aspirina. Se ha observado nefrotoxicidad creciente en todos estos fármacos, para lo cual se ha informado un número elevado de experiencias y la hepatotoxicidad también puede suceder con cualquier AINE (Payan, 1996).

Indometacina

Este fármaco se puso a la venta en 1963, es un derivado del indol, es un potente inhibidor de la COX no selectivo y puede inhibir fosfolipasa A y C, reducir la migración de polimorfonucleares (PMN) y disminuir la proliferación de células T y B. La indometacina se absorbe bien después de su administración oral, pero disminuye en edad avanzada. Su metabolismo se efectúa en el hígado y toma lugar en la extensa circulación hepática. El fármaco se excreta sin cambios en bilis y orina. El probenecid prolonga su vida media de 2 a 11 horas al inhibir tanto la depuración renal como la biliar (Insel, 1996).

Su fórmula es la siguiente:



Indometacina

Aspectos históricos del descubrimiento de las PG y los IPS

Propiedades farmacológicas. La indometacina posee notables propiedades antiinflamatorias, analgésicas y antipiréticas, que son semejantes a las de los salicilatos.

Los efectos antiinflamatorios de la indometacina se manifiestan en sujetos con artritis reumatoide y otros tipos de estas enfermedades que

induyen la gota aguda. El fármaco en cuestión es más potente que la aspirina, pero las dosis que toleran los sujetos con artritis reumatoide no producen efectos que sean superiores a las de los salicilatos. La indometacina posee propiedades analgésicas diferentes de sus efectos antiinflamatorios, hay datos de que actúa en el ámbito de sistema nervioso central y del periférico y es también antipirética.

Farmacodinética y metabolismo. Después de ingerida, la indometacina se absorbe en forma rápida y casi completa por vías gastrointestinales. La concentración máxima en plasma se alcanza en término de dos horas en el sujeto en ayuno, pero puede tardar un poco más si el medicamento se ingiere después de la comidas. No se han valorado en forma definitiva las concentraciones plasmáticas necesarias para lograr efecto antiinflamatorio, pero quizá sean menores de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Las concentraciones en equilibrio dinámico en plasma después de administración durante largo tiempo son de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en promedio. La indometacina se une al 90% de las proteínas plasmáticas y también lo hace en forma extensa a los tejidos. Su concentración en LCR es pequeña, en líquido sinovial es igual a la del plasma, en el término de cinco horas después de la administración.

La indometacina es convertida a metabolitos inactivos, incluidos aquellos que se forman por O-desmetilación (en promedio, 50%), conjugación con ácido glucurónico (en promedio, 10%) y N-deacilación. Algunos de los metabolitos mencionados son detectables en plasma y los metabolitos libres y conjugados se eliminan por orina, bilis y heces. Hay recirculación enterohepática de los conjugados y quizá de la propia indometacina. Se sabe

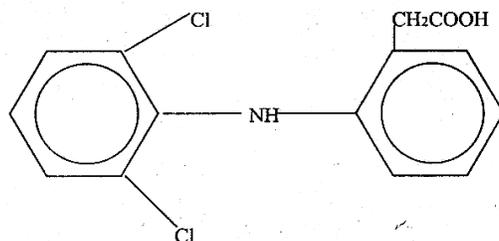
que del 10 a 20% del fármaco se excreta sin modificaciones en orina y ello se debe en parte a la secreción tubular. La vida media en plasma es variable, quizá por la recirculación enterohepática, pero es de una tres horas (Insel, 1996).

Reacciones adversas. Con altas dosis, al menos una tercera parte de pacientes presenta reacciones a la indometacina que requiere la suspensión del fármaco. Los efectos gástricos pueden incluir dolor abdominal, diarrea, hemorragia gástrica y pancreatitis. De 15 a 25% de los enfermos experimenta cefalea que quizá se relaciona con desvanecimientos, confusión o depresión. En pocas ocasiones se ha observado casos de psicosis con alucinaciones, tal vez esperados por la semejanza estructural entre indometacina y serotonina. Las anomalías hepáticas son infrecuentes. Se han observado reacciones hematológicas graves, incluyendo trombocitopenia y anemia aplásica, la hiperpotasemia se relaciona con la inhibición del efecto de las prostaglandinas sobre los riñones. Se ha informado de varias interacciones con otros fármacos, (Payan, 1996)

Didofenaco (voltaren)

Es un antiinflamatorio que ha sido aprobado para diversos usos en Estados Unidos, derivado simple del ácido fenilacético que semeja al flurbiprofeno y al medofenamato. Es un inhibidor potente de la ciclooxigenasa relativamente no selectivo, además disminuye la biodisponibilidad del ácido araquidónico.

Su fórmula es la siguiente:



Propiedades farmacológicas. El diclofenaco posee actividades analgésicas, antipiréticas y antiinflamatorias. Su potencia es sustancialmente mayor que la indometacina, el naproxeno y otros fármacos.

Farmacocinética y metabolismo. Después de ingerido el diclofenaco se absorbe en forma rápida y completa, en el plasma se alcanzan concentraciones máximas en términos de dos a tres horas. La administración simultánea con los alimentos torna lento el ritmo de absorción, pero no la magnitud de la misma. Se advierte un notable efecto de primer paso, de tal manera que a nivel sistémico se detecta sólo el 50% del fármaco, aproximadamente. El producto se liga ampliamente a proteínas plasmáticas (99%) y su vida media en plasma es de una a dos horas. Se acumula en líquido sinovial después de su ingestión, lo cual explica la duración del efecto terapéutico que es considerablemente más larga que su vida media plasmática. El diclofenaco se metaboliza en el hígado por acción de una isoenzima de la subfamilia CYP2C del citocromo P450 para 4-hidroxiclofenaco que es el metabolito principal y otras formas hidroxiladas; después de la glucuronidación y sulfatación, los metabolitos se excretan en orina (65%) y en bilis (35%).

Aplicaciones terapéuticas. El didofenaco sódico (Voltaren) es utilizado en Estados Unidos para el tratamiento sintomático a largo plazo de artritis reumatoide, osteoartritis y espondilitis anquilosante. La dosis diaria corriente contra dichas enfermedades es de 100 a 200 mg en varias fracciones. Puede ser útil también por breves lapsos en lesiones musculares agudas, hombro con dolor agudo (tendinitis bicipital y bursitis subdeltoidea), dolor posoperatorio y dismenorrea. En Europa, se distribuye (una tableta con cubierta entérica) que combina 50 mg de didofenaco y misoprostol, análogo de la prostaglandina. Los datos iniciales sugieren que no se pierde la eficacia del didofenaco y se reduce su toxicidad con el empleo de la asociación mencionada. Además, se cuenta con una solución oftálmica del fármaco para tratar la inflamación posoperatoria después de extracción de cataratas.

Efectos adversos. Se presentan en aproximadamente el 20% de los pacientes e induce malestar gastrointestinal, hemorragia gastrointestinal oculta y ulceración gástrica, aunque puede haber úlceras en menor frecuencia que con otros AINE (Insel, 1996).

Para corroborar la actividad antiinflamatoria de un fármaco o extracto, es preciso inducir experimentalmente el proceso inflamatorio, para lo cual se han utilizado **diferentes modelos biológicos**.

- 1) Inflamación aguda. La inflamación es inducida en la oreja de los ratones aplicando tópicamente el ácido araquidónico o aceite de algodón en la superficie de la oreja de los ratones, con la ayuda de unas pinzas de disección y dos cojines, hasta que la oreja está completamente mojada,

las orejas son removidas y pesadas en una balanza de torsión Roller – Smith y comparadas contra el peso de una oreja sin tratamiento (Tonnelli y col. 1965, Kim y col. 1987, Della y col. 1994 y Onwukaeme 1995).

- 2) Inflamación inducida por carragenina. En las ratas la inflamación es inducida en la pata trasera con inyecciones de carragenina al 1% midiendo el volumen de la pata antes y después de la inyección de carragenina (Winter y col., 1962; Valencia y col., 1994; Sarwar y col, 1995; Duwiejum y col., 1993 y Cárdenas y col., 1993).
- 3) Inflamación granulomática. Es inducida insertando pellets de algodón por debajo de la axila en ratas, después del tratamiento se remueve el algodón, se seca y se pesa, por diferencia se saca el peso ganado para saber si hubo inflamación, comparando la rata testigo, con las ratas tratadas con algún fármaco inhibidor de la inflamación (Pérez y col., 1995, Lee y col., 1998, Hernández, 2000).
- 4) Inflamación crónica. Es inducida provocando artritis por inyección subplantar con *Mycobacterium butyricum* suspendida en aceite mineral (Lee y col, 1998), y también se utiliza el adyuvante de Freud, el cual contiene 10 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis*, aplicándose de la misma manera que la anterior, se mide el volumen de la pata antes y después de la inyección (Kweifio y col., 1995, Duwiejum y col., 1993).
- 5) Método de la bolsa de aire. La inflamación es inducida subcutáneamente, formando una bolsa de aire en el dorso. Un grupo de 20 ratas inyectadas con 20 mL de aire, en un área de tejido del dorso

subcutáneamente, las ratas son inyectadas con 10 mL de aire en la misma cavidad 2 días después, 4 días después se les aplica la inyección inicial de 20 mL y 2 mL de solución de carragenina al 1% en solución salina al 0.9%. Los animales son sacrificados y se colecta el pus por aspiración. Posteriormente se transfiere a unos tubos de ensayo con hielo y una alícuota es diluida y usada para contar el número de leucoditos con un contador Coulter (Godoy y col., 1998).

Liofilización

El agua se elimina generalmente utilizando un dispositivo de destilación al vacío y la técnica de liofilización con el propósito de utilizar bajas temperaturas y evitar la descomposición de las sustancias extraídas de la planta

La liofilización es una técnica especial de volatilización utilizada para eliminar el agua mediante sublimación selectiva al vacío, de muestras congeladas. Este proceso es importante en el secado de tejidos biológicos, ya que la mineralización posterior por ataque de ácidos es notablemente más rápida y sencilla. Las principales ventajas de esta técnica son las siguientes, la temperatura utilizada no es nunca elevada, por lo que las pérdidas por volatilización son menores que por el procedimiento de vaporización sin ebullición. Por ejemplo, en muchas muestras biológicas sólo se observa una pérdida del 3% de compuestos organomercurícos, que son extraordinariamente volátiles. Al evitar la exposición de la disolución a un calentamiento prolongado se evitan pérdidas por adsorción, la técnica permite el tratamiento directo de fluidos y tejidos biológicos, dejándolos completamente secos y aptos para ser mineralizados con rapidez. Los inconvenientes más importantes son: el proceso es más lento que el de vaporización a temperaturas elevadas, y sólo puede utilizarse para disoluciones acuosas (Varcárcel y Gómez, 1994).

II. JUSTIFICACIÓN

Estudios con plantas medicinales del género *Sedum* han demostrado que algunas poseen sustancias químicas que tienen diferentes actividades farmacológicas. Debido a esto es de gran interés investigar químicamente y farmacológicamente a *Sedum praecaltum* DC.

Actualmente la medicina utiliza fármacos sintéticos para aliviar todas las enfermedades. Muchos de estos fármacos son benéficos, pero también muchos por su mal uso o abuso, han perdido la eficacia y en incontables casos han provocado efectos secundarios nocivos.

Por fortuna, en los últimos años ha resurgido el interés por el regreso a la naturaleza y por lo tanto es necesaria una nueva relación con el medio ambiente, llevando una vida menos artificial y recurriendo a las plantas no sólo para incluirlas en nuestra alimentación, sino también para tratar ciertos padecimientos.

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad antiinflamatoria de *Sedum praedaltum* DC. en rata y determinar si la respuesta es dependiente de la dosis

OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir el proceso inflamatorio (modelo del granuloma)
- Evaluar el efecto antiinflamatorio del liofilizado de la siempreviva (*Sedum praedaltum* DC.) a diferentes dosis
- Evaluar mediante técnicas histológicas y hematológicas, el efecto antiinflamatorio
- Determinar la DL₅₀

IV. MATERIAL Y MÉTODOS

La planta se colectó en los jardines de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional (ENCB- IPN) de la Ciudad de México, y fue identificada por la Bióloga Delfina Ramos Zamora, en el departamento de Botánica de la misma Institución.

Obtención del liofilizado

Se pesaron aproximadamente 2 kg de planta fresca, las hojas fueron separadas del tallo, este último se desechó en tanto que las hojas se trituraron, esto se colocó en un recipiente con aproximadamente 4 litros de agua, se dejó hervir por espacio de 5 minutos, posteriormente se filtró y el filtrado se colocó en un matraz balón, para evaporar el agua a baja presión con ayuda de una bomba de vacío, el concentrado se sometió al proceso de liofilización, el rendimiento fue de 16.7 g (1.67%), considerando el peso total de la planta fresca, incluyendo hojas y tallo.

Estudio farmacológico

Se pesaron 50 mg de algodón (ced-vac), se elaboraron pellets. Se utilizaron 24 ratas Wistar hembras de 180 ± 20 g de peso corporal, las cuales fueron pesadas, marcadas y distribuidas aleatoriamente en seis grupos (4 ratas por lote). Se mantuvieron en el bioterio a temperatura constante (22 a 24°C) y con una humedad relativa de 50 a 55%. Fueron alimentadas con Lab

Diet 5001, Purina, y agua *ad libitum*. Las ratas fueron anestesiadas con éter etílico, se realizó una incisión subcutánea por debajo de la axila, de aproximadamente 1 cm de longitud, para introducir el pellet de algodón (modelo del granuloma). La herida fue cerrada con sutura de nylon (4-0 y 5-0), realizando 3 puntadas como máximo. Este procedimiento se realizó con cada uno de los animales de experimentación (Lee y col., 1998).

Posteriormente se administró el siguiente tratamiento por vía oral con ayuda de una cánula, durante siete días: grupo I, testigo, (bicarbonato de sodio al 5%), dos testigos positivos uno tratado con indometadina en solución de NaHCO₃ al 5% Sigma Co. (St Lous, MO) (5 mg/kg de p. c.) y otro con didofenaco en la misma solución (voltaren 5 mg/kg de p. c.), donado por los laboratorios Ciba-Geigy de México, los lotes IV, V y VI, fueron tratados con el liofilizado de *Sedum praealtum* a diferentes concentraciones, (100, 200, 300 mg/kg de p. c. respectivamente).

Al finalizar el tratamiento las ratas fueron sacrificadas, los granulomas se retiraron y se pesaron para obtener el peso ganado por el pellet (peso húmedo), una vez pesados se colocaron en la estufa a una temperatura de 60°C, hasta obtener un peso constante (peso seco) de esta manera conocer la diferencia de peso de los granulomas entre los grupos tratados.

Análisis hematológico

Al inicio y al final del tratamiento se obtuvieron muestras de sangre de la vena caudal, para determinar la cuenta de leucocitos totales (apéndice 1), también se realizó una cuenta diferencial de sangre periférica (apéndice 2).

Estudio histológico

Se tomaron muestras del tejido del área en contacto con el granuloma, se fijaron en una solución de formaldehído al 10%, para realizar posteriormente el análisis histológico (apéndice 3).

Determinación de la dosis letal cincuenta (DL₅₀)

Se utilizaron 20 ratas hembra de la cepa Wistar de 200 ± 10 g de peso corporal, las cuales fueron marcadas y distribuidas aleatoriamente en 5 lotes con 4 animales cada uno, el testigo (vehículo, agua), y a los cuatros restantes se les administró el liofilizado de *Sedum praealtum* en concentraciones de 500, 1500, 2000 y 3000 mg/kg de p. c. por vía oral; los animales se mantuvieron en observación durante siete días, al término de este período se registró el número de animales vivos y muertos para calcular la DL₅₀.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en todos los experimentos se sometieron a un tratamiento estadístico, en el cual se obtuvo la media de cada uno de los grupos y la desviación estándar. Se utilizó el análisis de varianza. La prueba de Duncan se utilizó para determinar si existe diferencia significativa entre grupos con una $p < 0.05$.

V. RESULTADOS

Efecto antiinflamatorio de *Sedum praealtum*

Los pesos húmedo, seco y final de los granulomas fueron menores en los grupos tratados con indometacina, diclofenaco (voltaren), y el liofilizado de *Sedum praealtum* a las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de p. c., respecto al grupo testigo. Esta disminución fue dosis dependiente para el liofilizado (tabla 3).

Los resultados obtenidos para peso húmedo del granuloma, en los grupos tratados con indometacina y el liofilizado de siempreviva a la dosis de 300 mg/kg de p.c. mostraron una disminución estadísticamente significativa con respecto al grupo testigo ($p < 0.05$) (tabla 3, figura 2).

El peso seco del granuloma disminuyó en todos los grupos experimentales con respecto al grupo testigo. Se observó un comportamiento similar en los grupos tratados con indometacina, diclofenaco (voltaren) y el liofilizado a 300 mg/kg de p.c. ($p < 0.05$) (tabla 3, figura 3).

Los resultados obtenidos para el peso final del granuloma fueron similares a los del peso seco, ya que se observó el mismo comportamiento del peso seco para los grupos tratados con indometacina, diclofenaco y el liofilizado de siempreviva a la dosis más alta (300 mg/kg de p.c.), esta disminución fue estadísticamente significativa, ($p < 0.05$), con respecto al grupo testigo (tabla 3. figura 4). En todos los pesos la disminución que se produjo fue dependiente de la dosis del liofilizado.

Tabla 3. Efecto antiinflamatorio de *Sedum praealtum* en tejido de rata

Tratamiento	Peso húmedo del granuloma (mg)	Peso seco del granuloma (mg)	Peso final del granuloma (mg)
Control	0.524 ± 0.03 (12)	0.112 ± 0.006 (12)	62.5 ± 6.0 (12)
Indometacina 5 mg/kg	0.444 ± 0.022* (10)	0.091 ± 0.003* (10)	41.5 ± 3.0* (10)
Didofenaco 5 mg/kg	0.478 ± 0.018 (8)	0.094 ± 0.002* (8)	44.2 ± 2.0* (8)
Liofilizado 100 mg/kg	0.537 ± 0.018 (12)	0.102 ± 0.004 (10)	55.1 ± 4.0 (12)
Liofilizado 200 mg/kg	0.467 ± 0.033 (10)	0.099 ± 0.006 (10)	50.1 ± 6.0 (10)
Liofilizado 300 mg/kg	0.428 ± 0.020* (8)	0.091 ± 0.003* (8)	42.8 ± 3.0* (8)

- Se representa la media ± error estándar
- Los números dentro del paréntesis indican los animales utilizados
- * p<0.05
- Peso húmedo: peso del granuloma extraído del cuerpo de la rata
- Peso seco: peso constante del granuloma obtenido a una temperatura de 80°C
- Peso final: peso seco- menos el peso del pellet de algodón

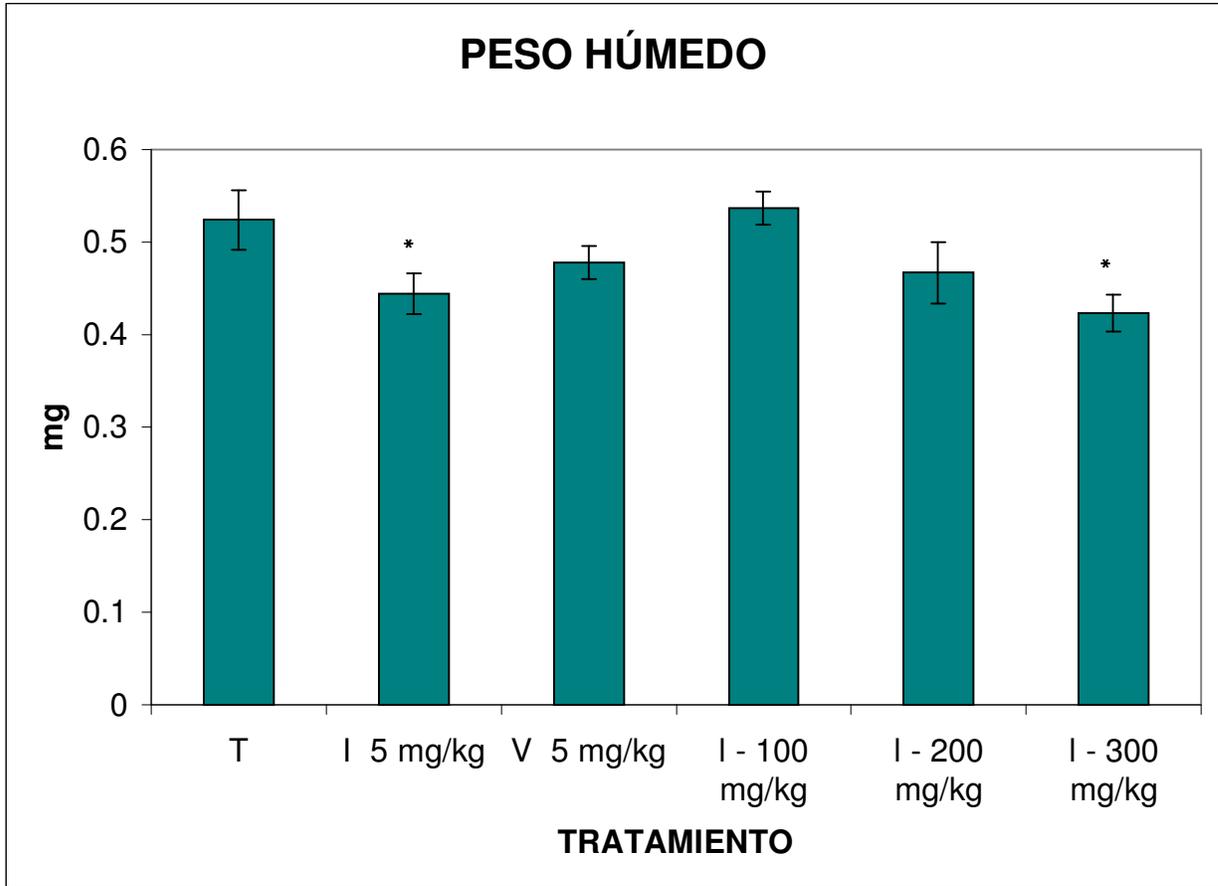


Figura 2. Efecto de *Sedum praealtum* sobre la inflamación inducida por el método del granuloma. Se observó una disminución estadísticamente significativa en el peso húmedo del granuloma en los grupos tratados con indometacina, y el liofilizado de *S. praealtum* a la dosis más alta, respecto al grupo testigo. * $P < 0.05$

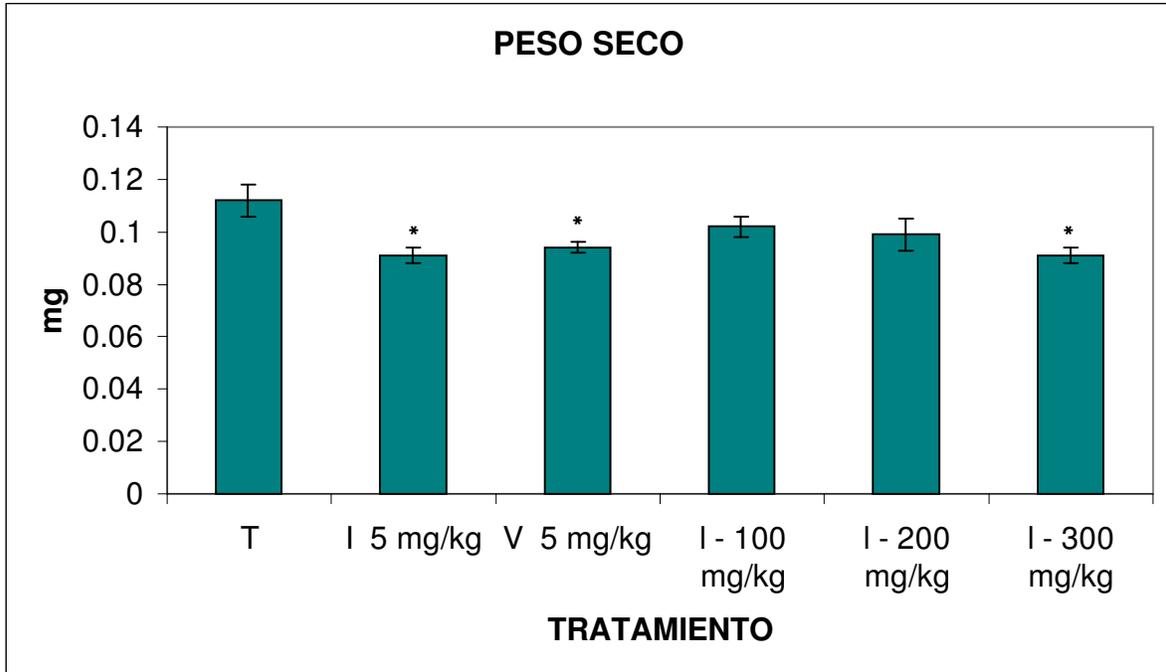


Figura 3. Efecto antiinflamatorio de *Sedum praealtum* sobre el peso seco del granuloma. En los grupos tratados con indometacina, didofenaco y el liofilizado de siempreviva a la dosis de 300 mg/kg, se observó una disminución en el peso del granuloma respecto al grupo testigo. *P<0.05

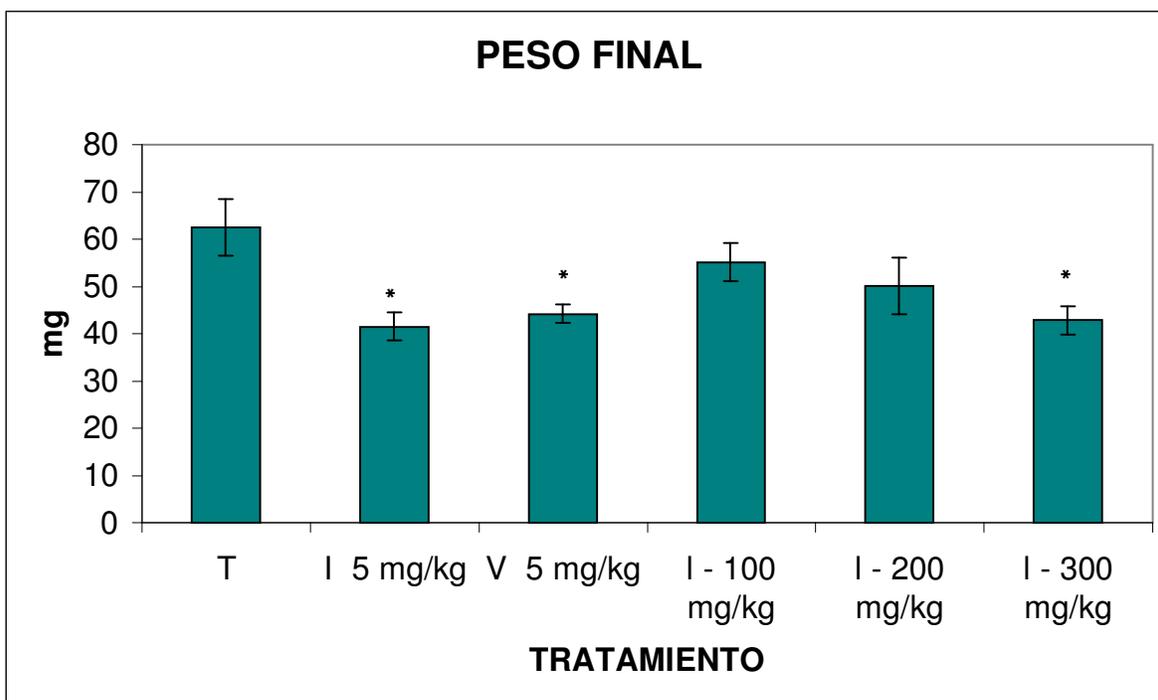
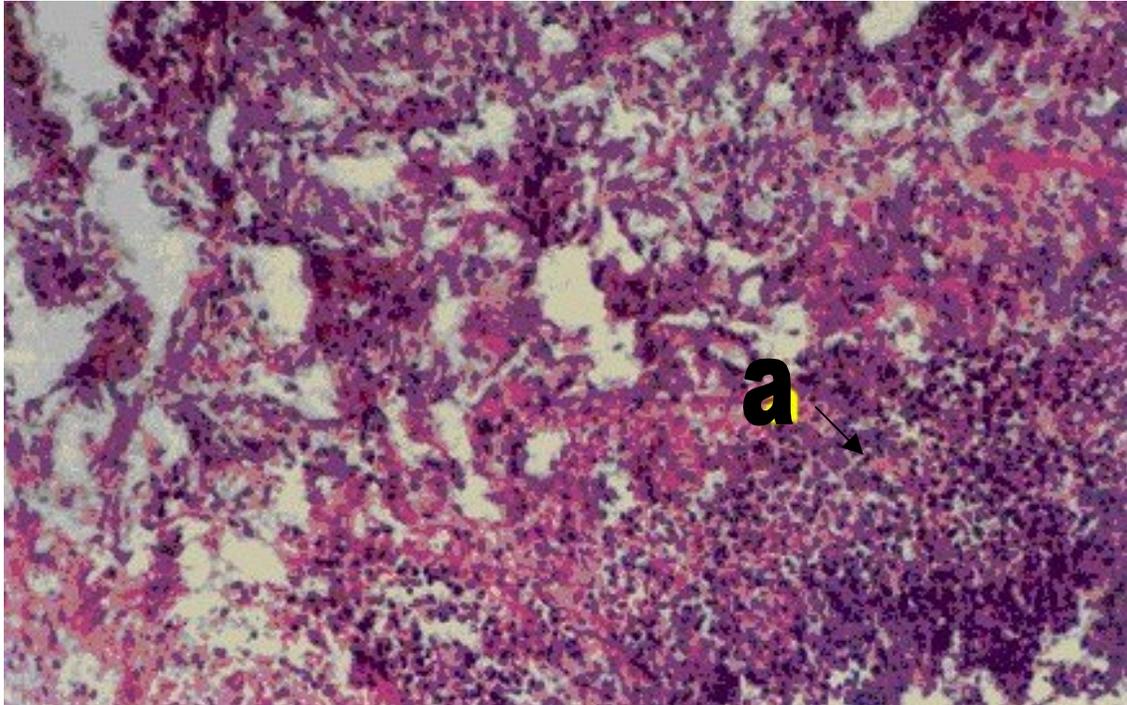


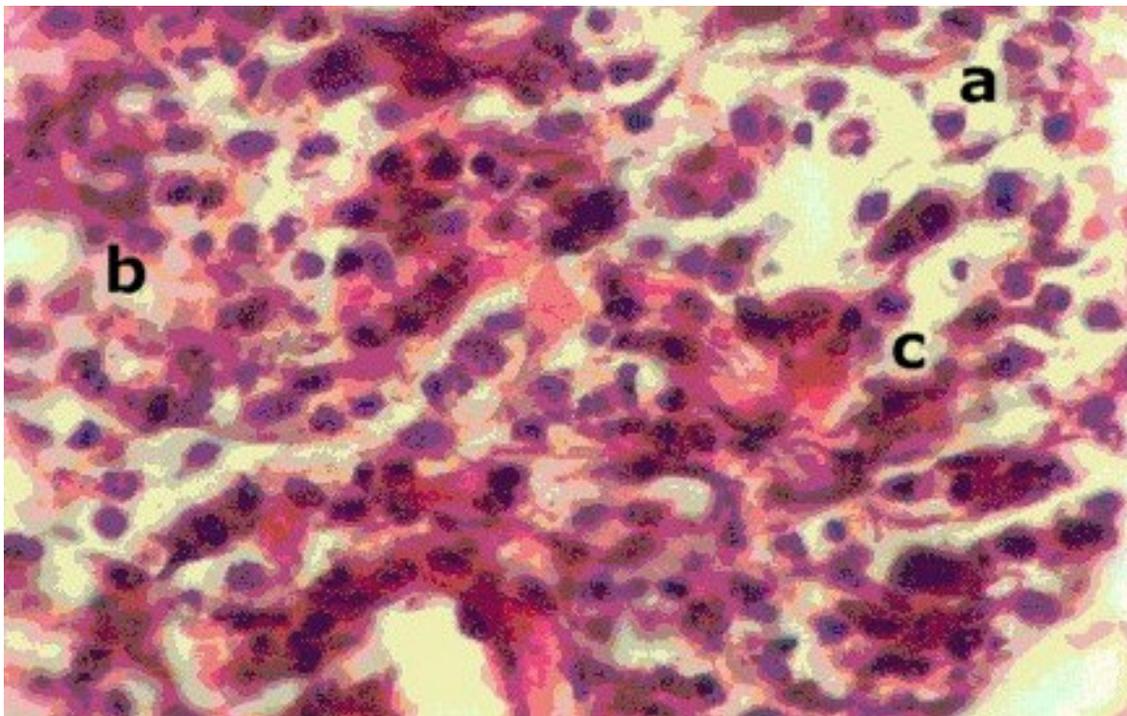
Figura 4. Efecto de *Sedum praecaltum* sobre el peso final del granuloma. El peso final del granuloma disminuye en los grupos tratados con indometacina, y el liofilizado de *S. praecaltum* a la dosis de 300 mg/kg respecto al grupo testigo. Para la dosis más baja de liofilizado, no se hubo diferencia estadísticamente significativa en el peso del granuloma. $p < 0.05$

Estudio histológico del efecto antiinflamatorio de *Sedum praecaltum* en tejido subcutáneo de rata.

Los resultados obtenidos en el análisis histológico son los siguientes: Para el grupo testigo, se observa tejido conjuntivo con una gran cantidad de células características del proceso inflamatorio (fotografía 2), como son: células cebadas, neutrófilos polimorfonucleares, consideradas de las primeras células en llegar al área donde se produce una lesión, durante los primeros minutos, también hay células plasmáticas (edema) y una gran cantidad de eritrocitos debido a la hemorragia provocada por el daño tisular (fotografía 3).

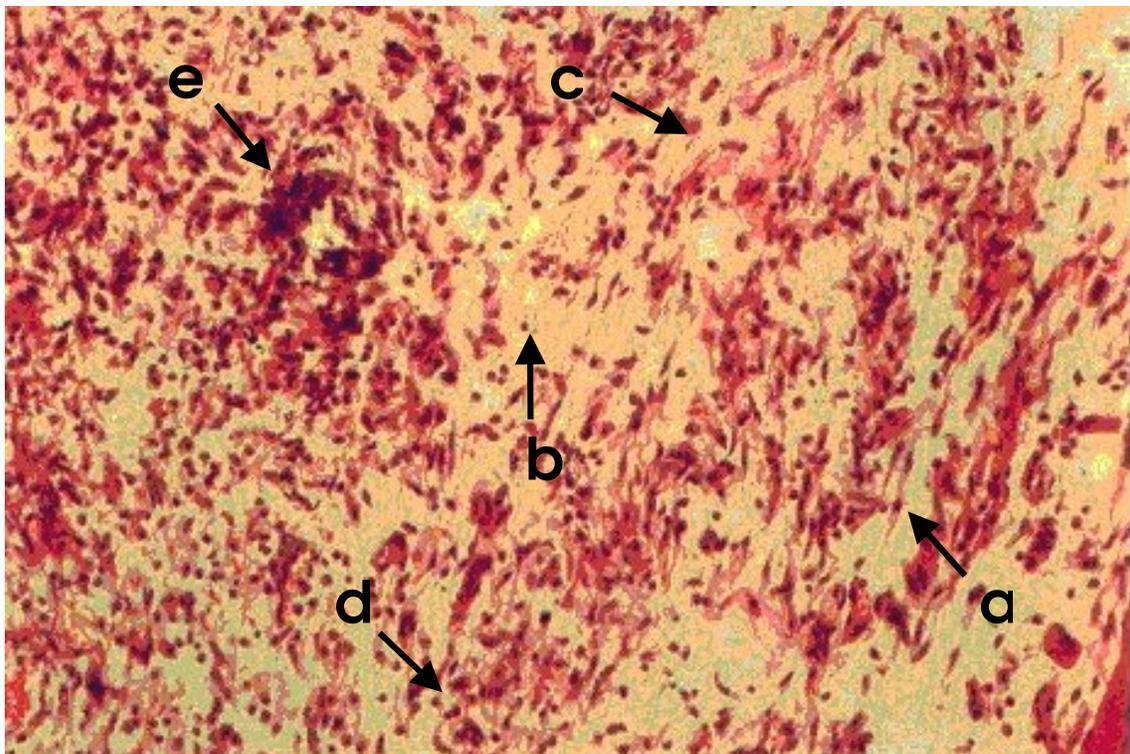


Fotografía 2. Corte de piel de rata en contacto con el granuloma (a), testigo negativo. Reacción inflamatoria. Se observa una gran cantidad de células. Tinción H-E. Aumento 10X.

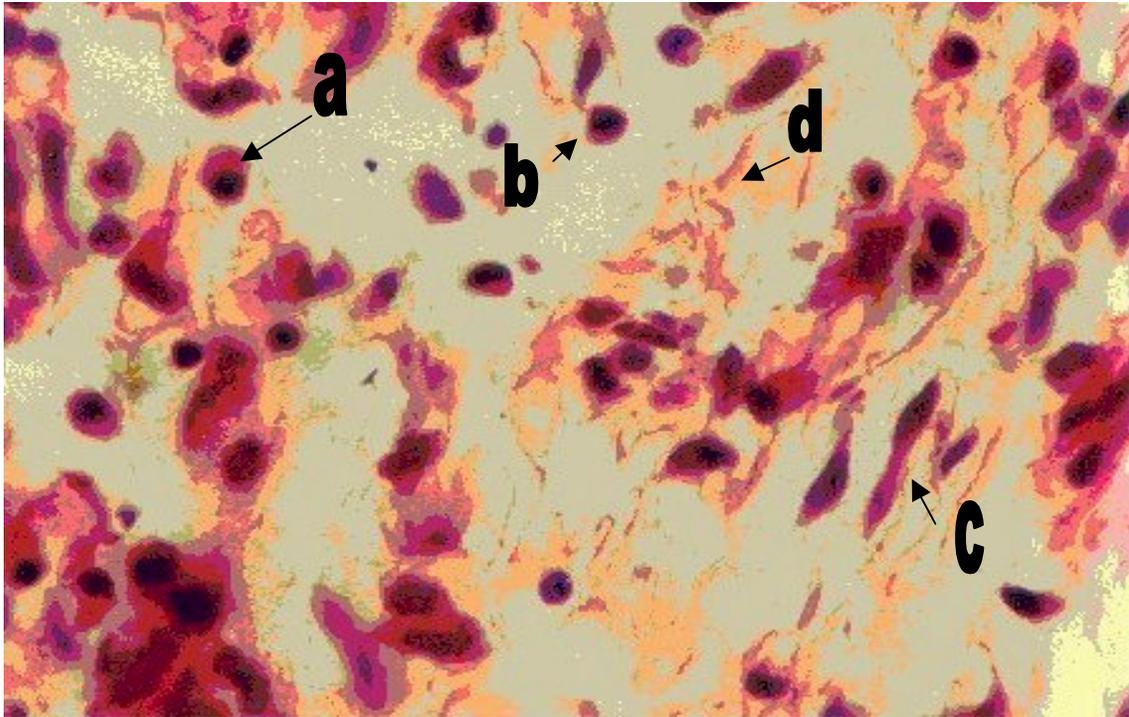


Fotografía 3. Corte de piel de rata, cerca del área del granuloma. Se observa la reacción inflamatoria, por la presencia de neutrófilos (polimorfonucleares) (a), células plasmáticas (b) y hemorragia (c). Tinción H-E. Aumento 40X.

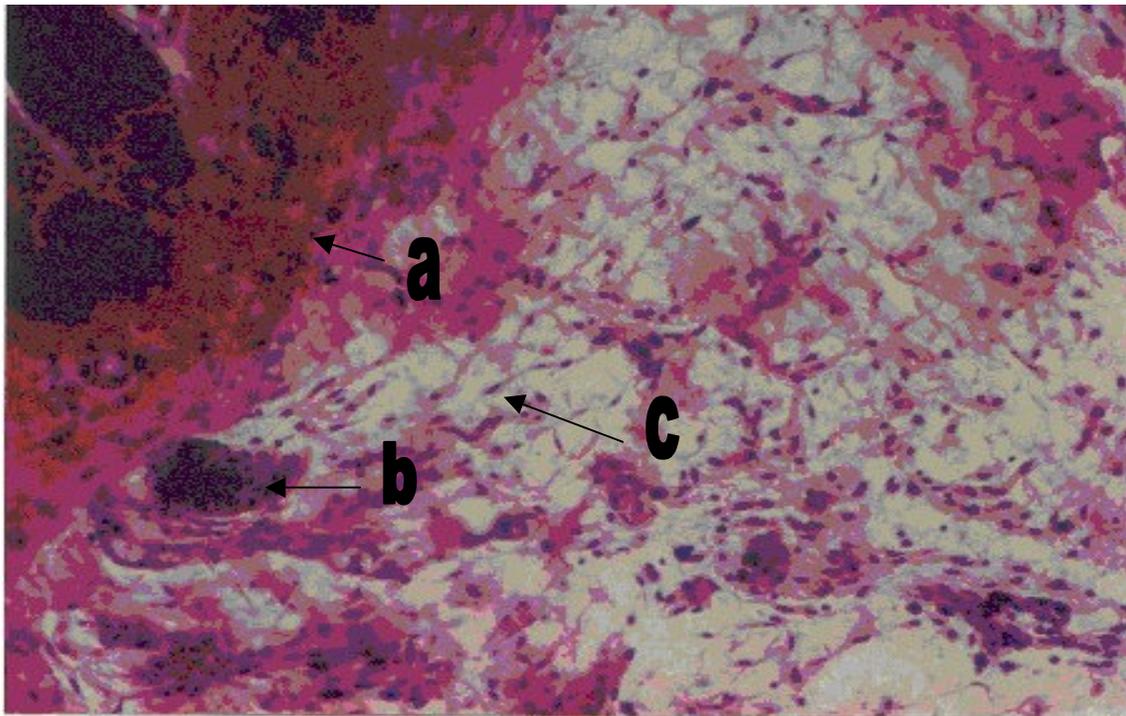
En el grupo tratado con indometadina (5 mg/kg), se observan fibroblastos, fibras de colágena, característicos del proceso de reparación normal, las células cebadas, plasmáticas y los eritrocitos disminuyeron considerablemente, debido a la disminución del proceso hemorrágico (fotografías 4 y 5) respecto al grupo testigo (fotografía 2), el grupo tratado con didofenaco (voltaren) (fotografía 6), mostró tener menor efecto antiinflamatorio que la indometadina (fotografía 4), se observan una gran cantidad de eritrocitos (hemorragia), vasos sanguíneos congestionados y fibroblastos (fotografía 6 y 7).



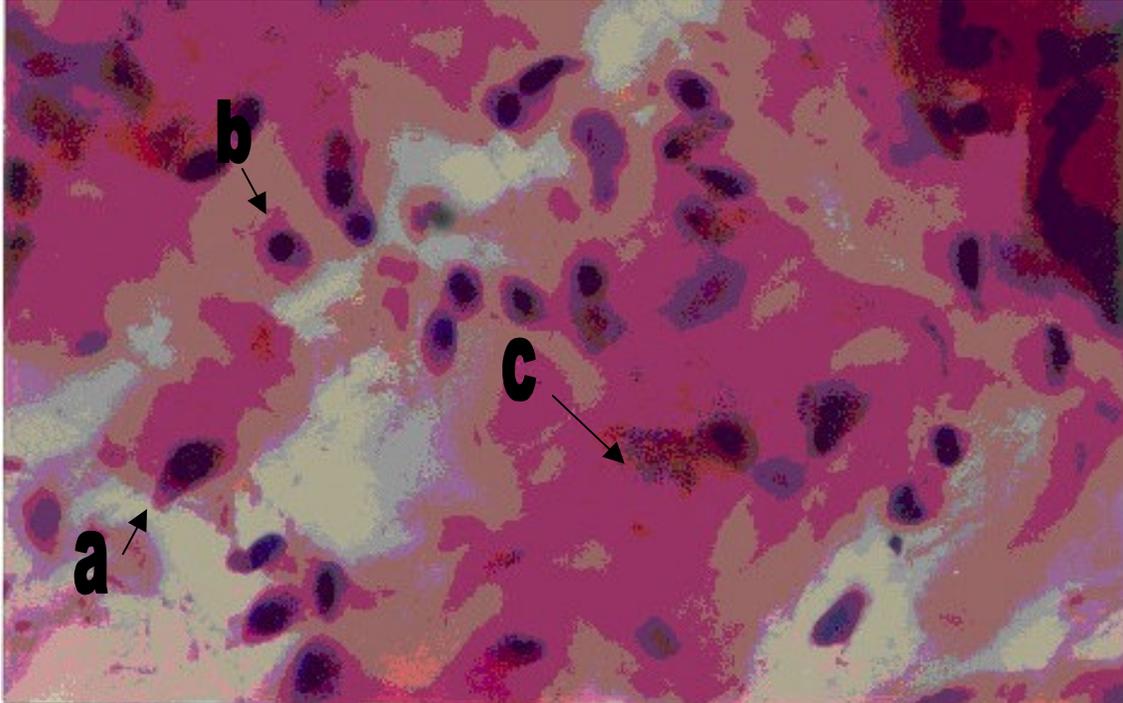
Fotografía 4. Corte de piel de rata. Tratada con indometadina (5 mg/kg de p.c.). Se observa menor cantidad de células características del proceso inflamatorio. Presencia de fibroblastos (a) y fibras de colágena (b) características del tejido conjuntivo. Sin embargo, se observan células plasmáticas (c), células cebadas (d) y vasos sanguíneos (e). Técnica H-E. Aumento 10X.



Fotografía 5. Corte de piel de rata tratada con indometadina 5 mg/kg de p.c. a mayor aumento. Se observan, células plasmáticas (**a**) y linfocitos (**b**), debido al proceso inflamatorio. También se observan fibroblastos (**c**) y fibras de colágena (**d**), propias del tejido conjuntivo. La reacción inflamatoria se observa disminuida. Técnica H-E. Aumento 40X.



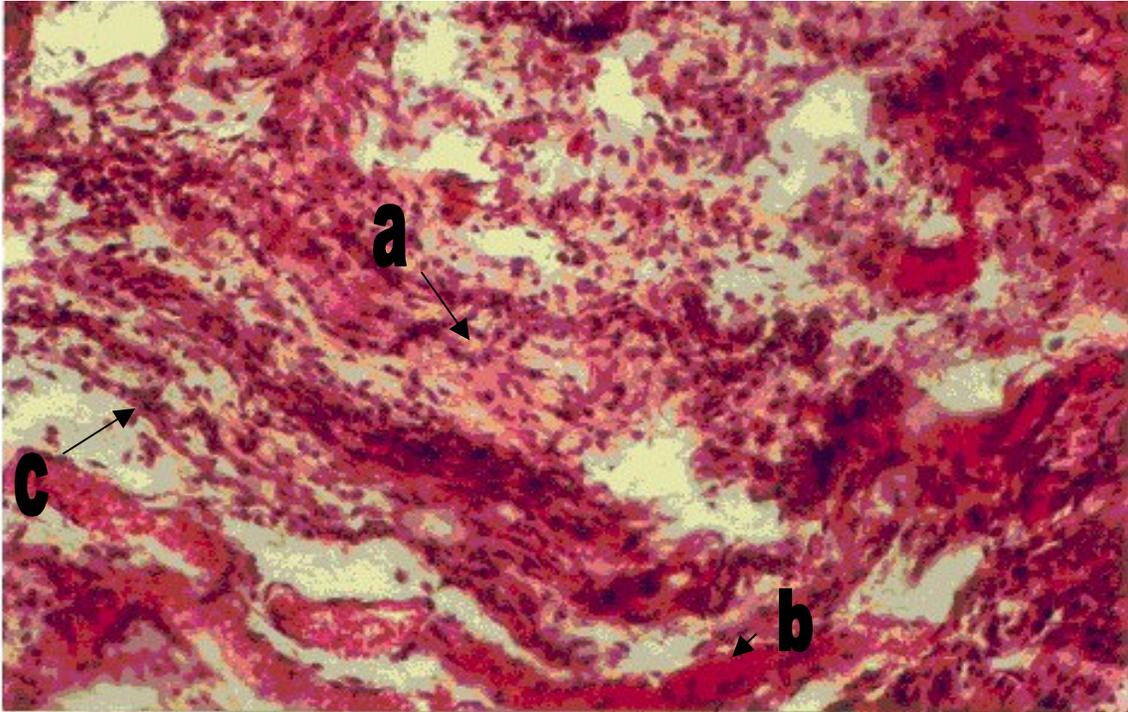
Fotografía 6. Corte de piel de rata tratado con didofenaco (voltaren), 5 mg/kg de p.c. Se observa hemorragia cerca del área del granuloma (**a**), vasos sanguíneos congestionados (**b**), y fibroblastos (**c**). Técnica H-E. Aumento 10X.



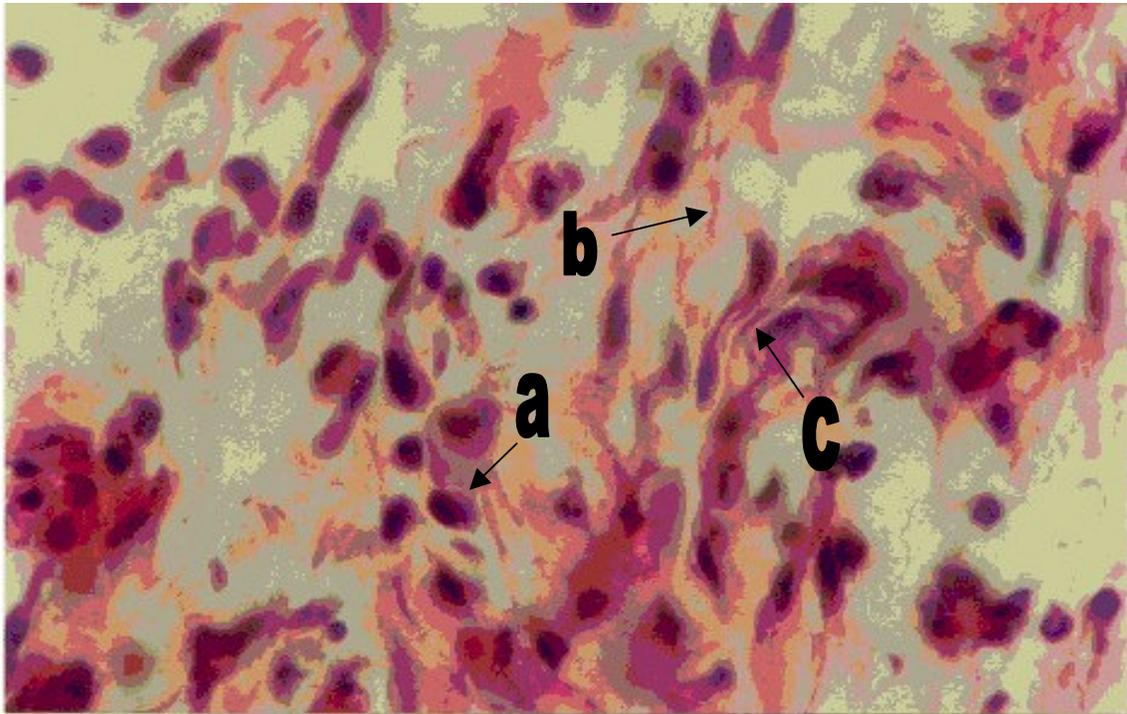
Fotografía 7. Corte cerca del área del granuloma. Piel de rata. Testigo positivo. Tratado con diclofenaco (voltaren), 5 mg/kg de p.c. Se observan células plasmáticas (**a**), células cebadas (**b**) y hemorragia (**c**), el proceso inflamatorio se observa disminuido en comparación con el testigo negativo. Técnica H-E. Aumento 40X.

Para el grupo tratado con el liofilizado de *Sedum praealtum* a 100 mg/kg de p. c. se observan células cebadas, hemorragia, y algunos fibroblastos debido a la lesión sufrida en el tejido (fotografía 8 y 9).

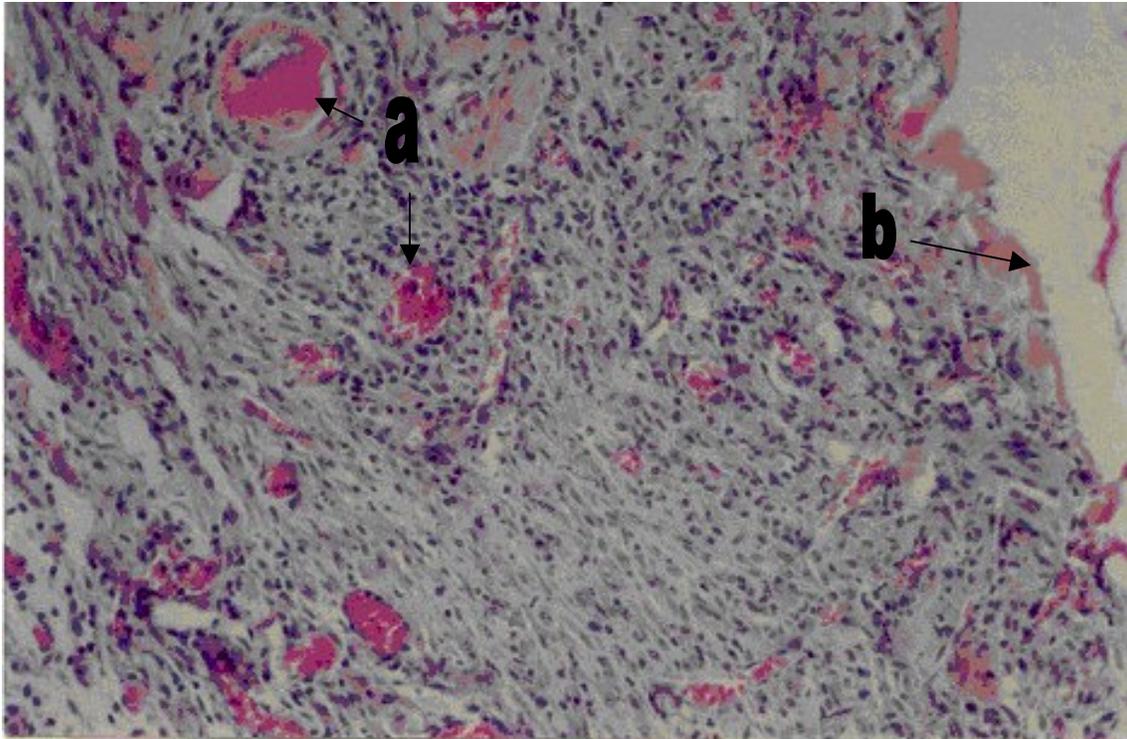
En el grupo tratado con el liofilizado de siempreviva a la dosis de 200 mg/kg de p. c., se observa que el número de eritrocitos disminuyó, ya no hay presencia de hemorragia, sólo se observan algunos vasos sanguíneos congestionados, las fibras de colágena aumentaron considerablemente (fotografía 10), respecto al grupo testigo (fotografía 2) y al grupo tratado con la dosis más baja de liofilizado de siempreviva (100 mg/kg de p.c.) (fotografías 8 y 9), el número de fibroblastos también aumentó (fotografía 11) respecto al grupo testigo.



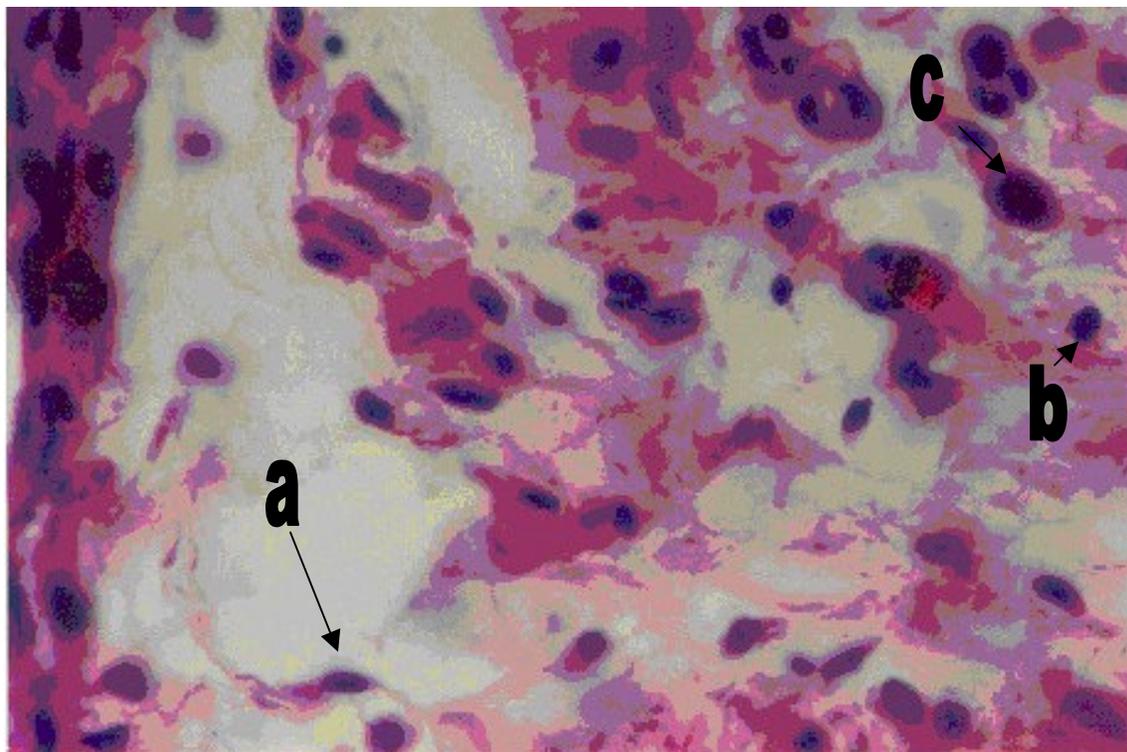
Fotografía 8. Corte de piel de rata, área en contacto con el granuloma. Tratado con el liofilizado de *Sedum praedatum* 100 mg/kg de p.c. Se observan células cebadas (a), hemorragia (b) y fibroblastos (c). Técnica H-E. Aumento 10X.



Fotografía 9. Corte del área en contacto con el granuloma. Piel de rata tratada con el liofilizado de *Sedum praedatum* a 100 mg/kg de p.c. Se observan células plasmáticas (a), características del proceso inflamatorio. También se observa colágena (b) y fibroblastos (c), propios del tejido conjuntivo. Técnica H-E. Aumento 40X.

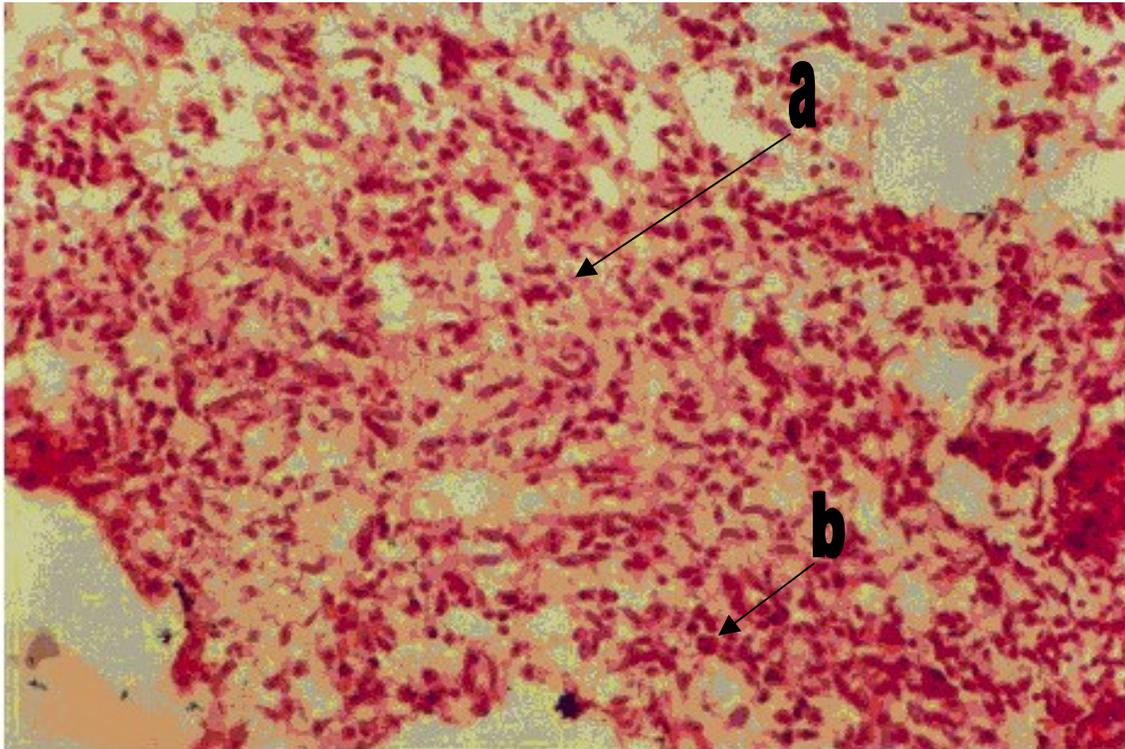


Fotografía 10. Corte de piel de rata. Tratado con el liofilizado de la siempreviva 200 mg/kg de p.c. Presencia de vasos sanguíneos (**a**), y fibras de colágena (**b**), El proceso inflamatorio se observa disminuido. Técnica de H-E. Aumento 10X.

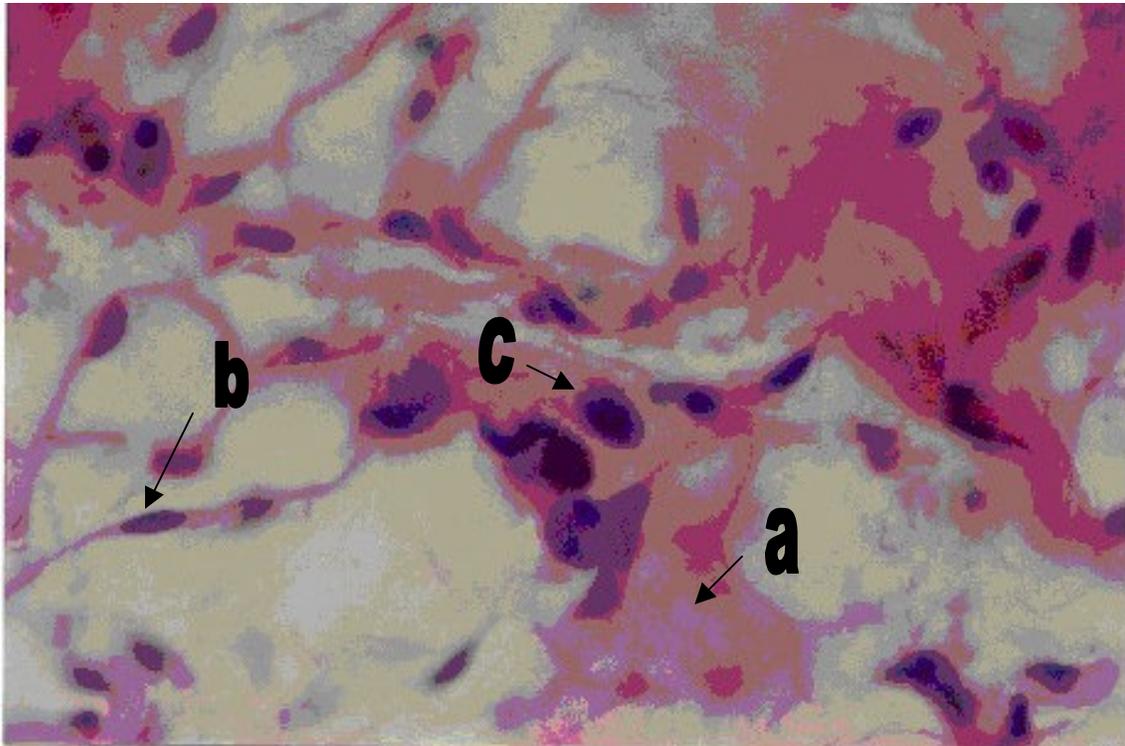


Fotografía 11. Corte de piel de rata. Tratado con el liofilizado de *Sedum praecox* a 200 mg/kg de p.c. Se observan, fibroblastos (**a**), linfocitos (**b**), células cebadas (**c**), la cantidad de células se observa disminuida respecto al grupo testigo. Técnica H-E. Aumento 40X.

En el grupo tratado con la dosis más alta de liofilizado de siempreviva (300 mg/kg de p. c.), se observa menor cantidad de neutrófilos y monocitos, el tejido se observa menos congestionado por estas células, (fotografía 12), con respecto al grupo testigo (fotografía 2 y 3), sin embargo, hay una gran cantidad de colágena y fibroblastos característicos del proceso de reparación normal, a las lesiones, se pueden observar todavía algunas células cebadas y células plasmáticas (fotografía 12 y 13).



Fotografía 12. Corte del área en contacto con el granuloma. Piel de rata. Tratada con el liofilizado de siempreviva a 300 mg/kg de p.c. Presencia de fibras de colágena (**a**), el número de células cebadas disminuyó (**b**). El proceso inflamatorio disminuyó respecto al grupo testigo. Técnica H-E. Aumento 10X.



Fotografía 13. Corte de piel de rata. Tratada con el liofilizado de *Sedum praealtum* a 300 mg/kg de p.c. Se observa mayor cantidad de fibras de colágena (**a**) y fibroblastos (**b**) característicos del tejido conjuntivo. La reacción inflamatoria se observa disminuida. Técnica H-E. Aumento 40X.

Análisis sanguíneo

El número de leucocitos en sangre, aumentó al finalizar el tratamiento, para todos los grupos excepto para los grupos tratados con indometacina y el liofilizado a la dosis más alta (tabla 4). En la cuenta total de leucocitos realizada a todas las ratas de los grupos respectivos al final de los siete días se encontró un aumento en el número de leucocitos respecto al grupo tratado con el vehículo (tabla 4). En los grupos tratados con indometacina, didofenaco y el liofilizado a las dosis utilizadas, la cuenta total de leucocitos dio un valor muy cercano al valor obtenido en el día cero, antes de iniciar el experimento (tabla 4). En las cuentas diferenciales en los extendidos de sangre de ratas se

observó que el porcentaje de polimorfonucleares aumentó en el grupo testigo al final del experimento, (tabla 5).

Tabla. 4. Cuenta de leucocitos totales en sangre de ratas tratadas con el liofilizado de *Sedum praedaltum* inicio y final del tratamiento

Grupo	Inicio	Final
Testigo	18,483 ± 5493	21,506 ± 13882
Indometacina 5 mg/kg	19,000 ± 3390	15,166 ± 7990
Voltaren 5 mg/kg	17,850 ± 3009	18,357 ± 6950
Liofilizado 100 mg/kg	20,360 ± 5525	21,585 ± 5580
Liofilizado 200 mg/kg	21,743 ± 7590	22,356 ± 12.33
Liofilizado 300 mg/kg	21,65 ± 8070	17,110 ± 2275

Al hacer la evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) de *Sedum praedaltum*, a las dosis utilizadas no se observaron efectos tóxicos durante las primeras horas, al término de los siete días no se registró ninguna muerte (tabla 6).

Tabla 6. Evaluación de la toxicidad aguda (DL₅₀) de *Sedum praedaltum* DC.

Dosis (mg/ kg)	No. de organismos vivos	No. de organismos muertos
500	4	0
1500	4	0
2000	4	0
3000	4	0
Testigo	4	0

Tabla 5. Cuentas diferenciales en sangre de ratas, tratadas con el liofilizado de *Sedum praealtum* al inicio y final del experimento.

PROCESO INFLAMATORIO		
Grupo	Inicio del experimento sin tratamiento	Final del experimento con tratamiento
Testigo		
Neutrófilos	21.3 ± 3.159	25.0 ± 7.548
Linfoцитos	72.3 ± 4.068	70.0 ± 10.176
Monocitos	3.75 ± 1.982	3.75 ± 2.692
Eosinófilos	3.3 ± 1.966	11.8 ± 18.130
Bandas	0	3.0
Juveniles	0	1.0
Indometacina 5 mg/kg de p.c.		
Neutrófilos	22.6 ± 4.138	19.7 ± 11.028
Linfoцитos	71.0 ± 4.743	55.6 ± 10.323
Monocitos	3.5 ± 1.511	3.2 ± 1.923
Eosinófilos	3.0 ± 0.866	1.6 ± 0.577
Bandas	1.0 ±	1.5 ± 0.547
Juveniles	0	1
Voltaren 5 mg/kg de p.c.		
Neutrófilos	21.5 ± 0.070	21.5 ± 10.6
Linfoцитos	71.6 ± 3.583	71.6 ± 12.3
Monocitos	4.25 ± 2.375	4.25 ± 1
Eosinófilos	1.8 ± 0.377	1.8 ± 0.54
Bandas	2.0	0
Juveniles	0	0
Liofilizado 100 mg/kg de p.c.		
Neutrófilos	21.3 ± 2.973	17.0 ± 3.0
Linfoцитos	72.6 ± 4.033	79 ± 3
Monocitos	4.1 ± 2.401	2 ± 1
Eosinófilos	3.5 ± 4.978	2 ± 1
Bandas	1.0	1
Juveniles	1.0	1
Liofilizado 200 mg/kg de p.c.		
Neutrófilos	20.8 ± 5.330	20.8 ± 12.386
Linfoцитos	74.1 ± 4.598	74.1 ± 13.801
Monocitos	3.0 ± 1.825	3 ± 1.618
Eosinófilos	3.2 ± 1.581	3.2 ± 27.565
Bandas	2.0	2 ± 0.57
Juveniles	1.0	7.0
Liofilizado 300 mg/kg de p.c.		
Neutrófilos	22.0 ± 4.396	31.1 ± 15.510
Linfoцитos	73.4 ± 4.117	63.6 ± 15.674
Monocitos	3.1 ± 2.267	10 ± 19.141
Eosinófilos	1.0 ± 0.516	2.4 ± 1.988
Bandas	0	1
Juveniles	0	1

VI. DISCUSIÓN

La búsqueda permanente de nuevos fármacos capaces de ofrecer una mejor acción terapéutica y que simultáneamente permitan disminuir los efectos secundarios nocivos sin duda demanda un esfuerzo de investigación constante (Pahlow, 1991).

En el caso particular de los fármacos antiinflamatorios, la mayoría de éstos han sido sintetizados tomando como base la estructura química de algunos preexistentes. Esto ha generado una proliferación de antiinflamatorios con escasas diferencias farmacológicas que en muchos casos da como resultado que también compartan los mismos efectos secundarios. En el presente trabajo se analizó el efecto antiinflamatorio de *Sedum praedatum*, en tejido subcutáneo de rata. El liofilizado de la planta disminuyó el peso del granuloma, de manera similar al de los fármacos no esteroideos (AINE) utilizados como testigos positivos, lo que nos permite sugerir una inhibición del proceso inflamatorio, probablemente mediante la vía de la ciclooxigenasa (Jackson y Morrow, 2001).

Reportes previos claramente han mostrado la inhibición del proceso inflamatorio por medio del método del granuloma (Tonelli y col. 1965, Kim y col. 1987, Della y col. 1994 y Onwukaeme, 1995), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio.

Un hecho importante está en los resultados obtenidos para los grupos tratados con indometacina, didofenaco y el liofilizado de la siempreviva a la dosis más alta (300 mg/kg de p. c.), a lo largo del período de observación (7

días), se observó una inhibición del 66.4% del proceso inflamatorio para indometacina (inhibidor de la COX-1) y para el liofilizado de la siempreviva de 68.4% , respecto al grupo testigo.

Sin embargo, para las dosis más bajas del liofilizado (100 y 200 mg/kg de p. c.), también se presentó inhibición de la actividad inflamatoria, pero en menor proporción que para la dosis más alta, lo cual permite sugerir que el efecto antiinflamatorio es dosis dependiente (Olajide y col., 2001).

Los resultados obtenidos respecto al comportamiento de liofilizado de *S. praedatum*, nos permite señalar los aspectos de su actividad, parecidos al efecto de la indometacina sobre el proceso inflamatorio inducido por el modelo del granuloma, motivo por el cual podemos sugerir que se trate de un antiinflamatorio de tipo no esteroidal. En otro estudio realizado con el extracto acuoso de *Emilia sonchifolia*, (Mulo y Ohiri, 2000), se indujo un efecto antiinflamatorio y al realizar el estudio fitoquímico preliminar, se encontraron flavonoides; estos metabolitos están presentes en la siempreviva, lo que permite sugerir que éstos pudieron ser los responsables del efecto antiinflamatorio, ya que a los flavonoides se les han atribuido diversas actividades biológicas, entre las que podemos citar la disminución del proceso inflamatorio (Kuklinski, 2000).

La actividad antiinflamatoria de *Sedum praedatum* fue evaluada utilizando el modelo modificado del granuloma, que ha sido utilizado por otros autores, en la valoración de otras especies vegetales (Lee y col., 1998, Bani y col., 2000, y Muruganandan y col., 2001, Meléndez y col., 2001, Meléndez y col., 2002), por ser un modelo que permite inducir un proceso inflamatorio

subcrónico o crónico, que resulta práctico sencillo y económico a diferencia de otros métodos utilizados para la evaluación de la actividad antiinflamatoria (Godoy y col., 1998, Marchesan y col., 1998, y Badilla y col., 2003), que inducen inflamación aguda y al parecer son más agresivos para el animal de experimentación.

En las cuentas diferenciales, se observó que el porcentaje de polimorfonucleares aumentó en el grupo testigo al final del tratamiento. Los grupos tratados con el liofilizado, indometacina y didofenaco presentaron un porcentaje de neutrófilos similar al obtenido al inicio del experimento, (tabla 5). La presencia de polimorfonucleares neutrófilos y macrófagos en la zona de inflamación permite suponer que el proceso inflamatorio disminuyó sin embargo hubo mucha dispersión en los valores, probablemente sea un comportamiento inherente de la especie en la cual se realizó la valoración.

En el estudio histológico realizado en los cortes obtenidos de las ratas a las cuales se les indujo la inflamación se observó una disminución de las células características del proceso inflamatorio, probablemente debido a los fármacos administrados (indometacina y didofenaco) y al liofilizado de la siempreviva.

La disminución del número de leucocitos, ha sido observada en especies como *Sideritis javalambresis* (Godoy y col., 1998), ésta también produjo un efecto antiinflamatorio, como el inducido con el liofilizado de la siempreviva.

En nuestro estudio los resultados obtenidos nos permiten sugerir que el liofilizado de la siempreviva inhibió el proceso inflamatorio a las dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de p. c. efecto apoyado por los estudios histológicos y

hematológicos. Por otro lado, en el liofilizado los metabolitos hidrosolubles se encuentran más concentrados que en el jugo fresco, lo que permitió que las dosis administradas indujeran el efecto antiinflamatorio.

En el estudio toxicológico, a las dosis administradas no se observaron efectos tóxicos durante las primeras horas y al término de los siete días, no se registró ninguna muerte, lo que nos indica que la DL_{50} está por encima de 3000 mg/kg y de acuerdo con los valores que se encuentran en la literatura sobre la toxicidad de diferentes sustancias, podemos considerar que el liofilizado es prácticamente no tóxico o inocuo (Ecobichon, 1992).

VII. CONCLUSIONES

- Por los resultados obtenidos podemos sugerir que el liofilizado de la siempreviva (*Sedum praealtum*) presentó actividad antiinflamatoria con el modelo del granuloma, y que esa actividad fue dependiente de la dosis.
- La siempreviva es prácticamente no tóxica.

IX. APÉNDICE 1

Cuenta de leucocitos totales

Fundamento:

Para determinar la cantidad de leucocitos contenidos en un volumen conocido, basta colocar una pequeña muestra de sangre en una superficie con espesor y graduación definidos y por medio del microscopio hacer el recuento, o bien utilizar un contador electrónico.

Material:

Cámara de Neubauer

Pipeta de Thoma para glóbulos blancos

Tubería de hule con boquilla

Tubos de 120 x 13 mm con anticoagulante

Microscopio óptico

Contador de teldas

Líquido de Turk

Agitador para pipetas de Thoma

Método

- Extraer la sangre de la cola de la rata y colocarla en un tubo con anticoagulante, agitando suavemente para homogeneizar.

- Llevar la sangre hasta la marca de 0.5 ó 1.0 según la dilución que se desee y secar (se puede tomar directamente de la vena caudal desde donde la sangre sube por capilaridad).
- Aforar con líquido de dilución hasta llevar a la marca 101.
- Pasar la pipeta al agitador y mezclar durante un minuto.
- Colocar la cámara de Neubauer sobre una pequeña superficie horizontal y poner el cubreobjetos sobre las mesetas.
- Desechar las cuatro primeras gotas del contenido de pipeta.
- Cargar la cámara con la quinta gota, depositándola entre la meseta y el portaobjetos para que difunda por capilaridad, evitando que se formen burbujas.
- Dejar en reposo durante dos minutos, de preferencia en un ambiente húmedo.
- Contar los glóbulos blancos del cuadrado central; basta con contar los cuadros de las esquinas y uno del centro. Considerar los leucocitos que se encuentran sobre la línea limitante de cada uno de los ángulos externos del cuadro y eliminar los que se encuentren en los ángulos opuestos.

Cálculos e interpretación:

Para hacer el recuento se utilizan los cuatro cuadros de 1 mm, 2 de las esquinas de la cuadrícula, cada uno de ellos está dividido en 16 cuadrillos.

Se llena la pipeta de Thoma con sangre hasta la marca 0.5, más el líquido de dilución hasta la marca 11, lo que nos da una dilución de 1:20. El mismo

procedimiento para obtener la dilución 1:10, pero la sangre se lleva hasta la marca 1.0.

La capacidad de ámpula de la pipeta es de 10 veces el volumen contenido en el tallo desde la punta hasta la marca 1.0. (Cardona y col., 2001).

$$\frac{(\text{Número de células}) (\text{dilución}) (10)}{4} = \text{Leucocitos / mm}^3$$

X. APÉNDICE 2

Cuenta diferencial de leucocitos

Fundamento:

La morfología de los leucocitos es diferente según su función, así encontramos neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos y linfocitos.

Material:

Portaobjetos.

Puente de coloración.

Colorante de Wrigth.

Buffer de fosfatos pH 6.4.

Microscopio óptico.

Método

- Extraer sangre venosa o capilar, en el primer caso homogeneizarla bien por agitación.
- Colocar una pequeña gota de sangre en un portaobjetos y hacer extensión delgada.
- Secar al aire y colocar la laminilla en el puente de coloración.
- Cubrir el extendido con colorante de Wrigth, dejándolo 5 minutos.
- Agregar buffer y sin tirar el colorante de Wrigth, soplar sobre la mezcla para homogeneizar; dejar 7 minutos.
- Eliminar la mezcla agregando agua corriente, lavando por flotación.

- Dejar secar al aire colocándolos en posición inclinada.
- Con un algodón o alcohol limpiar la parte posterior del portaobjetos para quitar el exceso de colorante.
- Observar al microscopio con objetivo de inmersión.
- Cálculos e interpretación: Se recorre el extendido y se van anotando los diferentes leucocitos, agrupando cada tipo por separado hasta completar un total de 100 células como mínimo (Cardona y col., 2001).

XI. APÉNDICE 3

Cortes histológicos

Obtención de la muestra:

Debe obtenerse el material de un animal anestesiado o inmediatamente después de su muerte.

Fijación:

Se realiza utilizando formaldehído al 10% en un tiempo de 24 a 72 horas, con la finalidad de conservar de la manera más fidedigna posible el estado y situación en la que se encontraba el tejido *in vivo*. La fijación ayuda a obtener las estructuras con las mínimas modificaciones posibles, además este proceso produce la inactivación de algunas enzimas celulares, las cuales de otro modo iniciarían la autólisis, de la misma manera elimina bacterias y microorganismos que podrían destruir el tejido. Las muestras de piel se colocan en un frasco el cual contiene en la parte inferior una cama de algodón para favorecer la fijación del tejido. Al frasco se le coloca una etiqueta con el número de lote y la fecha de extracción.

Eliminación del exceso de fijador:

Una vez que se llevó a cabo la fijación se coloca la mitad del tejido en una gasa con su etiqueta correspondiente y se deposita en vaso de precipitados con agua, posteriormente se cubrirá con una gasa, la cual será sujeta con una liga para evitar la salida de los tejidos al momento de lavar.

El exceso de fijador se eliminará mediante un lavado con agua corriente en un lapso de una hora.

Obtención de los cortes:

Los cortes deben ser delgados y uniformes para que permitan el paso de la luz. Para obtener la consistencia necesaria de manera que se pueda cortar en secciones delgadas es necesario incluir antes el tejido en un material que, al solidificarse, le confiera suficiente dureza. Las sustancias para este fin, son varios tipos de ceras insolubles en agua, por lo general parafina o paracut. En consecuencia antes de iniciar la inclusión es necesario deshidratar el tejido.

Deshidratación:

El órgano que ha sido previamente lavado se coloca en concentraciones crecientes de alcohol etílico, con la finalidad de que el alcohol sustituya el agua que contiene el tejido. Esto se logra siguiendo las concentraciones que a continuación se muestran con los tiempos preestablecidos.

Tabla 1. Concentraciones de alcohol etílico

Concentración de alcohol etílico	Tiempo	Concentración de alcohol etílico	Tiempo
50 I	1 hora	80 I	1 hora
50 II	1 hora	80 II	1 hora
60 I	1 hora	96 I	1 hora
60 II	1 hora	96 II	1 hora
70 I	1 hora	96 III	1 hora
70 II	1 hora	Absoluto I	1 hora
70 III	1 hora	Absoluto II	1 hora

Transparentación:

Es el caso en el cual el tejido se impregna de un disolvente de la parafina (tolueno, xileno), esto con la finalidad de que una vez impregnado el tejido de dicho disolvente se facilite la penetración del paracut y se lleve a cabo la inclusión en dicho sólido. Los tiempos requeridos en dicho disolvente se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Tiempos en paracut

Sustancia	Tiempo
Alcohol absoluto- tolueno	15 minutos
Tolueno I	15- 25 minutos
Tolueno II	30 – 45 minutos

Inclusión en paracut:

Una vez que el órgano ha sido embebido en el disolvente de la parafina podemos realizar la inclusión preliminar, la cual consiste en colocar el tejido en parafina líquida. El tejido se sumerge en parafinas de puntos de fusión crecientes considerando los siguientes tiempos.

Tabla 3 Parafinas con puntos de fusión crecientes

Paracut	Tiempo
Paracut 52-54° - Tolueno	15 minutos
Paracut I 52-54°	1 hora
Paracut II 54-56°	1 hora
Paracut III 56-58°	1 hora

Finalmente se lleva a cabo la inclusión definitiva con el paracut de punto de fusión 56-58°, con la finalidad de proporcionarle solidez y consistencia al órgano de manera que permita obtener cortes de 6 micras, mediante un microtomo Minot. Se **realizará** un muestreo, es decir se obtendrá un corte de cada cinco.

Tintión de los cortes obtenidos:

Las estructuras contenidas en las preparaciones histológicas poseen poco contraste o carecen de éste, lo que da como resultado que no puedan distinguirse por tener un índice de refracción similar. La mayoría de los colorantes histológicos se utilizan en solución acuosa, por lo que los cortes incluidos en parafina deben ser desparafinados, mediante un tratamiento con xileno y rehidratados por pases en concentraciones decrecientes de alcohol, y agua antes de ser teñidos.

La técnica que se utiliza para teñir es la de hematoxilina - eosina. Esta técnica muestra con nitidez al núcleo y el citoplasma.

El colorante primario en este caso es la hematoxilina, el cual es un colorante básico por lo cual tiñe aquellas estructuras con carga negativa y por lo tanto el núcleo de las células.

El colorante secundario o de contraste es la eosina, es un colorante ácido y tiñe aquellas estructuras que poseen cargas positivas

Coloración:

1. Desparafinar con xilol durante 5 minutos.
2. Carbol-xilol-creosota durante 5 minutos.
3. Alcohol de 96° durante 5 minutos
4. Alcohol de 70° durante 5 minutos.
5. Hidratar en agua corriente durante 5 minutos.
6. Teñir con Hematoxilina de Harris durante 5 minutos.
7. Lavar por inmersión en agua de la llave.

8. Diferenciar con alcohol ácido (unos cuantos segundos).
9. Lavar perfectamente por inmersión con agua destilada.
10. Virar pH con agua amoniacal.
11. Lavar perfectamente con agua destilada.

Observación al microscopio óptico

Interpretación:

Componentes nucleares ----- azul violáceo

Estructuras citoplasmáticas ----- Adquieren una tonalidad rosada.

(Cardona y col., 2001).

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar A. 1994. Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica. 1ª ed. México D. F. PP. 3-9
- Aquino R., Vicenza F., De Simone F., Casimo P., Giuseppe C. 1991. Plant metabolites, new compounds and antiinflammatory of *Uncaria tomentosa*. J Nat. Prod. 54: 453-459
- Badilla B., Arias A. Y., Arias M., Mora G. A., Poveda L. J. 2003. Antiinflammatory and anticonceptive activities of *Loasa speciosa* in rats and mice. Fitoterapia, 74: 45-51.
- Bani S., Kaul A., Jaggi B. S., Suri O. P., Sharma O. P. 2000. Antiinflammatory activity of the hidrosoluble fraction of *Euphorbia royleana* latex. Fitoterapia , 72:497-502
- Cardenas L. C., Rodríguez J., Villaverde M. C., Riguera R., Cadena R., Otero J. A. 1993. The analgesic activity of *Hedyosmum bonplandianum* flavonoid glycocides. Planta Med. 59: 26-27.
- Cardona C. M., Hernández V. L., Mojica LO., Sánchez CMA., Villarreal M.M.E. 2001. Manual de Anatomía y Organografía Microscópica, 4ª. Edición, Instituto Politécnico Nacional, México pp. 111-124.
- Delgado G., Del Socorro O. M., Chávez M. I., Ramírez A. T., Linares E., Bye R., Espinosa, G. F. J. 2001. Antiinflammatory constituents from *Heterotheca inuloides*. J. Nat. Prod. 64: 861-864

- Della L. R., Turbaro A. Sosa S., Becker H., Saar St., Isaac O., 1994. The role of triterpenoids in the tropical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers. *Planta Med.* 60: 516-520.
- Duwiejumo M., Zeitlin I. J., Waterman P. G., Chapman J., Mhango G. J., Provan G. J. 1993. Antiinflammatory activity of resins from some species of the plant family Burseraceae. *Planta Med.* 59:12-16.
- Ecobichon D. J. 1992 *The basic of toxicity testing*. 2^a ed. CRC Press, London, p.50
- Estrada L. E. 1985. Jardín Botánico de Plantas Medicinales. Máximo Martínez Fitotecnia. Universidad Autónoma de Chapingo Méx. pp. 41.
- García M. D., Quilez A. S., Sáens M. T., Martínez Domínguez, M. E. R., De la puerta. 2000 Antiinflammatory activity of *Agave intermixta* Trel. and *Cissus sicyoides* L, species used in the Caribbean traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 71:395-400
- Godoy A. J., De las Heras B., Vivas J. M., Villar A. M. 1998. *In vivo* and *in vitro* antiinflammatory activity of a lipid compound from *Sideritis javalambresis* P. *Phytother Res.*, 12:S111-S113
- Hernández B. J. L., 2000, Estudio de la actividad antiinflamatoria de la siempreviva *Sedum praealtum* en la rata. Tesis. Químico Farmacéutico Industrial. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN.

- Hernández M. R., Gally, J. M. 1988. Plantas medicinales. Editorial árbol. México. pp. 7-8
- Insel P. A. 1996. Analgésicos antipiréticos y antiinflamatorios y fármacos antigotosos, En: Las bases farmacológicas de la terapéutica, Goodman & Gilman. 9ª . Ed. Editorial I, México. pp 677-703.
- Jackson L. R. II y Morrow J. D. 2001. Analgesic-antipyretic and anti-inflammatory agents and drug employed in the treatment of gout. En: Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics. Hardman J.E., Limbird L.E. Goodman G.A. (eds.), 10a edición. International edition, McGraw-Hill, New York. pp. 687- 689, 705-710.
- Kim H. P., Bird J. Heiman A. S., Hudson G. F., Taraporewala I. B., Lee H. J. 1987. Synthesis of new antiinflammatory steroidal 20-Carboxamidas: (20R) and (20S)- (21-N) substitutedamino) -11, 17, 20 trihydroxy 3, 21-dioxo- 1, 4 , pregnadienes. J. Med. Chem. 30: 2239-2244.
- Kuklinski C. 2000. Farmacognosia. Estudio de las drogas y las sustancias medicamentosas de origen vegetal. 3ª ed. Ediciones Omega, Barcelona. pp. 134-200.
- Kweifio-Okai G., Bird D., Field B.J. Ambrose R., Carroll A. R., Simith P., Valdes R. 1995. Antiinflammatory activity of a Ghanaian antiarthritic herbal preparation: V Ethnopharmacol. 46:7-15.

- Lanhers M. C., Fleurentin J., Dorman P., Martier F., Pelt J. M., 1991. Analgesic, antipyretic and antiinflammatory, properties of *Euphorbia hirta*. *Plant. Med.*, 57:225-231
- Linares M. E, Flores B. P., Bye R. 1988. Selección de plantas medicinales de México. Editorial Limusa México D.F. pp. 118
- Lee S. J., Son K. H., Chang H. W., Kang S. S., Kim H. P. 1998. Antiinflammatory activity of *Lonicera japonica*. *Phytother. Res.* 12: 445- 447.
- Marchesan M., Paper D. H., Hose S., Franz G. 1998. Investigation of the antiinflammatory activity of liquid extracts of *Plantago lanceolata* *Phytother. Res.* 12:33-34.
- Meléndez C.M.E., Hernández B.J.L., Buendía R.M., Ramos Z.D., Cardona C.P & Villarreal M.M.E. Study of the antiinflammatory effect of *Sedum praedatum* (siempreviva) in the rat. V Simposio Internacional de Plantas Medicinales, Habana,Cuba, 2001 ,p.28
- Min R. K., Hwang B., Lim H-S., Kang B-S., Oh G-J., Lee J., Kang S-H., Lee S-K., Ro S.J. Kim., 1999. Epiafzelechin, cidoxygenase-1 inhibitor and antiinflammatory agent from aerial parts of *Celastrus orbiculatus*. *Plant. Med.* 65:460-462.
- Murunganandan S., Srinivasan K., Chandra S., Tandan S. K., Lal J., Raviprakash V. 2001. Anti-inflammatory activity of *Syzygium cumini bark*. *Fitoterapia*, 72:369-375.

- Mulo K. N., Ohiri F. C. 2000 A preliminary study on the antiinflammatory propertis of *Emilia sonchifolia* leaf extract. *Fitoterapia*, 71: 65-68
- Onwukaeme N. D. 1995. Antiinflammatory activities of flavonoids of *Baphia nitida* Lodd. (Leguminosae) on mice and rats. *J. Ethnopharmacol.* 46:121-124
- Olajide O. A., Alada A. R. A. 2001 Studies on the antiinflammatory properties of *Entada abyssinica* *Fitoterapia* 72: 492-496.
- Pahlow M. 1991. El gran libro de las Plantas Medicinales. Editorial Everest S.A. 6ª ed. España. pp. 7-37.
- Payan D. G. 1996. Antiinflamatorios no esteroides y analgésicos no opioides, fármacos utilizados para la gota. En: farmacología Básica y clínica. Katzung B.G, ed. Editorial En el Manual Moderno, 6ª ed. México. pp. 651-675.
- Pérez R. M., Pérez S., Zavala M. A., Salazar M. 1995. Antiinflammtory activity of the bark of *Hippocratea excelsa*. *J. Ethnopharmacol.* 47:85-90.
- Robbins S. L., 1990, Patología estructural y funcional, Editorial Interamericana, 4ª ed. España, pp. 31-78
- Ramos Z. D., Ordorica V. M., Villegas y de Gante M., Rosales M. H., Silva T.R, 1998. Estudio etnobotánico y farmacológico de *Sedum praedatum* D.C. Crassulaceae en la Cd. De México III Congreso Mexicano de Etnobiología. Asociación Etnobiológica Mexicana y el Instituto Tecnológico Agropecuario., pp. 43.

- Roitt I., Brostoff, J., Male D. 1996. Inmunología 3a. ed. Editorial Masson-Salvat. pp. 13.1-13.8
- Rojas W. M., 1985. Inmunología. 6ª. ed. México. pp 65-67
- Rzedowski J., Rzedowski G. 1979 Flora fanerogámica del Valle de México Volumen 1 Editorial Continental, 1a. Edición, México D.F., pp. 249.
- Sahagún B. 1954. Historia general de las cosas de la Nueva España. Editorial Facsimilar. Porrúa. México.
- Sarwar A. M., Chopra N., Pillai K. K. 1995. Antiinflammatory activity of *Vitis elongata*. Ethnopharmacol. 48: 59-60.
- Silva T. R., Montellano R. H., Ramos Z. D., Castro M. M. E., Cerda G-R. C. M. 2003. Espermicidal activity of the crude ethanol extract of *Sedum praedatum* in mice Ethnopharmacol 85:20-23.
- Singla A. K., Pathak K. 1989. Antiinflammatory studies on *Euphorbia prostata*, J. Ethnopharmacol: 27:55-61
- Tonnelli G., Thibault L., Ringler I. 1965. I.A bio assay for the concomitant assessment of the antiphlogistic and thymolytic activities of topically corticoids. Endocrinol. 77: 625-634
- Varcárcel C. M., Gómez H. A., 1994. Técnicas analíticas de separación. Editorial Reverté 1ª Edición, Barcelona-España, pp. 152- 153.
- Valencia E., Feria M. G., Díaz J. González A., Bermejo J. 1994 Antinociceptive, antiinflammatory and antipyretic effects of *Lapidin*, a bicydic sesquiterpene. Planta Med. 60: 395-399.

- Winter C. A., Risley E. A., Nuss G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc. Soc. Exp. Biol. 111: 544-547.