



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**Evaluación de la actividad antifúngica y su efecto en
los radicales libres de los compuestos y extractos de
Tephrosia crassifolia y *Tephrosia madrensis*.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

Fuentes Contreras Francisco

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR: MC. MAURILIO FLORES PIMENTEL



México DF, Abril 2009



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.

HE DECIDIDO ENFRENTAR
LA REALIDAD, ASÍ QUE
APENAS SE PONGA LINDA
ME AVISAN



Es una palabra que utilizamos muchas veces sin saber porque, la utilizamos por simple costumbre, solemos ignorar su real significado y hasta parece que la escupimos. Es una palabra devaluada, inherente a la persona “educada”.

La misma rutina e indiferencia la han desgastado, le han quitado todas y cada una de sus raíces hasta dejarla desnuda y miserable.

Pero ahora quisiera devolverle su grandeza, honestidad, sinceridad y humildad para que su real, único y verdadero significado recobre vida y exprese con gran brutalidad y orgullo mi más profundo sentimiento de cariño, es por eso que:

Gracias

Gracias por todo

A mi familia,

a mis amigos,

a mi amor,

a mis profesores y maestros.

(En especial al Dr. Rubén, al Dr. Luis Mora, al maestro Maurilio y la maestra Yolanda).

Atte.:

Paco

Índice.

Resumen.	1
Introducción.	2
Marco teórico.	3
<i>Tephrosia madrensis</i> y <i>Tephrosia crassifolia</i> .	4
Hongos.	6
Inflamación.	13
Fagocitosis.	18
Fármacos antiinflamatorios.	22
Actividad antioxidante.	24
Planteamiento del Problema.	26
Objetivo.	27
Objetivos particulares.	27
Hipótesis.	27
Diseño de investigación.	28
Diagrama de flujo.	29
Material, equipo y reactivos.	31
Material biológico.	33
Metodología.	34
Evaluación de la actividad antifúngica de diferentes extractos de <i>Tephrosia sp</i> sobre <i>Aspergillus flavus</i> .	34
Evaluación de la actividad fagocítica y antioxidante los extractos de <i>Tephrosia sp</i> .	36
Resultados.	42
Discusión de resultados.	49
Conclusiones.	51
Anexos.	52
Bibliografía.	61

Resumen

Este trabajo tuvo como objetivos evaluar la actividad antimicótica, fagocítica y generación de radicales libres, de algunos extractos obtenidos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*. La actividad antimicótica de los diferentes compuestos y extractos se evaluó mediante una técnica de pozo en placa con agar Sabouraud-dextrosa, se usó como testigo positivo terbinafina (Lamisil), como testigo negativo solución salina y los diferentes extractos y compuestos (25µg/50µL) usando *Aspergillus flavus* como el microorganismo de prueba. La actividad fagocítica, se determinó a través de la técnica de reducción de NBT, utilizando como control positivo Indometacina, como control negativo solución salina y los distintos extractos y compuestos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*. Se realizó la determinación de nitritos y de peroxidación lipídica del extracto Hildgartol B con ratones CD 1 machos, a los cuales se les administró vía oral el extracto a una concentración de 40 mg/kg de peso, de Indometacina (10mg/kg) y de solución salina. Los PMN y macrófagos se activaron 24 hrs antes con LPS de *Escherichia coli*, O111. Resultados. No se encontró actividad antimicótica en ninguno de los extractos probados, se encontró que solo dos de los compuestos, Crassifolina A e Hildgartol B, tuvieron una actividad de aumento en la reducción de NBT. El Hildgartol B no mostró efecto en la concentración de nitritos ni en la peroxidación lipídica.

Introducción

En la actualidad el hombre como raza y sociedad esta enfrentado una serie de problemas que ponen a prueba su capacidad para sobrevivir y mas aun en aquellas civilizaciones donde su economía en crecimiento enfrenta importantes dificultades, de ahí la importancia de desarrollo de tecnología eficiente y al alcance de sus posibilidades y recursos.

México es un país que cuenta con una gran variedad de plantas que se encuentran distribuidas a lo largo y ancho de todo su territorio. A través de su historia, las antiguas culturas se han servido de esta gran variedad de plantas para ser utilizadas, de manera empírica, como remedios ante muchas situaciones. Esta costumbre aun prevalece en la cultura mexicana sin embargo aun se desconoce que tipo de componentes químicos (tóxicos o no) y sus consecuencias pueden estar involucrados en el supuesto efecto terapéutico de muchas plantas utilizadas como remedios caseros. Ante esta problemática surge la necesidad de tener un estudio importante donde se conozca el perfil completo de las plantas que se encuentran en el país delimitando así el uso de ciertas plantas, lo cual es un trabajo muy extenso.

La *Tephrosia sp* es una planta que pertenece a la familia de las leguminosas la cual cuenta con aproximadamente 15 000 especies haciendo de esta una de las plantas con mayor presencia en la naturaleza y por ende en México. El género de la *Tephrosia sp* cuenta con una larga historia ya que en antiguas civilizaciones hojas de estas plantas eran utilizadas como insecticidas y para la pesca. En estudios recientes se ha encontrado que diversas especies poseen propiedades que les atribuyen diversos efectos biológicos tales como: anticancerígenos, espermatocida, antivirales, bactericidas, edulcorante, insecticida, antifúngica, antiinflamatoria entre otras.

Conocer las propiedades de especies poco estudiadas como *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* es importante ya que, además de proporcionar el perfil de

ambas plantas, se podría contar con nuevas herramientas que ayuden al mejoramiento de la calidad de vida de las personas que no cuentan con grandes recursos económicos.

Marco Teórico

Antecedentes

Gran parte de la cultura popular de la medicina mexicana proviene de una combinación entre las creencias de antiguas civilizaciones, como los aztecas y del conocimiento científico europeo; durante la conquista de México por la civilización española, el concepto y practica de la medicina se volvió mas científico, mas allá de una versión simple de la doctrina Hipocrática, (ya que se creía que las enfermedades eran causadas por los dioses) sin embargo la perpetuación de estas practicas medicas en la cultura mexicana no depende totalmente de un razonamiento científico si no en las costumbres practicadas por la gente particularmente personas de escasos recursos que transmiten estos conocimientos de generación en generación y que basan su remedio empíricamente. Debido a la inquisición católica durante el periodo del reinado español se llevó a cabo una conversión de religión hacia el cristianismo en donde antiguas creencias fueron perseguidas y oprimidas por sacerdotes cristianos lo que originó que desaparecieran o cambiaran de nombres tanto a dioses, dogmas, ritos así como a plantas y hierbas utilizadas en diversos rituales y en remedios, pero aun ciertas culturas y sus creencias permanecen intactas al igual que sus remedios herbolarios creándose así la medicina tradicional o alternativa.^{1, 2, 3, 4}

Tephrosia madrensis y *Tephrosia crassifolia*

Generalidades de la planta

Las leguminosas son una familia de plantas que se encuentran extensamente distribuidas por todo el planeta, esta familia esta dividida a su vez en 3 subfamilias: *Caelpinideae*, *Mimosoideae* y *Papilinoideae*, de esta última pertenece el género de la *Tephrosia sp.*

En la república mexicana el género *Tephrosia sp* se encuentra ampliamente distribuido en las zonas tropicales, principalmente en las costas del océano

pacífico en los estados de Baja California Sur, Sinaloa, Nayarit, Jalisco, Guerrero, Oaxaca, Chiapas y en algunos lugares de Nuevo León.

Uso popular

Varias especies de estas plantas se han utilizado en diferentes formas, en algunos lugares del Caribe se arrojaban hojas de *Tephrosia sinapou* a ríos, lagos y charcos para intoxicar a los peces esto como un método de pesca primitivo; también se utilizaba como insecticida contra pulgas y piojos, otras especies de este género de plantas era utilizadas como purgantes, contra la indigestión, tos, afecciones nerviosas, erupciones en la piel, etc. El género *Tephrosia sp* comprende mas de 400 especies de las cuales se han estudiado químicamente mas de 40 especies mexicanas. De este estudio químico se ha encontrado que la *Tephrosia* sintetiza mayormente compuestos flavonoides.^{5, 6, 7}

Composición química

Los flavonoides son compuestos químicos fenólicos conformados por una estructura de 15 átomos de carbono (figura 1) de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), compuesto por dos anillos de fenilos (A y B) ligados a través de un anillo C de pirano (heterocíclico) estos se ubican principalmente en las hojas, frutos y en el exterior de las plantas, su función específica en la planta aun es desconocida pero funcionan como pigmentos responsables de la coloración y sabor de hojas y frutos así como de la protección contra agentes oxidantes.

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilo fenólicos, en la planta se encuentran en forma de glucósidos estos se unen azúcares, preferentemente a la posición C3 y con menor frecuencia al C7 del anillo A, de forma que estos compuestos se encuentran comúnmente como O-glicósidos, siendo la D-glucosa el residuo azúcar más frecuente. Los glucósidos son más solubles en agua y menos reactivos frente a radicales libres que su

aglicona o flavonoide respectivo, tienen excelentes propiedades antioxidantes (por quelación del hierro y otros metales de transición), por ello, desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías.

Dentro del grupo de los flavonoides se encuentran otras sustancias llamadas rotenoides que son isoflavonoides que también tienen importantes propiedades biológicas que se caracterizan por su alta actividad insecticida y piscicida así como su reducida toxicidad en mamíferos.⁸

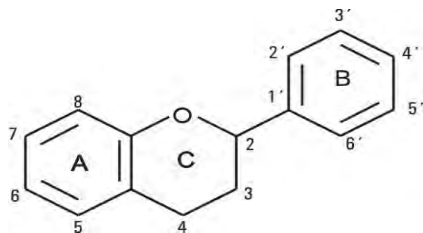


Figura 1. Estructura básica de un flavonoide

Propiedades farmacológicas

Los flavonoides tienen diferentes propiedades biológicas que varían según la especie y la estructura del flavonoide, se han encontrado diversos efectos biológicos tales como, anticancerígenos, antivirales, antialérgicos, anti-inflamatorias, espermaticidas, antihormonales, estrogénicos, bactericida, fungistáticos, algunos flavonoides tienen una actividad vascular, actividad analgésica, propiedades hepatoprotectoras, entre otras con un papel protector frente a enfermedades cardiovasculares, cáncer y diversas patologías.

En diversos estudios se ha encontrado que los flavonoides tienen la capacidad de inhibir la germinación de esporas de hongos patógenos para las plantas y se ha propuesto su uso como agentes antimicóticos contra hongos y levaduras patógenos para el hombre.

En algunos flavonoides se ha observado un potencial antiinflamatorio a través de la modulación de la síntesis de las prostaglandinas (ya que estas intervienen en la respuesta inflamatoria favoreciendo la vasodilatación), de la inhibición de algunas enzimas y de su propiedad antioxidante.⁹

Hongos

Los hongos son organismos eucariotes pertenecientes al reino Fungí, que lo conforma un grupo muy diverso donde su característica principal y la que los diferencia de los vegetales es que carecen de clorofila, por lo tanto requieren de fuentes externas de carbono. En la naturaleza existen alrededor de 250,000 especies, de las cuales 50 especies son patógenas para el hombre, son considerados los contaminantes más importantes del planeta, son aerobios estrictos y algunos son anaerobios facultativos (patógenos), crecen mejor en ambientes húmedos y oscuros, son poco exigentes para su desarrollo alimentándose principalmente de materia orgánica en descomposición (saprófitos) o por invasión a plantas y animales vivos (parásitos). Los hongos como células eucariotas poseen núcleo, membrana celular, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y mitocondrias. También poseen una pared celular rígida compuesta de NAG (N-acetil-D-glucosamina) unida por puentes glucósidos β 1-4 mananos (polímeros de glucosa con puentes de glucósidos α o β). A las formas individuales o unicelulares de los hongos se les conoce como levaduras mientras aquellas con múltiples células que forman un micelio filamentososo se denominan hongos filamentosos.

A la unidad microscópica fundamental de un hongo se le denomina hifa, varias hifas se unen para formar la masa de desarrollo denominada micelio, las hifas que están subdivididas en células individuales por paredes transversales se denominan tabicadas o septadas; las pseudohifas son aquellas que se forman por la elongación de las levaduras brotantes. La porción del micelio que penetra en la superficie del sustrato y que es responsable de la absorción de nutrientes y agua es el micelio vegetativo, la porción que se proyecta por encima del sustrato se le

llama micelio aéreo, también llamado reproductivo, debido a que en esta porción se originan las esporas o los cuerpos de fructificación portadoras de conidias.

Existen tres tipos de esporos o conidias que pueden originarse directamente a partir del micelio vegetativo: blastoconidias, clamidiosporas y arthroconidias, estas formas son parte de la reproducción vegetativa de los hongos. Existen también cuerpos de fructificación especializados que se originan de las hifas y que se extienden por la superficie del micelio, que dan origen a una variedad de esporos o conidias y son parte de la reproducción aérea del hongo.

En el reino fungí el 97% son hongos verdaderos (eumicótica). Los eumicóticos se dividen a su vez en 4 subdivisiones: *Zigomicetos*, *Basidiomicetos*, *Ascomicetos* y *Deuteromicetos*. Los hongos representan una gran parte de la biomasa del suelo debido al gran diámetro de sus filamentos y a la extensa red que forman a su vez predominan en el protoplasma microbiano que se encuentra en el lecho en descomposición de material orgánico.

Para que un microorganismo determinado sea capaz de sobrevivir, adaptarse y establecerse en un hábitat específico depende del medio ambiente que lo rodea, en el caso de los hongos las principales influencias que determinan en el establecimiento de estos incluyen el nivel de humedad, la temperatura, la iluminación, el pH, la accesibilidad de nutrientes es decir la disponibilidad de sustratos de carbono oxidables entre otras.

Los hongos tienen muchas estructuras que permiten la supervivencia de la población cuando las condiciones del medio ambiente no son tan favorables o cuando se establecen algún otro tipo de parásitos. Entre estas estructuras especializadas están las conidias, las esporoangiosporas, ascosporas, clamidiosporas, etc. En ocasiones la misma hifa permite soportar las condiciones adversas. Esto es por que los hongos se reproducen por medio de esporas ya sea asexual o sexualmente.

La identificación de los hongos se da por medio de las diferencias morfológicas tanto macroscópicamente como microscópicamente en donde se diferencian por la forma de las estructuras reproductivas.^{10, 11}

Los *Aspergillus sp* son un grupo de hongos filamentosos de crecimiento rápido, existen alrededor de 700 especies y solo 19 de estas habitualmente producen infecciones oportunistas en el hombre. Las especies mas importantes y significativas son: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus terreus*, *Aspergillus fumigatus*.

Para la identificación de un hongo se observan sus características tanto macroscópicas como microscópicas. Se sospecha de *Aspergillus* si observa un desarrollo rápido (3 a 5 días) de una colonia verde-amarillenta, granulosa con bordes definidos y una cubierta periférica plana, el aspecto puede variar dependiendo del medio de cultivo usado para el crecimiento del hongo. Microscópicamente las especies de *Aspergillus* se caracterizan por la producción de hifas tabicadas hialinas uniformes de paredes paralelas.

La mayoría de los *Aspergillus sp* son saprofitos ubicuos en la naturaleza, estos hongos producen gran cantidad de microconidias expuestas al ambiente contaminando alimentos, medicamentos, ropa y produciendo alergias contra los antígenos conidiales, en la actualidad la contaminación por hongos representan un problema difícil de solucionar y mas aun en la conserva de alimentos.

Las colonias de *Aspergillus flavus* son desde granulares a lanosas y poseen un tono verde amarillento. Microscópicamente, los conidióforos son largos y tienden a ser rugosos, las fialides se originan de todo el perímetro de la superficie de la vesícula. Las conidias son esféricas, lisas y se forman en cadenas relativamente largas.^{12, 13, 14}

Los primeros casos de la enfermedad “Aspergilosis” se detectaron en el siglo XIX en aves, el primer reporte de esta enfermedad en humanos fue en 1856 por el Dr.

Virchow, y en 1897 el Dr. Renov de Francia. La aspergilosis es causada principalmente por *A. fumigatus*, y en menor proporción *A. flavus*, *A. niger* y *A. terreus* provocando infecciones en vías respiratorias, sobre todo en pacientes inmunodeficientes como leucémicos, con trasplante de medula, en personas con administración prolongada de corticosteroides, y en pacientes con SIDA, provocándoles una afección grave y de mal pronóstico llamada aspergilosis broncopulmonar, la quimioterapia antimicótica que se empleaba para el tratamiento de las micosis y en especial de la Aspergilosis fue a partir de fórmulas galénicas.¹⁵

Además de la infección que pueden ocasionar los hongos, en este caso *Aspergillus sp*, existen otro tipo daños que pueden causar al hombre. Algunos brotes de enfermedades transmitidas por alimentos no son producidos por bacterias, helmintos, protozoarios o virus ni por el consumo de las toxinas producidas por éstos, existen casos donde un gran número de personas se enferman por el consumo de alimentos contaminados por toxinas producidas por hongos denominadas micotoxinas.

Las micotoxinas son metabolitos fúngicos, algunas son altamente tóxicas para animales y potencialmente tóxicas para el hombre, la importancia que se les confiere en la actualidad está relacionada con sus propiedades cancerígenas y con la naturaleza de su actividad en animales. Por ejemplo, algunos hongos crecen rápidamente en los granos y el maíz cuando estos productos almacenados se encuentran en condiciones húmedas, la contaminación del grano por ascomiceto (*Claviceps purpurea*) causa ergotismo un trastorno tóxico; los alcaloides alucinógenos producidos por este hongo pueden provocar alteraciones del comportamiento y muerte a quienes consumen el grano contaminado.

El género *Aspergillus* es uno de los principales contaminantes de granos almacenados ocasionando daños que reducen la calidad de los alimentos o semillas, daños que se manifiestan en el cambio del sabor o en el color. Los hongos de granos almacenados son los responsables de la producción de las

micotoxinas, destacando las aflatoxinas que al consumirse por animales o por el hombre generan severos daños a la salud.

Durante varios años se han presentado casos de muertes masivas en aves de corral, en 1960 murieron en Inglaterra 100,000 pollos de corral, para 1970 se seguían presentando casos perecidos en toda Europa del norte, el factor común en todos estos casos era el empleo de harina de cacahuete que era parte de la alimentación de los animales. De la harina de cacahuete se aisló *Aspergillus flavus* y posteriormente fue aislada una toxina que se denominó aflatoxina, lo cual produjo una investigación exhaustiva de los posibles efectos que tendrían si eran consumidas por personas. Las aflatoxinas (figura 2) son producidas por ciertas cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus*, tanto el hongo como la toxina se han aislado de alimentos como cebada de maíz, semillas de algodón, cacahuates, harina de cacahuates, arroz, soja, trigo, garbanzo, chicharos, etc. En la mayoría de los casos, el crecimiento de una cepa toxigenica y la elaboración de la toxina tiene lugar una vez recolectado y acondicionado el alimento aunque en algunos casos el alimentos es invadido por el hongo antes de su recolección empezando así la elaboración de la toxina.^{18, 19}

Los dos tipos de aflatoxinas aisladas son la aflatoxina B y la aflatoxina G y se denominaron así por su fluorescencia azul (B: blue) y verde (G: green) cuando se exponen a la luz ultravioleta en una longitud de onda larga. *Aspergillus flavus* elabora la aflatoxina tipo B, mientras que *A. parasiticus* elabora tanto tipo B como la tipo G. Existen las aflatoxinas tipo B₂ y G₂ que son dihidroderivados de las tipo B₁ y G₁. Las aflatoxinas tipo M₁, M₂ y P₁ son los derivados hidroxilados de las aflatoxinas tipo B₁ y B₂, la aflatoxina mas toxica para animales mamíferos y aves de corral es la aflatoxina B₁. Las aflatoxinas se detectan mediante la extracción de alimentos con disolventes, como alcohol y cromatografía de capa fina, se identifican mediante el color que presentan bajo la luz ultravioleta.

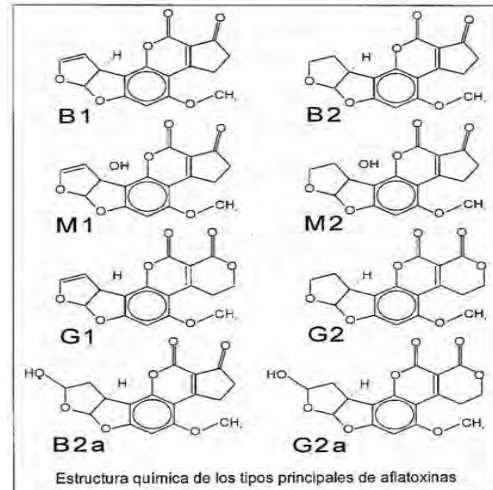


Figura 2.

Las aflatoxinas, compuestos de anillos planos se intercambian con los ácidos nucleicos de las células actuando como mutágenos por desplazamiento del marco de lectura pudiendo ser compuestos cancerígenos, esto sucede principalmente en el hígado donde se convierten en compuestos inestables. Desde su descubrimiento diferentes organizaciones sanitarias han empleado una metodología de vigilancia para evitar la contaminación de los alimentos con micotoxinas, se estableció como patrón de 30 ppb como la contaminación máxima permitida.^{16, 17}

La importancia de la creación de antimicóticos surge por las frecuentes infecciones en humanos producidas por hongos las cuales desembocan en incómodos problemas de salud que sin un debido cuidado pueden ocasionar la muerte así como también surge a partir de la necesidad de la disminución de contaminación en alimentos por hongos y su consecuente producción de micotoxinas que asimismo tendrían consecuencias para la salud del hombre.

Gran parte de los antimicóticos se emplean para combatir infecciones en el hombre, es partir de 1939 que se uso por primera vez la griseofulvina, de la cual se ha desencadenado hasta el momento una búsqueda por tratamientos más eficientes, con menos efectos adversos y mejorando el efecto contra las micosis.

La Anfotericina B es el medicamento antimicótico de referencia por su mecanismo de acción, es un antimicótico macrolido polienico que actúa fijándose a un fragmento del ergosterol, componente de la membrana de los hongos, ocasionando así la formación de poros que aumentan la permeabilidad de la membrana lo que ocasiona una pérdida de varias moléculas, choque osmótico, llevando así a la muerte celular del hongo sin embargo este medicamento tiene muchos efectos tóxicos renales. Otro grupo de antimicóticos son los azólicos que incluyen dos clases generales que son los imidazoles y los triazoles, comparten el mismo espectro y mecanismo de acción contra los hongos. Con la concentración correcta el efecto principal que se logra es el de inhibir a la desmetilaza 14 α -esterol, enzima del citocromo P₄₅₀, con lo cual se estropea la biosíntesis del ergosterol en la membrana citoplasmática ocasionando la alteración de varias funciones enzimáticas de la membrana y enzimas del transporte electrolítico llevando así a la muerte del hongo. Ejemplo de estos antimicóticos son: clotrimazol, miconazol, cetoconazol, terconazol, itraconazol, fluconazol entre otros.

La Terbinafina es una alilamina sintética; los derivados de alilaminas son antimicóticos sintéticos, compuestos que contienen dos bencenos unidos (naftaleno) y una alilamina, con un mecanismo acción eficiente al interrumpir la formación de ergosterol, generando una membrana defectuosa que pierde su estructura y funcionalidad, sobre todo por un mal intercambio iónico, pero a diferencia de los azoles, el efecto es al inicio de la síntesis de esteroides, es decir bloquea la enzima escualeno-epoxidasa, la cual no depende del citocromo P₄₅₀ oxidasa, por lo tanto no tiene acción en el metabolismo hormonal, ni de otros productos que dependen de esta coenzima para su metabolismo.²⁰

La obtención de productos benéficos para el hombre a partir de plantas, animales o microorganismos es la manera que mejores resultados ha dado a través de la historia de la farmacología. Muchos medicamentos derivan de plantas o microorganismos, un ejemplo claro es la penicilina, metabolito del hongo *Penicillium chrysogenum* que es utilizada como antibacterial o la insulina, la

cerveza, el vino, entre otras muchas mas sustancias, es así como la industria farmacéutica se basa en fomentar la búsqueda y creación de nuevos productos con actividad farmacológica o industrial.²¹

Inflamación

La inflamación es una respuesta compleja del organismo humano ante la presencia de un daño tisular, provocado por una herida o por la presencia de un microorganismo patógeno invasor, lo cual genera una serie de síntomas bien conocidos y descritos desde el siglo 1 DC por el medico romano Celso quien los nombró “los cuatro signos cardinales de la inflamación”: rubor (enrojecimiento), tumor (hinchazón), calor y dolor. Estos síntomas reflejan los principales fenómenos que se generan dentro de una reacción inflamatoria. La reacción inflamatoria tiene una función protectora importante, debido a que activa los procesos de defensa, sanación y reparación ante un daño.

La respuesta inflamatoria surge en tres fases cronológicamente precisas, cada una mediada por mecanismos diferentes: 1) Una fase aguda que se caracteriza por una vasodilatación local transitoria y mayor permeabilidad capilar, 2) Una fase subaguda tardía caracterizada por la infiltración de leucocitos y células fagocíticas y 3) una fase proliferativa crónica en la que hay degeneración y fibrosis hísticas.

Mecanismos de la inflamación

El principal fenómeno que se presenta en una reacción inflamatoria, en su fase aguda, es la vasodilatación la cual consiste en un cambio de diámetro y permeabilidad de los vasos sanguíneos locales esto es desencadenado por moléculas que se liberan o se presentan durante un daño tisular o infección, a estas moléculas también se les conoce como mediadores inflamatorios y también están involucradas en la mediación del dolor, la fiebre, la quimiotaxia o coagulación. En general estas moléculas (mediadores) son secretadas por las células que sufren algún trauma y también son macromoléculas microbianas únicas (p.ej., LPS).

La vasodilatación es el resultado de la relajación del músculo liso de la pared vascular, esta vasodilatación tiene como consecuencias iniciales el incremento del flujo sanguíneo en arteriolas, capilares y vénulas de la región afectada lo cual produce rubor (eritema) y el aumento de temperatura.

Conforme los vasos se dilatan favorecen que las células endoteliales se separen una de otra generando hendiduras microscópicas lo cual culmina en una mayor permeabilidad de la pared vascular y por lo tanto facilita una afluencia del líquido y células sanguíneas de los capilares irrigados hacia el tejido. El líquido que se acumula (exudado) y la continua acumulación de este contribuye a la tumefacción del tejido formando un edema.

Mediadores químicos de la inflamación

Además de ser parte de un reflejo medular, la dilatación y permeabilidad de los vasos sanguíneos también es resultado de una respuesta independiente del sistema nervioso, la cual conlleva a la interacción del tejido endotelial con mediadores o activadores moleculares vasoactivos que se producen en el sitio del trauma o de la infección, entre estos mediadores químicos de la inflamación se encuentra la histamina un aminoácido almacenado y secretado en grandes cantidades en las células cebadas (basófilos o mastocito). La histamina fue uno de los primeros mediadores del proceso inflamatorio identificado. Tan solo unos segundos después de ser estimulado física o químicamente el basófilo (célula cebada) tiene la capacidad de liberar histamina a los tejidos circundantes donde actúa como un vasodilatador potente incrementado así la permeabilidad vascular.

Los eicosanoides (productos derivados del ácido araquidónico) tales como las prostaglandinas (PG) y leucotrienos (LT) (lípidos derivados de la membrana celular) producen efectos similares a la histamina ya que favorecen la vasodilatación y el aumento en la permeabilidad del endotelio vascular; los neutrófilos y monocitos sintetizan PGE_2 y PGD_2 , respectivamente. Las plaquetas también producen y liberan prostaglandinas como la PGG_2 y PGH_2 . Las

inyecciones intradérmicas, intravenosas o endoteliales de cantidades pequeñas de prostaglandinas reproduce muchos componentes de la inflamación como el incremento del flujo sanguíneo y la formación del edema.

Existen otros compuestos químicos que también actúan como mediadores químicos de la inflamación tales como los factores C3a y C5a del complemento, la bradicinina, LTB₄, IL-1 y TNF. Se considera que IL-1 y TNF (producidos por macrófagos) son los principales mediadores de la respuesta del organismo al lipopolisacárido bacteriano (LPS).

La dilatación del vaso sanguíneo favorece un mayor contacto, del tejido endotelial, con las células sanguíneas a lo cual se le conoce como adhesividad, la adhesividad de los vasos sanguíneos es parte de un proceso de activación endotelial, lo cual se lleva a cabo cuando tales células se exponen a mediadores químicos inflamatorios particulares ya mencionados como histamina, LPS etc. Al activarse las células endoteliales se expresan en su membrana una serie de moléculas que poseen afinidad aumentada por los leucocitos, de este modo, la activación endotelial culmina en la adherencia leucocitaria.

Una vez que los leucocitos hacen contacto con el tejido endotelial vascular se lleva a cabo un proceso o efecto de “rodamiento” (Rolling) conocido también como marginación (figura 3) en el cual los leucocitos se adhieren a la pared del vaso sanguíneo a través de integrinas leucocitarias de su superficie y que se unen específicamente a las selectinas (P y E) de la pared celular vascular para que después del contacto con factores quimiotácticos (citocinas, fragmentos de fibrina, colágeno, N-formilmetionina, C3a, C5a, etc.) los leucocitos sean “activados” y así la conformación de la superficie del leucocito cambie para permitir su unión con glucoproteínas específicas del endotelio (ICAM-1, ICAM-2) generando un contacto estable y duradero evitando el desprendimiento del leucocito, después el leucocito sale, por un espacio entre células endoteliales, hacia el sitio en el tejido adyacente donde este ocurriendo la inflamación.^{22, 23}

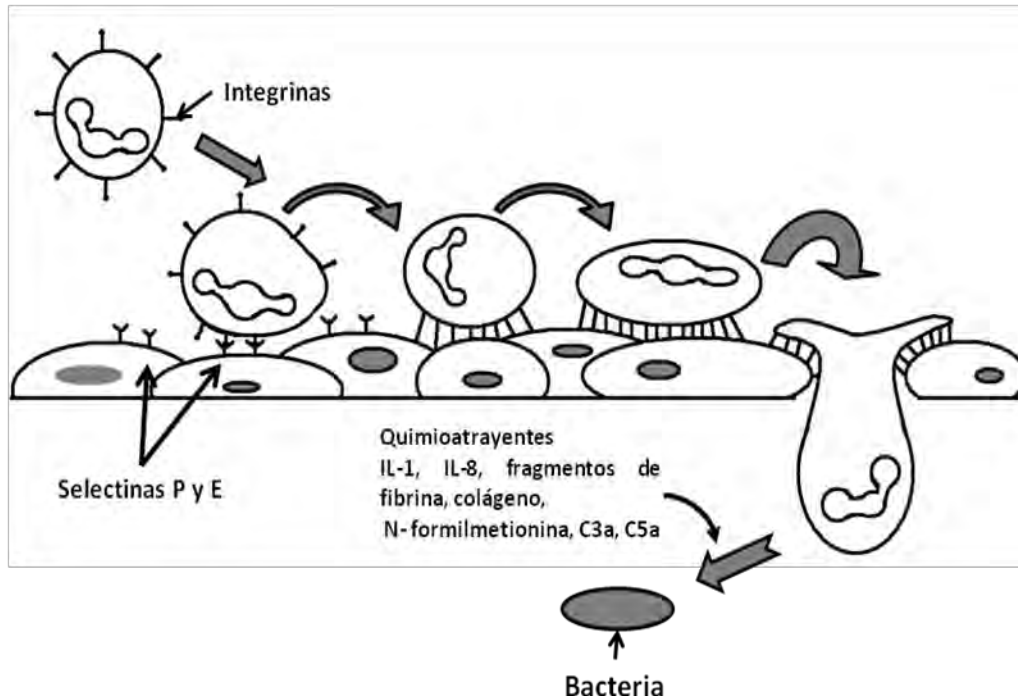


Figura 3. Movimiento del leucocito hacia la zona de inflamación.

Células que interviene en el proceso de la infamación.

Los leucocitos o glóbulos blancos son las células sanguíneas que intervienen en el proceso inflamatorio ya sea fagocitando partículas extrañas, células muertas, pedazos de células, microorganismos nocivos o generando anticuerpos para ayudar a la eliminación de cualquier agente desconocido que cause algún problema al organismo

De los leucocitos quienes principalmente llevan a cabo el proceso de fagocitosis (capacidad de ingerir partículas) son los neutrófilos o polimorfonucleares (PMN), monocitos y los macrófagos (MA). Estos tipos celulares se originan en la médula ósea a partir de un precursor común que pronto dará origen a los precursores específicos: el mieloblasto que dará origen a la línea granulocítica, y el monoblasto que más tarde dará origen al sistema fagocítico mononuclear.

Los neutrófilos son las células circulantes más abundantes del torrente sanguíneo. Sus gránulos contienen varias enzimas y moléculas que ayudan a la degradación de diferentes partículas o células.

Los neutrófilos, al igual que el resto de las células sanguíneas, se producen en la médula ósea a partir de un precursor, permaneciendo ahí hasta su total maduración, es decir hasta el término de desarrollo granular, para después ser liberado hacia el torrente sanguíneo donde permanecerá circulando un periodo aproximado de 12 horas.

Los fagocitos mononucleares, son monocitos que circulan en la sangre y macrófagos diseminados en los tejidos. Durante la hematopoyesis en la médula ósea las células progenitoras de granulocitos y monocitos se diferencian en promonocitos, que salen de la médula ósea y pasan a la sangre, en donde se diferencian de modo adicional en monocitos maduros. Los monocitos circulan en el torrente sanguíneo alrededor de ocho horas, durante las cuales crecen; a continuación, migran hacia los tejidos y se diferencian en macrófagos específicos de tejido o células dendríticas.

La diferencia entre un monocito en un macrófago tisular incluye varios cambios: La célula crece cinco a 10 veces; sus organelos intracelulares aumentan en número y complejidad; adquiere mayor capacidad fagocítica, (produce concentraciones más altas de enzimas) y se dispersan en la totalidad del cuerpo. Los macrófagos libres se desplazan a través de los tejidos mediante movimientos ameboides. Aunque casi siempre se encuentran en estado de reposo, los macrófagos se activan por una diversidad de estímulos en el curso de una reacción inmunitaria. Las células parecidas a macrófagos tienen diferentes funciones en distintos tejidos y se denominan de acuerdo con su localización tisular por ejemplo: Macrófagos alveolares en el pulmón, histiocitos en los tejidos conjuntivos, células de Kupffer en el hígado, células mesangiales en el riñón, células microgliales en el cerebro, osteoblastos en el hueso, etc.

Los eosinófilos y los basófilos son otras células blancas que tienen actividad fagocítica, los eosinófilos se activan por la presencia de factores bacterianos, parásitos, el complemento e inmunocomplejos. Los basófilos son las células

encargadas de la producción de histamina y están más involucrados en una inflamación por alergia.

Los linfocitos, otro tipo de glóbulo blanco, poseen una capacidad fagocítica mínima sin embargo se encarga de llevar a cabo la creación, presentación y liberación de anticuerpos (inmunoglobulinas) que ayudan en el proceso de eliminación de cualquier agente extraño y/o nocivo.

Fagocitosis

Una vez activados los PMN ó MA (involucrados en el proceso de la inflamación) llevan a cabo la fagocitosis. La fagocitosis, en su forma más simple, es el proceso mediante el cual un macrófago ó PMN se unen a un microorganismo o partícula, la unión se realiza mediante la emisión de pseudópodos por parte del macrófago, englobando a la partícula o al microorganismo dando lugar al fagosoma para la posterior destrucción del agente extraño.

Para que se lleve a cabo la fagocitosis es necesario que la partícula ingrese a la célula fagocítica para lo cual existen tres vías: La pinocitosis que se lleva a cabo cuando se forman pequeñas vesículas en la superficie que ingieren partículas de menor tamaño. La endocitosis mediada por receptores que se desencadena por medio de la unión de una ligando a receptores de superficie específico induciendo una invaginación y por lo tanto el ingreso de la partícula al interior de la célula y la fagocitosis.

En la fagocitosis (figura 4) es necesario el reconocimiento de la partícula extraña por parte del PMN o MA, esto se logra cuando la célula fagocítica reconoce, a través de receptores específicos (receptores Fc), a proteínas (inmunoglobulinas) que cubren la superficie de una partícula lo que facilita el ingreso de la partícula al interior de la célula, a este proceso se le conoce como opsonización.

Después de la opsonización se lleva a cabo la digestión (citopesis) en donde las partículas ingeridas por el PMN o MA se mantienen dentro de vacuolas con membrana que se denominan fagosomas, los fagosomas se fusionan con gránulos de almacenamiento (lisosomas) en el citoplasma del fagocito formando así el fago-lisosoma para después vaciar su contenido dentro del fagosoma en un proceso que se conoce como degranulación y así digerir el material capturado.

Los gránulos o lisosomas contienen una gama extensa de enzimas y de otras sustancias que tiene la capacidad para eliminar y degradar bacterias o disolver otros materiales fagocitados. Algunas de las sustancias que forman parte del contenido de los gránulos son: lisozimas, lactoferrina, proteasas, fosfatasas, hialuronidazas, gelatinasas, etc.^{24, 25, 26, 27}

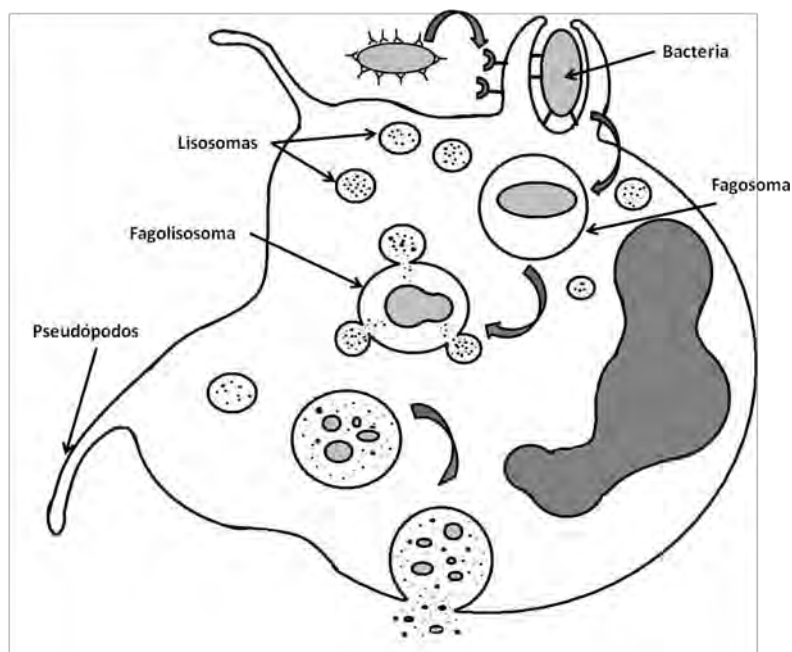


Figura 4. Esquema del proceso de fagocitosis donde se identifican las diferentes etapas, desde la opsonización, la inducción, la formación del fagolisosoma, la degranulación y la exocitosis.

Mecanismo bactericida dependiente de oxígeno.

El oxígeno es esencial para la vida de los organismos aeróbicos este juega un papel vital como aceptor terminal de electrones aunque debido a su naturaleza el oxígeno y sus metabolitos son potencialmente tóxicos.

Además de contener diversas enzimas que intervienen en la degradación de la partícula ingerida, los lisosomas poseen potentes agentes oxidantes generados mediante un complejo multiproteico (NADPH), a lo cual se le conoce como un mecanismo bactericida dependiente de oxígeno en el que intervienen radicales libres de oxígeno (O_2). Los radicales libres de oxígeno o también especies reactivas de oxígeno (ROS) constituyen un grupo que incluye: OH , $ROO\cdot$, $NO\cdot$ y $O_2^{\cdot-}$, O_3 , $HOCl$, H_2O_2 y $ONOO^-$.

Los radicales libres son especies químicas que contienen un único electrón desapareado en una órbita externa. Esta situación le confiere una extremada inestabilidad y reactividad, con lo que reacciona con sustancias químicas tanto inorgánicas como orgánicas (proteínas, lípidos, carbohidratos), y en especial con moléculas de las membranas y con ácidos nucleicos.^{28, 29, 30}

A través de enzimas como la glutatión peroxidasa, que genera un ion superóxido $O_2^{\cdot-}$ y a partir de ahí se forma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o de la enzima óxido nítrico sintetasa, que forma óxido nítrico y que en presencia de $O_2^{\cdot-}$ se generan peroxinitrilos, compuestos altamente reactivos lo cual resulta altamente dañino para microorganismos como bacterias, levaduras, virus y otros agentes patógenos.

Debido a su carácter reductor, el $O_2^{\cdot-}$ generado puede reducir compuestos como el nitroazul de tetrazolio (NBT). El NBT es un compuesto claro amarillo soluble en agua que al reducirse forma el formazán que es de un color azul oscuro con un máximo de absorción de 515 nm. Los resultados se expresan como porcentajes de inhibición de la reducción de NBT, esta prueba es útil para medir la capacidad de fagocitosis de los PMN como en casos de la enfermedad granulomatosa crónica.^{31, 32, 33, 43}

El óxido nítrico (NO) es un radical generado a partir de L-arginina, del oxígeno molecular, NADPH y de la NO sintetasa (NOS), es un gas incoloro y soluble en agua que puede ser cuantificado en plasma mediante métodos directos

(cromatografía de gases, cromatografía de líquidos) o indirectos (espectrometría de masas, espectrometría de UV, etc.) sin embargo debido a la poca vida media (3.8 s) el óxido nítrico cuantificando a través de sus metabolitos estables, NO_2^- y NO_3^- , utilizando la técnica colorimétrica de Griess, esta reacción involucra la generación de un cromóforo mediante la formación de la sal de diazonio de la sulfanilamida con ácido nitroso seguido de una unión con una amina bicíclica (N-etilendiamina) teniendo así un compuesto azo cuya absorbancia se mide a 540 nm.

Otra enzima que interviene en el proceso de citopepsis es la mieloperoxidasa (MPO), la cual es una enzima que en presencia de peróxido de hidrógeno y un alógeno (I_2 o Cl_2) forma iones como el hipoclorito compuesto muy reactivo y que inactiva a enzimas (uniéndose a las proteínas) del microorganismo y por lo tanto contribuye a la degradación del agente extraño.

La exocitosis es la etapa final de la fagocitosis en la cual son expulsados del interior de la célula fagocítica los restos o partes no dañinas del agente degradado.^{34, 35, 36}

Inflamación crónica

Se caracteriza por una duración prolongada de una inflamación y se debe a la persistencia del agente o agentes inflamatorios que desde el principio producen un daño tisular en donde éste es constantemente reparado y se forma tejido de cicatrización así como también se genera angiogénesis, fibrinólisis e infiltrado de PMN, macrófagos, linfocitos y células plasmáticas. Un ejemplo de este tipo de inflamación es la artritis reumatoide.

Una vez eliminado el agente causante de la inflamación, la siguiente fase es la de reparación del tejido lesionado esto a través de una restructuración completa de la estructura celular y de su funcionalidad.³⁷

Fármacos antiinflamatorios

Existen dos clases de fármacos que inhiben la respuesta inflamatoria, ya sea aguda o crónica, unos son las hormonas glucocorticoideas como la hidrocortisona y los otras son los fármacos AINES (antiinflamatorios no esteroideos) que son utilizados con mayor frecuencia para aliviar la inflamación, así como sus síntomas.³⁸

Muchos de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos tradicionales actúan mediante la inhibición de las enzimas, ciclooxygenasas 1 y 2 (COX-1 y COX-2), que sintetizan las prostaglandinas (PG) clasificadas según sus características estructurales (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGG y PGH).

Se piensa que mediante las inhibiciones selectivas de la COX-2 y de la COX-1 son mediadas en gran medida las acciones antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias ya que disminuye la biosíntesis de prostaglandinas. A nivel celular se han propuesto mecanismos más específicos como la interferencia con la activación de neutrófilos: Los AINEs inhiben la capacidad de adherencia de las células sanguíneas blancas, especialmente neutrófilos; con la consecuente inhibición de la quimiotaxis y de la agregación de neutrófilos. También los AINEs estimulan la liberación de óxido nítrico. Sin embargo los estudios actuales señalan que estas acciones no son la única forma para producir su efecto antiinflamatorio, sino que también de manera directa o indirecta modifican otros mediadores de la inflamación tales como la producción de radicales de oxígeno y metabolitos citotóxicos, la generación de las citocinas que intervienen en la inflamación crónica así como también actúan en el sistema del complemento.

Entre los AINEs más representativos se encuentran la aspirina, el acetaminofen, la indometacina, el diclofenaco, naproxén entre otros.^{39, 40, 41}

La Indometacina, fármaco introducido a partir de 1965, con acción antiinflamatoria similar a la aspira pero de 20 veces mas potente, es un derivado metilado del indol, reduce la migración de neutrófilos y disminuye la proliferación de linfocitos T

y B. Es recetada en casos clínicos de osteoartritis, espondilitis anquilosante y artritis reumatoide. Los efectos a nivel gastrointestinal son el dolor abdominal, diarrea, hemorragia gastrointestinal y pancreatitis. Con los cuales tienden a perder peso, también manifiestan la cefalea, mareos, confusión y depresión se presentan hasta en la cuarta parte de pacientes medicados. Se ha observado necrosis papilar renal. Su uso debe evitarse en pacientes con pólipos nasales o angioedema, y en pacientes asmáticos se puede desencadenar crisis y mujeres embarazadas.⁴²

Los efectos secundarios relacionados al uso de AINES son principalmente un daño gastrointestinal, debido a la formación de úlceras gástricas esto debido a la inhibición de prostaglandinas (PGE1 y PGE2) relacionadas con la protección del epitelio gástrico ya que estas PG inhiben la producción de ácido y favorecen la síntesis de mucosa gástrica resultando en un factor citoprotector. Otros efectos adversos son la inhibición plaquetaria, hepatotoxicidad, daño renal y reacciones alérgicas.^{44, 45, 46}

Actividad antioxidante

La actividad antioxidante es ampliamente utilizada como parámetro para caracterizar diferentes materiales vegetales. Esta actividad se relaciona con compuestos capaces de proteger un sistema biológico del efecto potencialmente dañino de procesos que causan excesiva oxidación, involucrando especies reactivas del oxígeno. Existen diversos métodos para la evaluación de la capacidad antioxidante de muestras biológicas. Algunos de ellos utilizan la producción de un radical orgánico o especies reactivas del oxígeno y otros se basan en la oxidación-reducción de iones metálicos. Se han desarrollado varios métodos espectrofotométricos para la determinación del potencial antioxidante de diferentes sistemas bioquímicos.^{47, 48}

Peroxidación lipídica.

La peroxidación lipídica es un proceso en cadena mediado por radicales libres que causa la degradación de los lípidos, en particular su acción a nivel de las membranas celulares. Este proceso se relaciona con numerosas alteraciones patológicas como la inflamación, la toxicidad hepática, los trastornos vasculares y el envejecimiento. La peroxidación se puede iniciar catalizada por enzimas o por mecanismos de tipo no enzimático (radiaciones, catalizado por metales). En ambos casos, la peroxidación lipídica se inicia por el ataque de un radical libre reactivo sobre un ácido graso poliinsaturado (AGP), con la abstracción de un átomo de hidrógeno y la formación de un radical del ácido graso (AGP) que sufre una reorganización formándose un dieno conjugado que rápidamente reacciona con oxígeno para formar el radical lipoperoxilo (AGPOO). Este radical puede atacar a otros ácidos grasos formándose hidroperóxidos lipídicos (AGPOOH) y nuevos radicales libres, propagando el proceso. La fase de finalización ocurre cuando dos radicales libres reaccionan entre sí, o cuando el radical reacciona con una sustancia donante de átomos de hidrógeno (llamada antioxidante, reductor o captador de radicales libres), dando lugar a productos inactivos. Como productos finales del proceso están los hidroperóxidos, hidroxiácidos grasos, epoxiácidos grasos, aldehídos poliinsaturados, hidroxialdehídos, dialdehídos, cetonas y otros, que pueden reaccionar con grupos amino de proteínas, fosfolípidos o ácidos nucleicos (ADN), lo que contribuye a un daño celular comprometiendo el buen funcionamiento y la calidad del sistema biológico o a los elementos que los contienen. Uno de los productos formados en este proceso es el malondialdehído (MDA), que tiene la capacidad de formar productos coloreados (rosa) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), dando un máximo de absorción a 532 nm. Este es el mecanismo químico más usado para determinar la extensión de la peroxidación.^{49,}

50, 51, 52

Planteamiento del Problema.

El género *Tephrosia* sp abarca alrededor de 15 mil especies, es una planta a la cual se le conocen diversos efectos biológicos sin embargo solo 50 especies existentes en México se han estudiado químicamente descubriendo efectos tales como fungistático, antiinflamatorio, insecticida, antibiótica entre otras.

Recientemente se han comenzado a realizar estudios de Los géneros *T. madrensis* y *T. crassifolia* evaluando su actividad antiinflamatoria y antibiótica, sin embargo aun quedan algunas preguntas por resolver ¿Qué tipo de efecto tiene el uso o el consumo de la *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*? ¿Este tipo de plantas tienen algún efecto realmente benéfico? ¿Tienen algún efecto antifúngico ó antiinflamatorio o antioxidante? ¿Todas las partes de la planta tienen el mismo efecto?

De ahí la necesidad de crear un perfil importante de las plantas *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* que se encuentran en México, a través de una investigación científica, delimitando su uso o favoreciendo este, además de tratar de encontrar otros usos útiles. Es importante proporcionar a la población del país la información sobre estas plantas así como la posible tecnología eficaz proveniente del estudio colocándola al alcance de sus recursos económicos.

Objetivo.

Evaluar la actividad antifúngica así como también evaluar la actividad fagocítica medida por reducción de NBT y generación de óxido nítrico y peroxidación lipídica en suero, de los extractos y compuestos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*.

Objetivos particulares.

1. Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* sobre *Aspergillus flavus* mediante un método de pozo en placa.
 2. Determinar la actividad de reducción de NBT en polimorfonucleares para conocer el comportamiento de los extractos *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*, en la fagocitosis comparando contra Indometacina.
 3. Determinación de nitritos en suero y líquido peritoneal de ratones tratados con Hidrgartol B, de *Tephrosia crassifolia*, y con LPS a través del método Griess, usando la Indometacina como control positivo.
 4. Determinación de peroxidación lipídica en plasma de ratón previamente tratado con extracto de *Tephrosia crassifolia*, Hidrgartol B, mediante el método de MDA-TBA
-

Hipótesis.

Si del genero *Tephrosia* esta reportado que hay especies que presentan actividad antifúngica, antiinflamatoria y antioxidante entonces los extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* presentarán actividad antifúngica en un modelo contra *Aspergillus flavus* así como también presentarán efecto disminuido en la reducción del NBT y en la generación de nitritos y peroxidación lipídica.

Diseño de investigación.

- Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* sobre *Aspergillus flavus*.

Tipo de Estudio: Experimental, Prospectivo, Longitudinal y Comparativo

- Evaluación de la actividad de reducción de NBT y de peroxidación lipídica de los extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*.

Determinación de reducción de NBT.

Población: Hombre o mujer de 18 a 30 años que se encuentre en buen estado de salud y que se factible de donar sangre.

Criterio de inclusión: Hombre de 25 años en buen estado de salud y que sea factible de donar sangre.

Criterios de exclusión: Personas que no se encuentren dentro de la edad requerida, que presenten algún padecimiento y que estén consumiendo algún tipo de fármaco o sustancia que interfiera en el experimento.

Criterios de eliminación: Que la persona el proceso de la investigación adquieran un padecimiento.

Determinación de nitritos y peroxidación lipídica en suero de ratón.

Población: Ratones machos CD 1 con peso promedio de 30 a 40g divididos en tres grupos de seis ratas cada uno.

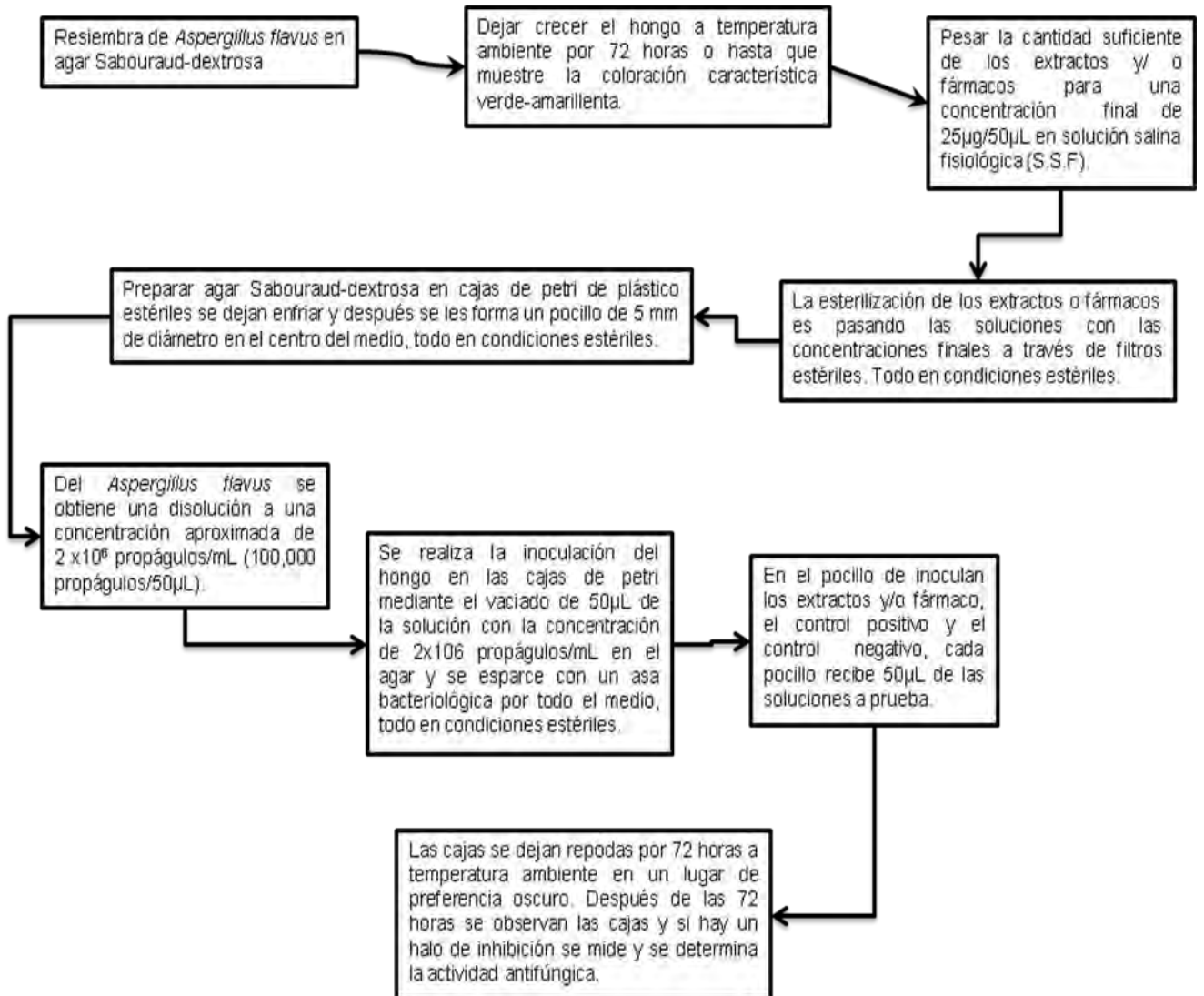
Criterios de inclusión: Ratones machos de 4 meses de la cepa CD 1, sanos y dentro del rango de peso.

Criterios de exclusión: Ratones que no se encuentren entre la edad y peso requerido y que presenten algún padecimiento.

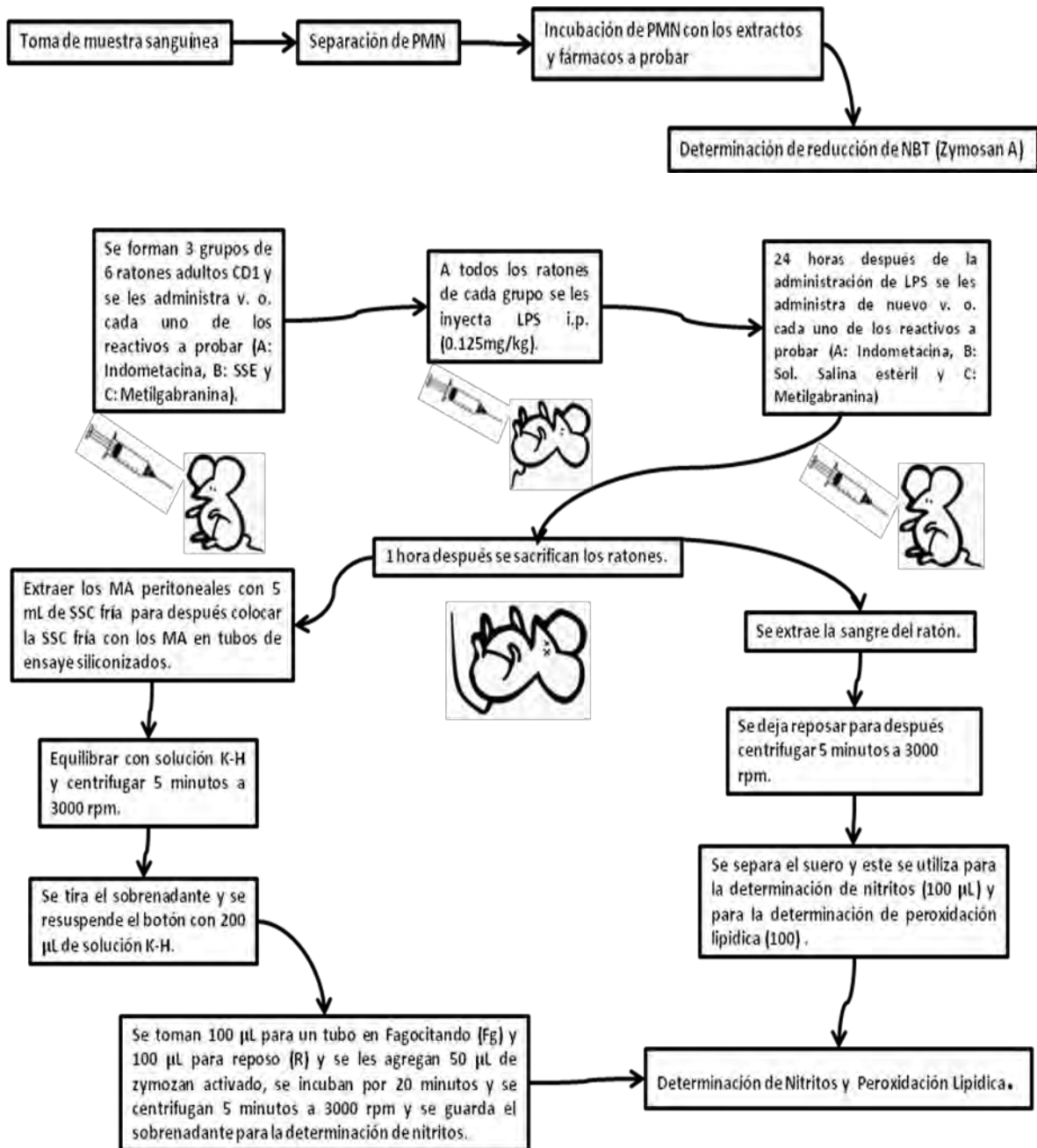
Criterios de eliminación: Ratones que en el proceso de la investigación adquieran un padecimiento o en su caso la muerte.

Diagrama de flujo

Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* sobre *Aspergillus flavus* mediante un método de pozo en placa.



Evaluación de la actividad de reducción de NBT y de peroxidación lipídica de los extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*.



Materiales reactivos y equipo.

Material.

Tubo metálico con 5mm de diámetro
Tubos de ensayo estériles falcon
Tubos de ensayo 13 x150 de tapón con rosca
Tubos 13 X 100 con EDTA
Tubos 13 X 100 siliconizados
Tubos 13 X 100
Tubos 13 X 150
Tubos ephendor
Pipetas graduada 5 mL
Pipeta graduada 10 mL
Pipetas Pasteur
Jeringa 1 mL
Jeringa 5 mL
Matraz erlenmeyer
Cámara de Neubauer
Filtros milipore de 0.22 µL
Puntas para pipeta estériles
Asa bacteriológica
Asa micológica
Gradilla
Parafilm
Bulbos
Fascos de plástico con capacidad para 10 mL
Cajas de petri de plástico estériles de 60x 15 mm
Celdas para espectrofotómetro
Cánula oral

Reactivos.

TBA (ácido tiobarbiturico)	Sintetizado en el laboratorio de orgánica.FES Zaragoza UNAM.
1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMP)	Aldrich
Zymosan A	Sigma
Silicón 1%	
Solución salina estéril (SSE)	
Solución citratada fría (SSC)	
Solución Krebs- Henseleit (K-H)	
Solución buffer de fosfatos (PBS)	
Colorante azul-algodón lactofenol	

Ácido acético	Merck
Ácido clorhídrico(HCl) 0.1N y 2.5N	Merck
Ácido Ortofosfórico0.2M	
Agar Sabuoraud-Dextrosa	Bioxon
Agua destilada	Theissier
Alcohol	Bioxon
Bicarbonato de sodio	JT. Baker
Borato de sodio (NaB ₂ O ₇)	JT. Baker
Butiril-hidroxitolueno (BHT)	Monterrey S.A. de C.V.
Cadmio metálico(Cd)	Técnica química S.A.
Cianuro de potasio(KCN) 0.01M	JT. Baker
Citrato de sodio	Merck
Cloruro de amonio(NH ₄ Cl)	JT. Baker
Cloruro de calcio	Sigma
Cloruro de sodio (NaCl)	JT. Baker
EDTA	Sigma
Terbinafina (Lamisil)	Merck
Fosfato de potasio	Merck
Fosfato de sodio	JT. Baker
Glucosa	Merck
Hidróxido de sodio	Merck
Indometacina	Laboratorios Merck
Indometacina GI	Sector salud
Diclifenac	Laboratorios Novartis
NBT (Solución NBT al 0.1 %)	Sigma
n-butanol	JT. Baker
Nitrito de sodio	JT. Baker
N-(1-naftil)-etilendiaminodiclorhidratado (NED)	Merck
Piridina	Baker
Polimorphprep	Nycomed
Sulfanilamida	Merck
Sulfato de cobre CuSO ₄	Técnica clínica
Sulfato de zinc (ZnSO ₄)	HYCEL de México

Equipo.

Agitador vortex genie	Scientific Industries Inc
Agitador rocker platform	Bellco Glass
Balanza analítica	Mettler H33AR
Balanza granataria	Ohaus
Baño metabólico	Precision
Centrífuga	Solbat
Centrífuga clínica	Hamilton Bell
Congelador (-4°C)	Revco
Espectrofotómetro Spectronic 20	Bausch & Lomb
Incubadora	Riossa EC
Microcentrífuga	Hermle 2233M-2
Microscopio	Zeiss
Micropipeta de 5-40 µL	Finnpipette-Labsystems
Micropipeta de 10-100 µL	Labpette-Labnet
Micropipeta de 100-1000 µL	BIOHIT Proline
Pipeta automática	Finnpipette, de 20-400 microlitros
Refrigerador	Philips 127 volts-VA

Material biológico

Suero de humano

Suero de ratón

LPS de *Escherichia coli* cepa O 111 (Anexo 4)

Cepa de *Aspergillus flavus*, aislada y proporcionada por la QFB. Patricia Vidal Millán del laboratorio de producción microbiológica de Campus I FES-Zaragoza, UNAM.

- Material vegetal

El material vegetal utilizado fue recolectado, desde hojas, tallos y raíz de las plantas *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* en el municipio de Compostela en el estado de Nayarit, en enero de 1995.

El material vegetal seco y molido se extrajo mediante un proceso de maceración con diferentes disolventes en orden de polaridad ascendente a temperatura ambiente durante 24 horas con cada uno, obteniendo las siguientes sustancias:

Extracto con acetato de etilo de la raíz de la *T. madrensis* (AE Tm R)

Extracto metanolico de la hoja de *T. madrensis* (M Tm H)

Extracto con diclorometano de la raíz de *T. madrensis* (D Tm R)

Extracto metanolico de la raíz de *T. madrensis* (M Tm R)

Extracto metanolico de la raíz de la *T. crassifolia* (Tc Me R)

Compuestos puros de *Tephrosia crassifolia*. Los compuestos aislados se caracterizaron basándose en sus constantes físicas y espectroscópicas, así como por comparación en ccf en algunos casos con muestras auténticas. Las muestras de materiales puros fueron proporcionadas por el Dr. Federico Gómez Garibay del Instituto de Química UNAM

Crassifolina A

Hidlgartol B

Tephromicrocarpanona C

Metilgrabanina D

Metilhidlgartol E

Metodología.

Evaluación de la actividad antifúngica de diferentes extractos de *Tephrosia sp* sobre *Aspergillus flavus*

- Procedimiento
 - Se realiza una resiembra de *Aspergillus flavus* en agar Sabouraud-dextrosa en tubos de ensaye de 13 x150 de tapón de rosca.
 - Se deja crecer el hongo a temperatura ambiente por 72 horas o hasta que muestre la coloración característica verde-amarillenta, confirmando a través de un frotis con colorante azul-algodón lactofenol que se trate de *Aspergillus flavus*.

- Se pesa la cantidad suficiente de los compuestos y de los extractos para tener una concentración final de 25µg/50µL en solución salina fisiológica (S.S.F).
- Se prepara agar Sabouraud-dextrosa, como medio de crecimiento del hongo, suficiente para 72 cajas de petri de plástico estériles de 60 x 15 mm. (10 ml de agar por caja de petri). Se vacía el agar en las cajas, se deja enfriar y después se les forma un pocillo de 5 mm de diámetro en el centro del medio, todo en condiciones estériles.
- Como control positivo se utiliza el fármaco Lamisil® (Terbinafina) en comprimidos de 250 mg. Se disuelve un comprimido en 10 ml de agua destilada posteriormente se mezclan 100 µL de esta disolución en 6.15 mL de S.S.F. para una concentración final de 20 µg/50µL.
- Como control negativo se utiliza solución salina fisiológica.
- Con el *Aspergillus flavus* se realiza una disolución a una concentración aproximada de 2×10^6 propágulos/mL para una concentración final de 100,000 propágulos/50µL.
- Para obtener la concentración de propágulos se hace una cuenta de estos en cámara de Neubauer en donde:
 -
 - $$\text{N}^\circ \text{ de propágulos/mm}^3 : n/4(\text{mm}^2) 0.1\text{mm}$$
 -
- n= propágulos contados
4= cuadros contados.
La cuenta se realiza en los cuadrantes utilizados para la cuenta de glóbulos blancos.
- Para la esterilización de los extractos y fármacos las soluciones con las concentraciones finales son pasadas a través de filtros milipore de 0.22µm estériles, el filtrado es colectado en tubos de plástico falcon estériles. Todo en condiciones estériles.

- La inoculación del hongo se realiza mediante el vaciado de 50µL de la solución con la concentración de 2×10^6 propágulos/mL en el agar y se esparce con un asa bacteriológica por todo el medio, todo en condiciones estériles.
- En el pocillo de inoculan los extractos, el control positivo (terbinafina) y el control negativo (SSF), cada pocillo recibe 50µL de las soluciones a prueba.
- Las cajas se dejan reposar por 72 horas a temperatura ambiente en un lugar de preferencia oscuro.
- Después de las 72 horas se observan las cajas y si hay un halo de inhibición se mide y se determina la actividad antifúngica.
- El experimento se realiza por triplicado.

Evaluación de la actividad de reducción de NBT, nitritos y de peroxidación lipídica de los compuestos y extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*.

- Determinar la actividad de reducción, de los compuestos y extractos *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia*, sobre NBT para conocer el comportamiento de fagocitosis.
- Procedimiento
 - Se colectaron 20 mL de sangre por punción venosa en tubos con EDTA.
 - Se obtuvo una suspensión celular de polimorfonucleares (PMN). Los 20 mL de sangre se repartieron en 3 mL de sangre por tubo de 13 X 150, con 2.5 mL del gradiente de polymorphoprep para después centrifugar durante 30 minutos a 1500 rpm.
 - Con una pipeta pasteur se obtuvo el anillo de polimorfonucleares (PMN) los cuales se colocaron en un tubo siliconizado etiquetando dicho tubo como suspensión celular.
 - Se realizaron 2 lavados, con solución Krebs-Henselit (K-H), de la suspensión celular y después se realizó una cuenta de PMN en una cámara

-
- de Neubauer para conocer la concentración celular con la que se trabajó (en un volumen aproximado de 0.5 mL)
- Opsonización de Zymosan A: Se pesaron 10 mg de Zymosan y se diluyeron en 5 mL de agua destilada, se centrifugó la solución por 5 minutos a 3000 rpm, se decantó y al sedimento se le agregó de nuevo agua destilada repitiendo esto hasta que el sobrenadante quedó claro.
 - Terminados los lavados el botón se resuspendió en 1 ml de suero fresco, (en tubo siliconizados), se mezcló y se incubó por 20 minutos a 37° C, después se centrifuga por 5 minutos a 3000 rpm, esto se hizo 2 veces con 3 mL de solución K-H. Al final se resuspendió el botón con 1 mL de suero fresco.
 - Para determinar la actividad de NBT de los compuestos, extractos y fármacos estos se incubaron con las células; para la incubación:
 - Se adicionaron 200 μ L del extracto (a una concentración de 25 μ g/50 μ L) a un tubo de 13 x 100 siliconizado y se agregaron 300 μ L de la solución K-H completando 500 μ L. Todos los extractos recibieron el mismo tratamiento.
 - Como control negativo se utilizó Indometacina GI (a una concentración de 50 μ g/ 10 μ L) agregando 20 μ L de esta solución a un tubo siliconizado completando con 480 μ L se solución K-H, la Indometacina (Lab. Merk) y el Diclofenaco se trataron del mismo modo.
 - Como control positivo se utilizaron 500 μ L de solución K-H en tubo siliconizado.
 - Tanto a los tubos con los diferentes extractos, como a los tubos con los controles mas 2 tubos (solo con silicón) se les vertieron 100 μ L de la suspensión celular a concentración conocida.
 - Todos los extractos así como los controles y los dos tubos solo con suspensión celular se incubaron durante 20 minutos a 30° C.
 - Terminando el periodo de incubación los tubos se centrifugaron 5 minutos a 3000 rpm, se tiró el sobrenadante y el botón se resuspende con 100 μ L de solución K-H.
 - Prueba de NBT. Todo en tubos siliconizados:
-

- Por ser mas de 10 extractos a evaluar mas los controles, todos los tubos se colocan en fagocitando (Fg) y solo dos tubos (los tubos con solo 100 µL de suspensión celular conocida) en reposo (R) agregando los siguientes reactivos. Tabla de orden de los reactivos según los tubos :

	Tubos Fg	Tubos R
NBT	0.4 mL	0.4 mL
KCN	0.1 mL	0.1 mL
Solución K-H	0.35 L	0.4 mL
Zymosan A	50 µL	- ---
Incubar a Baño María 20 minutos a 37°C		
HCl 2.5 N	2 mL	2 mL
- Centrifugar 15 minutos a 3000 rpm		

- Después de centrifugar, se decantaron y al precipitado se le agregó 2 mL de piridina (en campana de extracción) y se leyeron directo en el espectrofotómetro a 515 nm con celdas de cuarzo.
- Determinación de nitritos en suero y líquido peritoneal de ratón previamente tratado con Hidlgartol B.
- Procedimiento:
 - Se formaron tres grupos de 6 ratones, Grupo A: Indometacina, Grupo B: solución salina estéril, Grupo C: Hidlgartol B, se marcó y pesó cada ratón.
 - De acuerdo con el peso de cada ratón se les administró vía oral (v.o.) a cada ratón el extracto, el fármaco control o la solución salina según corresponda a las concentraciones adecuadas.
 - Extracto de *Tephrosia Crassifolia*, Hidlgartol B estéril a una dosis de 40 mg/kg de peso de ratón.
 - Indometacina (GI) a dosis de 10mg/kg
 - La solución salina estéril solo se administró oralmente 0.2 mL ajustados al promedio del peso de los ratones.

- Después de una hora de la administración v. o. del extracto, fármaco y solución salina estéril, a todos los ratones se les inyectó vía intraperitoneal (i.p.) LPS de *E. coli* (anexo 4) a una concentración de 0.125mg/kg de peso del ratón.
- Después de la administración de LPS los ratones se dejan 24 horas con comida y agua. Terminadas las 24 horas se les administró de nuevo v.o. el extracto, el fármaco y la solución salina estéril, según corresponda, a las mismas concentraciones.
- 1 hora después los ratones se sacrificaron, obteniendo la sangre y los macrófagos peritoneales.
- La sangre se obtiene mediante un corte en la axila del ratón.
- Para obtener los macrófagos peritoneales (después de la obtención de la sangre) en la cavidad peritoneal se les inyecta 5 mL de solución citratada fría, se sacude el ratón y se extrae toda la solución citratada colocándola después en tubos de ensaye siliconizados, los cuales se nivelan con solución K-H para centrifugarlos por 5 minutos a 3000 rpm.
- Se tira el sobrenadante y se resuspende el botón con 200 μ L de solución K-H. Se toman 100 μ L para tubos en Fagocitando (Fg) y 100 μ L para tubos en Reposo(R).

	Tubos Fg	Tubos R
KCN	25 μ L	25 μ L
Solucion K-H	50 μ L	100 μ L
Zymosan A	50 μ L	---
Incubar a Baño María 20 minutos a 37°C		

- Después se centrifugaron por 5 minutos 3000 rpm, separado el sobrenadante utilizando este para la medición de nitritos tanto de Fg como de R.
- De la sangre obtenida se toman 100 μ L de suero para la determinación de nitritos.
- Determinación de nitritos:
 - Activación de Cadmio. (Anexo 1)

-
- A 100 μ L de suero se le adicionan 300 μ L de agua destilada (1:4) y 20 μ L de la solución de ZnSO₄, se mezcla y se centrifuga 5 minutos a 10,000 rpm separando el sobrenadante.
 - Al tubo con el cadmio activado se le escurre el NH₄Cl, el cadmio se adiciona al tubo con el sobrenadante de la muestra y se deja en agitación tapados con parafilm en un rocker por 15 minutos.
 - Después se centrifugaron los tubos a 5 minutos 3000 rpm y se toman 200 μ L del sobrenadante para el ensayo.
 - Curva de calibración (Anexo 3)
- Determinación de peroxidación lipídica en plasma de ratón previamente tratado con Hidlgartol B.
 - Procedimiento:
 - Formar tres grupos de 6 ratones, Grupo A: Indometacina, Grupo B: solución salina estéril, Grupo C: Hidlgartol B, marcar y pesar cada ratón.
 - De acuerdo con el peso de cada ratón se les administra vía oral (v.o.) a cada ratón el extracto, el fármaco control o la solución salina según corresponda a las concentraciones adecuadas.
 - Extracto de *Tephrosia Crassifolia*, Hidlgartol B estéril a una dosis de 40 mg/kg de peso
 - Indometacina (GI) a dosis de 10mg/kg
 - La solución salina estéril solo se administra oralmente 0.2 mL ajustados al promedio del peso de los ratones.
 - Después de una hora de la administración v. o. del extracto, fármaco y solución salina estéril, a todos los ratones se les inyecta vía peritoneal (i.p.) LPS de *E. coli* (anexo 4) a una concentración de 0.125mg/kg de peso del ratón.
 - Después de la administración de LPS los ratones se dejan 24 horas con comida y agua. Terminadas las 24 horas se les administra de nuevo v.o. el
-

- extracto, el fármaco y la solución salina estéril, según corresponda, a las mismas concentraciones.
- 1 hora después los ratones se sacrifican, obteniendo la sangre y los macrófagos peritoneales.
 - La sangre se obtiene mediante un corte en la axila del ratón.
 - De la sangre obtenida se toman 100 μ L de suero para la determinación de peroxidación lipídica.
 - Peroxidación Lipídica. Método de TBA (Determinación de MDA reactivos)
 - A 100 μ L de suero adicionar 10 μ L de BHT (2mM) mezclado bien. De esta mezcla se toman 100 μ L y se diluyen en 400 μ L de PBS (1:5), de esta mezcla se toman 400 μ L y se le agregan 50 μ L de BHT(12.6mM) mas 400 μ L de ácido o-fosfórico (0.2M), se mezcla bien y se centrifuga 30 minutos a 3000 rpm.
 - Adicionar 50 μ L de TBA (0.11M/L)
 - Poner la mezcla de reacción en un baño maría a 90°C por 15 minutos con los tubos tapados con aluminio.
 - Terminado el baño maría poner inmediatamente los tubos en hielo y agregar 1000 μ L de n-butanol más 100 μ L de NaCl (solución saturada), agitar vigorosamente por 30 segundos cada tubo.
 - Centrifugar 5 minutos a 3000 rpm.
 - Transferir 500 μ L de la fase orgánica (sobrenadante) a una celda para espectrofotómetro.
 - Leer en el espectrofotómetro a 535 nm y 572 nm con un blanco de n-butanol. (Anexo 3)

Análisis estadístico: Se aplicó el programa estadístico SPSS-10 para Windows Comparación múltiples de medias (ANOVA) entre los diversos parámetros determinados y tratamientos. Prueba de diferencias significativas de Tukey (HSD) para los parámetros determinados vs tratamiento, con una $\alpha=0.05$.

Resultados

- Después de la observación durante 5 días consecutivos, se encontró que los extractos no presentan algún tipo de actividad antimicótica ya que el crecimiento del hongo en las cajas con los extractos y la solución salina (control negativo) fue idéntico por el contrario en las cajas con el fármaco terbinafina la inhibición, del crecimiento del hongo, se presento en toda la caja durante los 5 días que se hizo la observación. (Imagen 1). Para la prueba de NBT con extractos de *Tephrosia sp* los resultados están en las. (Cuadros 1, 2 y Grafica 1)

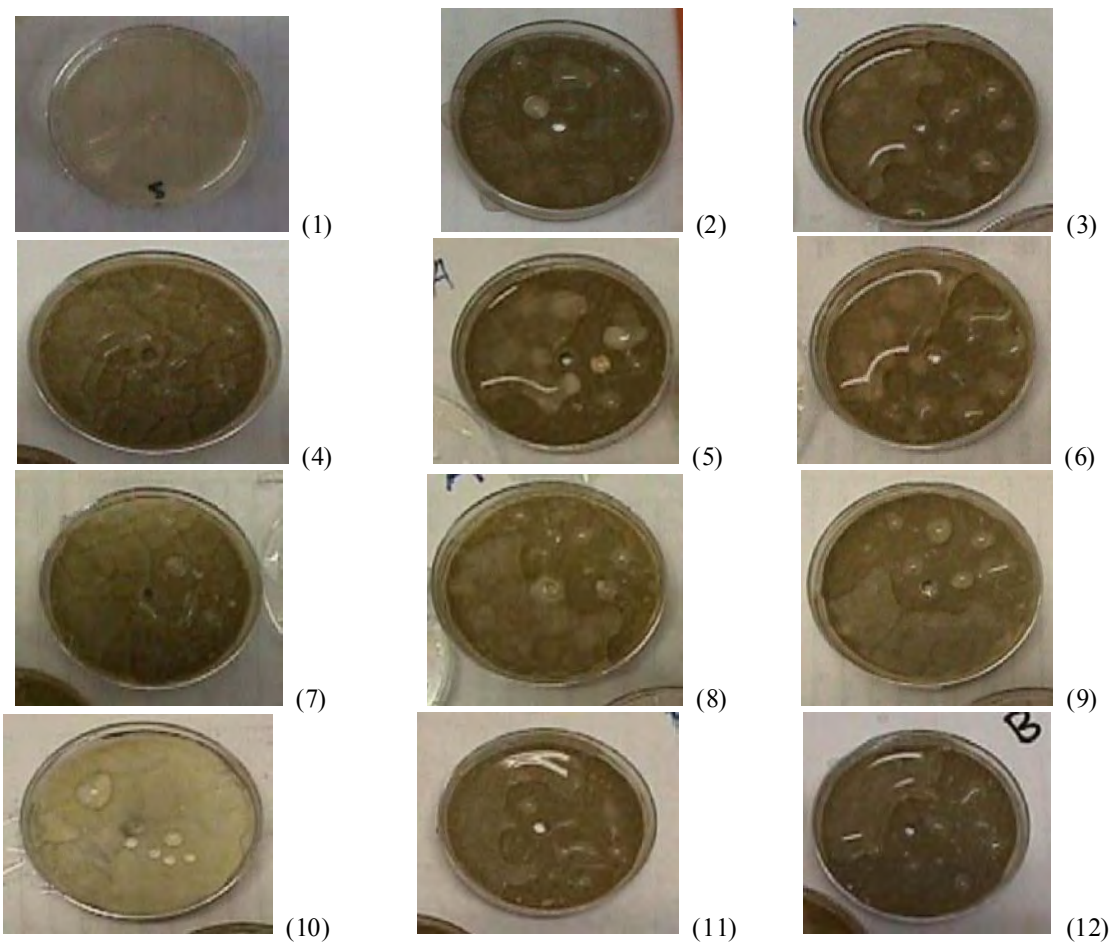
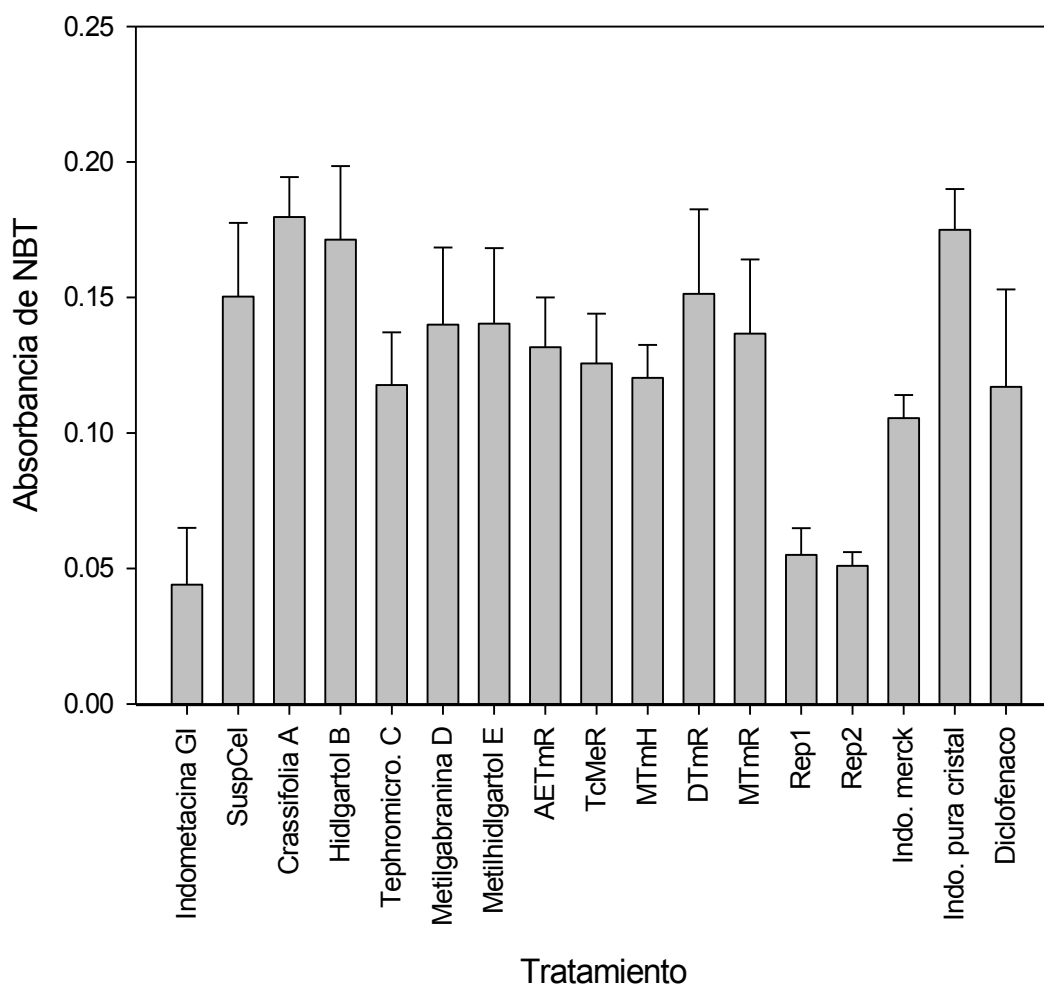


Imagen1. Observación de las cajas después de 5 días. (1) caja de petri con Terbinafina. (2) solución salina. (3) *Crassifolia A.* (4) *Hidlgartol B* (5) *Tephromicrocarpanona C* (6) *Metilgabanina D* (7) *Metilhidlgartol E* (8) *AETmR* (9) *TcMeR* (10) *MTmH* (11) *DTmR* (12) *MTmR*.

Tratamiento	Medias±error estandar
Indometacina GI	0.044000 ±0.0210079
SuspCel	0.150333±0.0272050
Crass A	0.179667±0.0147686
HidlgB	0.171333±0.0271559
Tephro C	0.117667±0.0194622
Metilga D	0.140000±0.0284312
Metilhid E	0.140333±0.0278827
AETmR	0.131667±0.0183697
TcMeR	0.125667±0.0183515
MTmH	0.120333±0.0121427
DTmR	0.151333±0.0311840
MTmR	0.136667±0.0273821
Indo merck	0.105500±0.0085000
Indo pura cristal 1	0.175000±0.0150000
Diclofenaco	0.117000±0.0360000
Reposo 1	0.055000±0.0098489
Reposo 2	0.051000±0.0050332

Cuadro 1 Medias±error estandar de la media de formazan a 515 nm.

Comparación de medias entre diferentes extractos contra diferentes indometacina y diclofenaco.



Grafica 1. Medias ± error estándar

Tratamiento	Categorías	Medias±error estándar	Sig.
Indometacina GI	Crassifolina A	1356667±0.0326066*	0.018
	Hidlgartol B	1273333±0.0326066*	0.033
	Indometacina pura cristal 1	1310000±0.0343109*	0.043
Reposo	Crassifolina A	1246667±0.0306886*	0.024
	Hidlgartol B	1163333±0.0306886*	0.046
Reposo	Crassifolina A	1286667±0.0306886*	0.017
	Hidlgartol B	1203333±0.0306886*	0.034

Cuadro 2 Los compuestos Crassifolina A, Hidlgartol B e Indometacina pura cristal 1 comparados contra la Indometacina GI presentan una actividad significativa en la reducción de NBT (*P= 0.018, *P= 0.033 y *P= 0.043 respectivamente). Los compuestos Crassifolina A e Hidlgartol B comparados contra reposo presentan una actividad significativa en la reducción de NBT. .

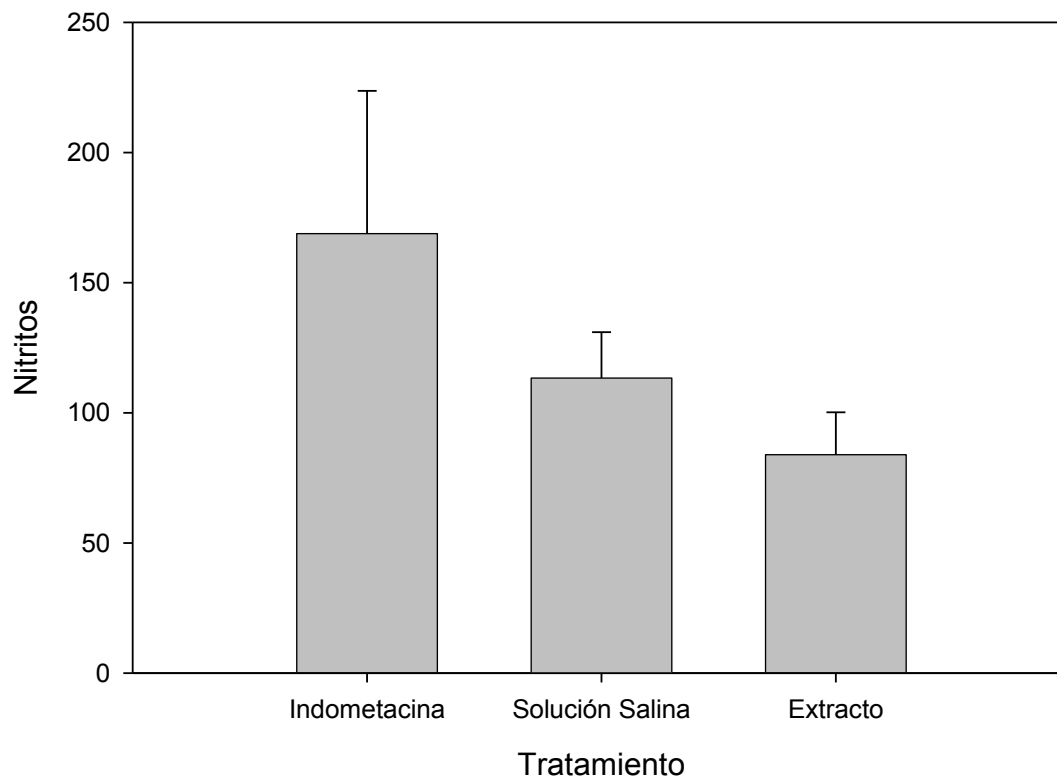
Determinación de nitritos en suero y en líquido peritoneal de ratón previamente tratado con Hildgartol B.

Resultados Nitritos en suero de ratón. (Cuadro 3 y Gráfica 2)

Tratamiento	Media \pm error estandar	Sig.
Indometacina GI	168.797933 \pm 134.3797258	0.524
Solución Salina	113.289650 \pm 43.2637990	0.843
Hidlgartol B	83.907420 \pm 36.4620468	0.270

Cuadro 3 Comparación de medias de las absorbancias con respecto al tratamiento. Indometacina, solución salina, e Hidlgartol B $P \leq 0.05$.

Comparación de medias de las concentraciones de nitritos con respecto al tratamiento



Gráfica 2 Medias \pm error estándar. Indometacina vs sol.salina e Hidlgartol B. $P=0.524$ NS (ANOVA).

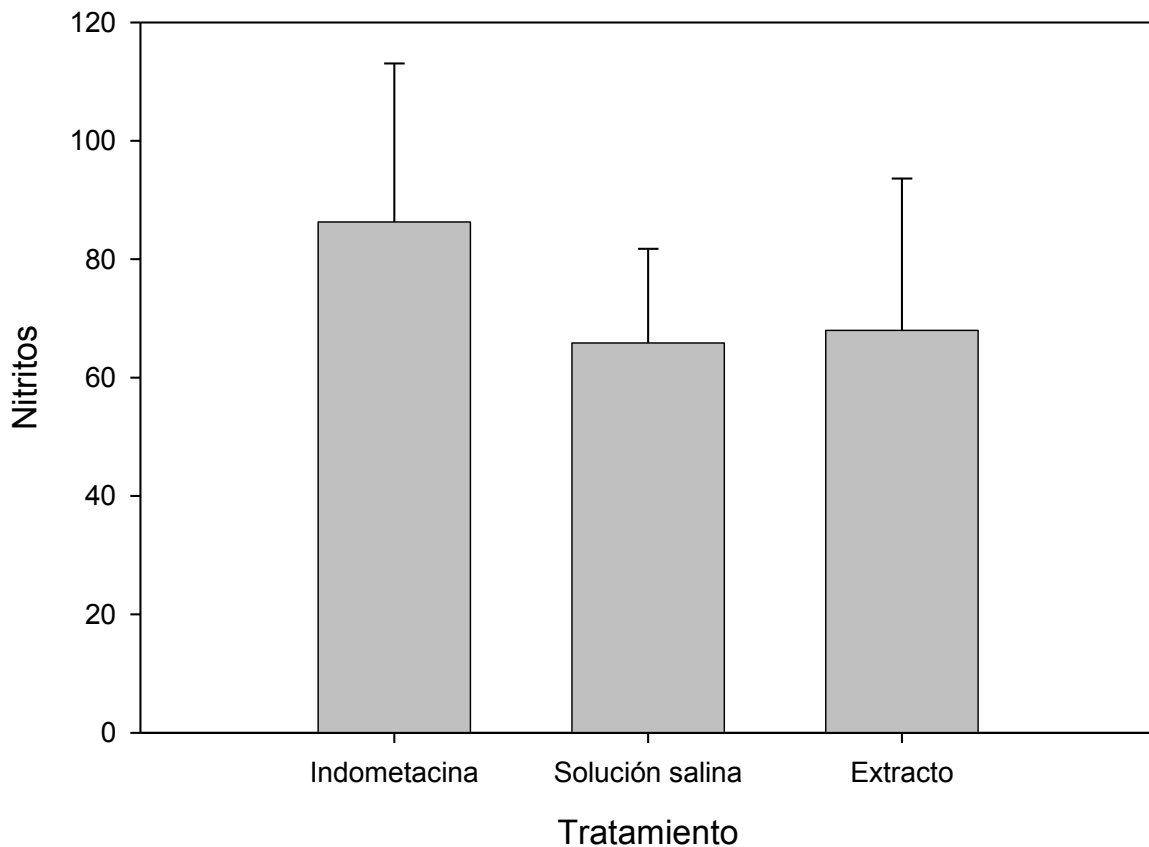
Resultados estadísticos de Nitritos (NO_2) en macrófagos peritoneales de ratón.

Resultados Nitritos (NO_2) en macrófagos peritoneales fagocitando (Fg) (Cuadro 4 y Gráfica 3)

Tratamiento	Media \pm error estandar	Sig.
Indometacina GI	86.293267 \pm 65.5244145	0.798
Solución salina	65.833033 \pm 39.0306168	0.998
Hidlgartol B	67.973720 \pm 57.3149257	0.848

Cuadro 4: Comparación de medias de las absorbancias con respecto al tratamiento. Indometacina, solución salina, e Hidlgartol B $P \leq 0.05$.

Comparación de medias de las concentraciones de nitritos con respecto al tratamiento en macrófagos peritoneales (fagocitando)



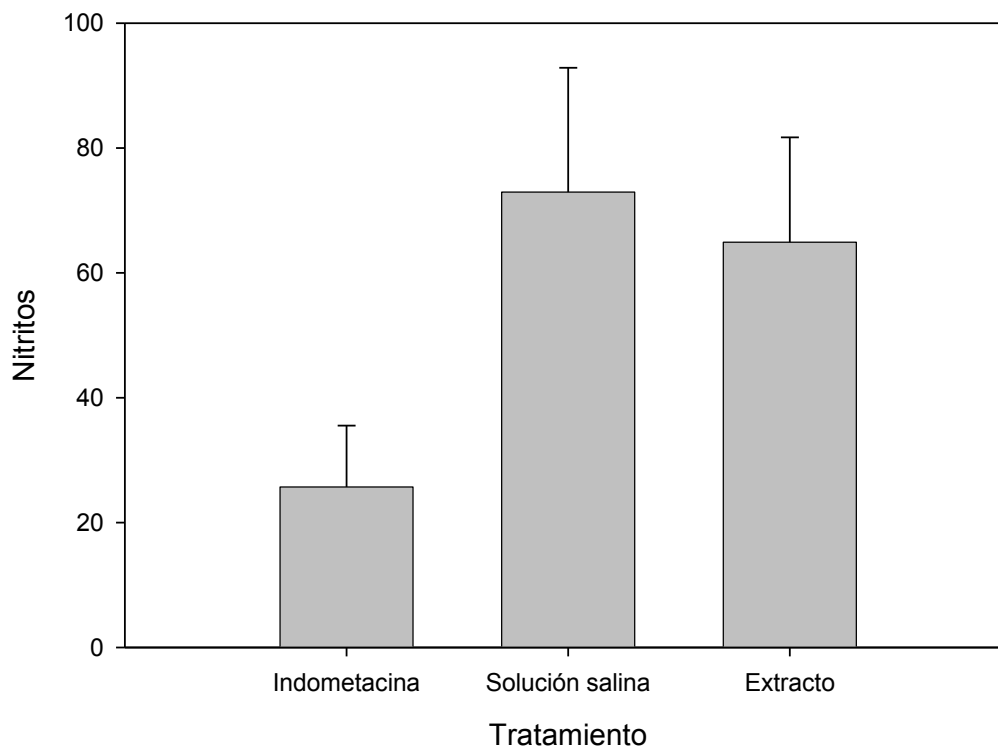
Grafica 3. Medias \pm error estándar. Indometacina vs salina e Hidlgartol B. $P=0.798$ NS (ANOVA).

Resultados Nitritos (NO_2) en macrófagos peritoneales reposo (R) (Cuadro 5 y Gráfica 4)

Tratamiento	Media \pm error estandar	Sig.
Indometacina GI	25.688860 \pm 22.0129942	0.160
Solución salina	72.937317 \pm 48.7672549	0.935
Hidlgartol B	64.885717 \pm 41.1996717	0.270

Cuadro 5: Comparación de medias de las absorbancias con respecto al tratamiento. Indometacina, solución salina, y Extracto $P \leq 0.05$.

Comparación de medias de las concentraciones de nitritos con respecto al tratamiento en macrófagos peritoneales (R).



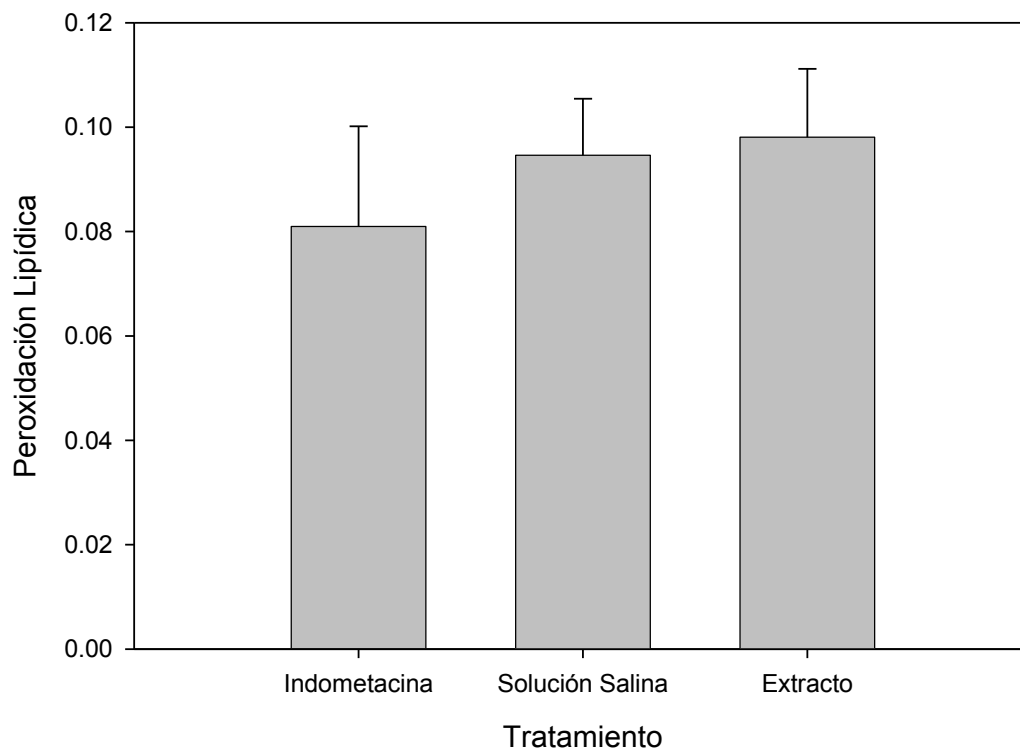
Grafica 4. Medias \pm error estándar. Indometacina GI vs salina e Hidlgartol $P=0.160$ NS (ANOVA).

Resultados de la determinación de peroxidación lipídica (MDA) método de TBA (ácido tiobarbiturico) en suero de ratón previamente tratado con Hildgartol B. (Cuadro 6 y Gráfica 5)

Tratamiento	Media±error estandar	Sig.
Indometacina**	0.080977±0.0470418	0.794
Solución Salina	0.094627±0.0264913	0.985
Hildgartol B	0.098062±0.0320937	0.699

Cuadro 6: Comparación de medias de las absorbancias con respecto al tratamiento. Indometacina, solución salina, e Hildgartol B $P \leq 0.05$.

Comparación de medias de la peroxidación lipídica con respecto al tratamiento.



Gráfica 5. Medias ± error estándar. Indometacina GI vs Solución Salina e Hildgartol B $P=0.794$ NS (ANOVA).

Discusión de resultados

Durante la valoración de la actividad antimicótica de los extractos obtenidos a partir de las plantas *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* se determinó que ningún compuesto presentó actividad antifúngica, a pesar de poseer alguno de estos compuestos probados, grupos fenólicos.

En la determinación de la actividad de reducción del NBT, para conocer el comportamiento de los compuestos en la producción de radicales de oxígeno producidos por los PMN, (Cuadros 1 y 2), a través de un análisis estadístico se compararon las medias de las absorbancias obtenidas para cada compuesto, extracto y fármaco, se encontró que los compuestos Crassifolina A e Hidlgartol B se comportan como la indometacina pura cristal 1, y tienen una actividad de mayor reducción de NBT $p \leq 0.05$ (mayor producción de radicales de oxígeno), está reportado en la literatura que la indometacina induce la generación de radicales libres²⁸. Al comparar Crassifolina A e Hidlgartol B contra la Indometacina GI, éstos compuestos, también presentan una mayor actividad de reducción de NBT en reposo (Grafica 1). El resto de los extractos se comporta de manera similar entre ellos; pero sin ninguna actividad significativa en la reducción de NBT. Se seleccionó Hidlgartol B para determinar la relación entre la reducción de NBT y la liberación de radicales libres (Nitritos y Peroxidación Lipídica)

En la evaluación de la reducción de NBT se encontró que la Indometacina GI presenta una actividad menor en la reducción de NBT (grafica 1) que la Indometacina de laboratorio líder (laboratorio Merck), la Indometacina pura cristal 1 y que el Diclofenaco (Novartis). Esto quizás debido a que en este modelo “In vitro” el fármaco interactúa de manera directa con los PMN mientras que el efecto total de la Indometacina y el Diclofenaco depende de ser metabolizado por el ratón (“In vivo”).

En la determinación de concentración de nitritos en suero de ratón previamente tratado con Hidlgartol B y LPS, se observó que no se presentó efecto significativo bajo ningún tratamiento ($p > 0.05$) (cuadro 3); sin embargo esta reportado que la administración de Indometacina produce un aumento en la concentración de nitritos, esto debido a que los antiinflamatorios AINES estimulan la liberación de oxido nítrico y sus derivados (radicales libres de oxígeno) por eso se observa en la grafica 2 una mayor concentración de nitritos con el tratamiento con Indometacina. El Hidlgartol B presentó una disminución en la grafica pero fue estadísticamente no significativo.

En la determinación de nitritos en liquido peritoneal de ratón previamente tratado con Hidlgartol B y LPS, bajo el análisis estadístico no se observa algún efecto significativo (cuadro 4, $p > 0.05$) en ninguno de los tratamientos en la evaluación de nitritos en los macrófagos peritoneales, sin embargo se confirma que la Indometacina aumenta la producción de radicales libres de oxígeno, ya que en la grafica 3 se observa que con los MA activados hay una elevación en la concentración de nitritos mientras que la gráfica 4 con los MA en reposo se observa su inactividad ya que en los tratados con Indometacina la concentración de nitritos es incluso mas baja que con el tratamiento con solución salina por lo tanto en este modelo la Indometacina no presenta un aumento en la liberación de oxido nitroso. El extracto no presento algún efecto significativo (cuadro 5).

En la determinación de peroxidación lipídica, no se presentó efecto significativo, en ninguno de los tratamientos, ni con el fármaco ni con el Hidlgartol B. (Tabla 6 y Gráfica 5)

Conclusiones.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que los extractos de *Tephrosia madrensis* y *Tephrosia crassifolia* no poseen actividad antifúngica. De todos los extractos evaluados solo dos de los compuestos puros de *Tephrosia crassifolia* presentan actividad en la fagocitosis al incrementar significativamente la reducción de NBT a través de una liberación de especies reactivas de oxígeno ya que no disminuyó la producción y liberación de NO. Por lo tanto el extracto evaluado no posee actividad de disminución de la fagocitosis ni presenta algún efecto en la peroxidación lipídica.

Se necesitan estudios adicionales para conocer las propiedades de extractos obtenidos de diferentes plantas para de esta forma conocer sus componentes químicos principales y sus posibles efectos, creando así un mejor perfil de las plantas utilizadas como parte de la medicina tradicional mexicana.

Anexos

Anexo 1

Plateamiento del cadmio:

- a. En tubos de 13X100 se colocaron 0.5g de cadmio metálico y se agregarán 2mL de sulfato de cobre al 5%, se agito en un Rocker por 10 minutos.
- b. Posteriormente se lavo 3 veces con agua destilada para eliminar el cobre y se le dio un último lavado con ácido clorhídrico 0.1N para remover el hidróxido de cadmio, aproximadamente a 2 volúmenes con el tubo lleno.
- c. Después se lavo el cadmio con cloruro de amonio al 5% pH=9, y se guardo con esta solución hasta su utilización.

Ácido clorhídrico (HCl) 0.1N: Vaciar 40.35mL en 500mL de agua destilada.

Borato de sodio (NaB₂O₇): Pesar 7.6g de Borato de sodio y disolver en 200mL de agua destilada.

Cloruro de amonio (NH₄Cl): Pesar 25g de NH₄Cl en 500mL de agua destilada.

Sulfato de cobre (CuSO₄): Pesar 25g de sulfato de cobre en 500mL de agua destilada.

Sulfato de cinc (ZnSO₄): Se pesan 300g de sulfato de cinc en 1000mL de agua destilada.

Reactivo de Sulfanilamida: Se disolvió 0.5g de sulfanilamida en 150 ml de ácido acético al 15% se etiqueto y se guardo en un frasco de vidrio color ámbar con tapa de plástico, protegido de la luz y en un lugar fresco.

Reactivo de NED: Se disolvió 0.2g de N-(1-naftil)-etilendiaminodichlorhidrato en 150mL de ácido acético al 15% se etiqueto y se guardo en un frasco de vidrio color ámbar con tapa de plástico, protegido de la luz y en un lugar fresco.

Anexo 2

Preparación de soluciones.

Para la reducción de NBT espectrofotométrica

Solución de Krebs-Henseleit. pH 7.4

NaCl (0.154M)	100 mL
KCl (0.154M)	4 mL
CaCl ₂ (0.11M)	3 mL
KH ₂ PO ₄ (0.154M)	1 mL
MgSO ₄ • 7H ₂ O (0.154M)	1 mL
Glucosa	250 mg / 130 mL

Preparar 0.272g de NaHCO₃ en 21 mL de agua destilada, de esta solución agregar 10 mL a la solución de Krebs-Henseleit, los 11 mL restantes, se burbujan con CO₂, por un minuto y se agrega a la solución de Krebs-Henseleit.

Solución amortiguadora de salina fosfato (PBS)

Cloruro de sodio	8.0g
Fosfato de potasio	0.2g
Fosfato de sodio (12 moléculas de H ₂ O)	2.9g
Cloruro de potasio	0.2g
Agua bidestilada (cbp)	1000 mL

Solución de nitro azul de tetrazolium (NBT) al 0.1%.

NBT	30 mg
NaCl	0.255g
Agua destilada (cbp)	30 mL

NBT 0.1%: Pesar 0.01g de nitroazul de tetrazolium y agregar en 10 mL de agua destilada, mezclar y adicionar 0.085g de NaCl

Solución de ácido clorhídrico 2.5 N.

Mezclar ácido clorhídrico 7.6 Ml y adicionarlo 100 mL de agua destilada.

Solución de cianuro de potasio 0.01M.

Cianuro de potasio	0.0650g
Agua destilada (cbp)	100 mL

Solución Salina 0.85%.

Cloruro de sodio	0.85 mL
Agua destilada (cbp)	100 mL

Solución Salina Citratada.

Cloruro de sodio	0.85g
Citrato de sodio	0.4g

Agua destilada (cbp)	100 mL
Solución siliconizada 1%.	
Sigmacote	1 mL
Agua destilada (cbp)	100 mL
Agua destilada (cbp)	100 mL

Solución Alsever

Glucosa	2.05g
Citrato de sodio	0.80g
Acido cítrico	0.055g
NaCl	0.42g
100 mL de H ₂ O	

Determinación de Peroxidación lipídica por el método de TBA (Ácido tiobarbiturico).

Estándar: 1, 1, 3, 3-tetrametoxipropano (TMP)

Solución madre: 1mM / L de TMP (17 µL de TMP en 100 mL de agua bidestilada).

Solución de trabajo: 0.2mM / L (1 mL de TMP 1mM / L y añadir 4 mL de agua bidestilada)

Ácido ortofosfórico 0.2M.

H ₃ PO ₄	1.07 mL
Agua destilada	100 mL

Solución de TBA (ácido tiobarbiturico) al 0.11M / L

TBA	800 mg
NaOH (0.1M)	50 mL

Solución de NaOH (0.1M).

NaOH	200 mg
Agua destilada	50 mL
Solución de n-butanol.	50 mL

Solución de Butiril-hidroxitolueno (BHT) al 12.6mM.

BHT	277 mg
Etanol	100 mL

Solución de Butiril-hidroxitolueno (BHT) al 2mM.

BHT	44 mg
Etanol	100 mL
Solución saturada de NaCl	100 mL
Agua destilada	1L

Anexo 3

Cuadros y gráficas de curvas estándar

Determinación de nitritos.

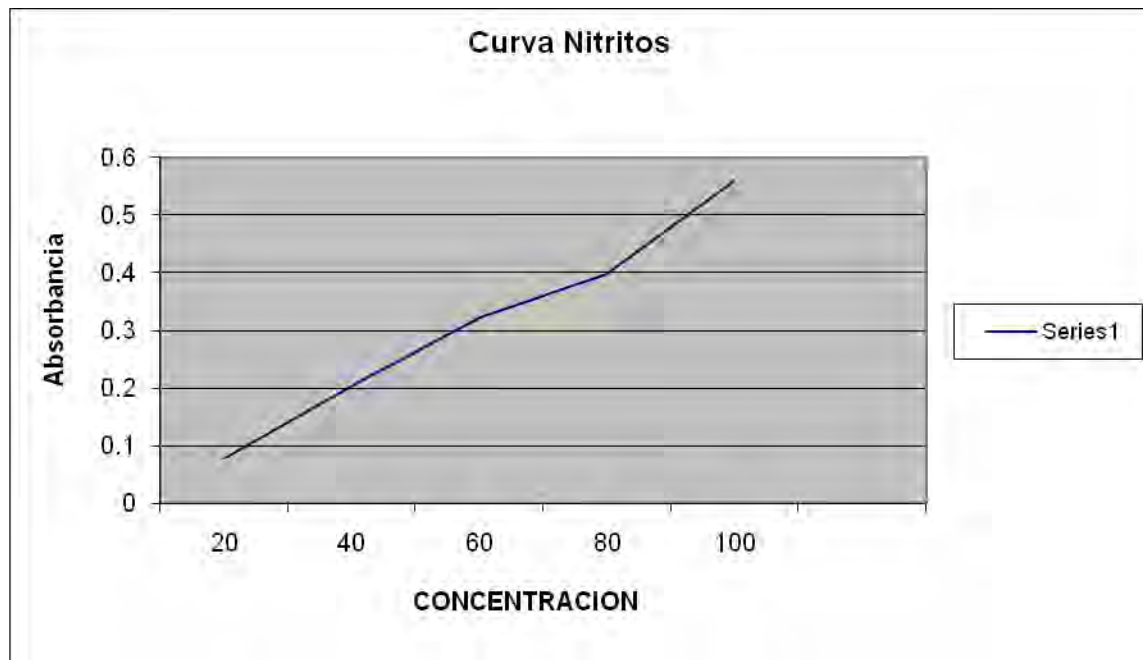
Tubo	Estándar μL	Agua destilada μL
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	400
Muestra	200 μL de sobrenadante	700

Se adicionó 50 μL de sulfanilamida. Se incubó 10 minutos a temperatura ambiente

Se adicionó 50 μL de reactivo de NED, se mezcla y se incuba 30 minutos a temperatura ambiente

Se lee en espectrofotómetro a 540 nm

Cuadro 7. Curva patrón. Concentración del estándar 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Nitrito de sodio y procesamiento de la muestra

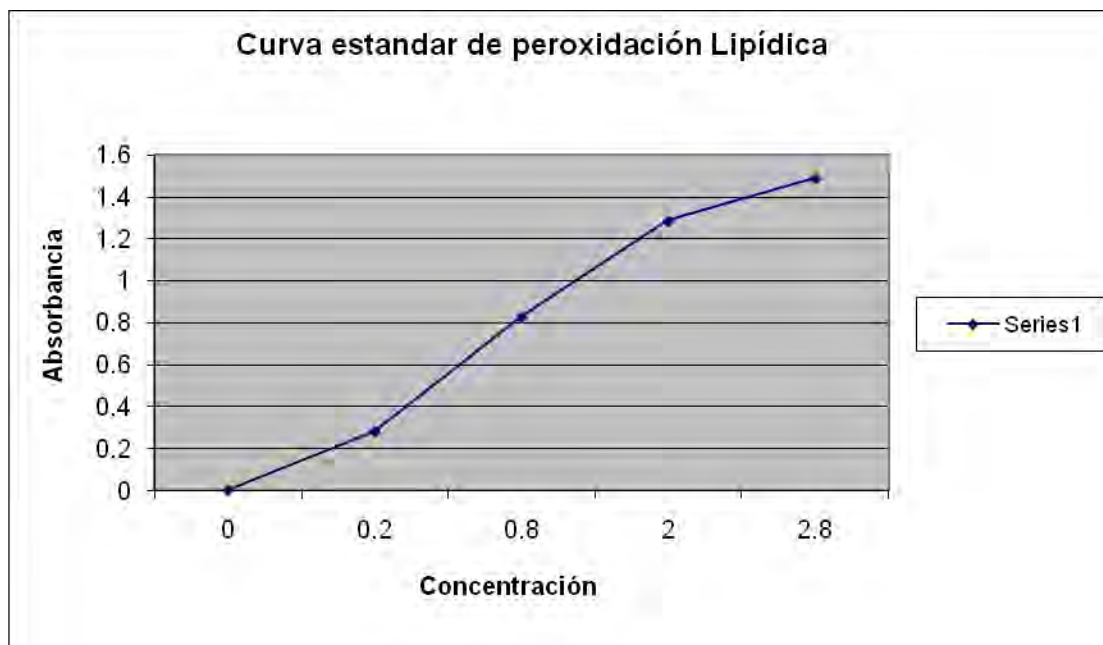


Grafica 6. Curva estándar de nitritos.

Determinación de peroxidación lipídica (MDA) método de TBA (ácido tiobarbiturico)

Tubo	MDA mmol/L	TMP μL	H ₃ PO ₄ 1% μL	TBA μL	H ₂ O μL	Abs 535nm	Abs 572nm	Corrección
B	0	0	600	200	200	---	---	---
1	0.2	5	600	200	195	0.301	0.020	0.281
2	0.4	10	600	200	190	0.498	0.041	0.457
3	0.8	20	600	200	180	0.876	0.049	0.827
4	1.2	30	600	200	170	0.980	0.052	0.928
5	2.0	50	600	200	150	---	---	---
6	2.8	70	600	200	130	1.532	0.043	1.489
7	4.0	100	600	200	100	1.599	0.076	1.523

Cuadro 8. Curva patrón



Grafica 7. Grafica de las concentraciones estándar de MDA para peroxidación lipídica.

Anexo 4.

Obtención de LPS de *Escherichia coli*. Serotipo O 111

Cultivo de *Escherichia coli* serotipo 111.

1. Preparar 200 mL de Agar Soya Trypticaseina (marca BIOXON), y esterilizar a 121° C/ 15 lb/in³ por 15 minutos. Dejar enfriar hasta una temperatura de 45° C y verter cerca del mechero en cajas de Petri y en cuatro botellas de 250 mL Nunclon, (Nunc), las cuales se colocan en forma horizontal hasta que solidifiquen.
2. Sembrar masivamente en cajas Petri con agar Soya Trypticaseina cepas de *E.coli* serotipo O 111 e incubar a 37° C en condiciones aerobias de 24 a 48 horas.
3. Terminado el periodo de incubación a cada caja de Petri sembrada con el cultivo, se agregan 5 mL de solución salina isotónica estéril, resuspendiendo los microorganismos y recolectando al final los 5 mL.
4. En cada botella de 250 mL Nunclon Nunc, verter 1 mL de la solución recolectada del paso tres, cerca del mechero, cuidando que se distribuya en toda la botella e incubar a 37° C, por 48 horas o hasta obtener una capa “gruesa” de microorganismos.

Preparación del antígeno O (LPS).

5. Vaciar 20 mL de solución salina al 0.85% en las botellas Nunclon Nunc y agitar hasta retirar la capa de bacterias del agar.(paso 4)
 6. Realizar otra vez lo mismo pero con 10 mL de solución salina y repetir hasta que el agar se vea transparente o sin indicios de capa de bacterias.
 7. Vaciar el líquido de los lavados en una botella que se calibrara con otra para ser centrifugada a 2094.54 g (6000 rpm) por una hora.
 8. Retirar el sobrenadante y resuspender el botón en 100 mL de solución salina al 0.85 % así hasta completar cinco lavados.
 9. Terminados los lavados resuspender el botón con un poco de solución salina al 0.85%.
 10. Preparar los tubos de la escala de McFarland.
-

11. En un tubo respectivamente etiquetado (*E. coli* O 111) colocar 3 mL de solución salina y colocar gota a gota la suspensión de bacterias hasta igualar al tubo uno del nefelómetro de McFarland.
12. Poner los tubos a ebullición por dos horas, dejar enfriar y colocar en el refrigerador.
13. Utilizar las soluciones anteriores para la inmunización.

Esquema de inmunización

Inmunización de conejo Nueva Zelanda Blanco (NZW) con un peso aproximado de 2,500 g, por vía intravenosa con *E. coli* enterohemorrágica igualado al tubo 1 del nefelómetro de McFarland.

Día	Vol. (mL)
0	0.25
3	0.25
7	0.3
10	0.3
16	Sangrar

Purificación de IgM anti-LPS.

14. Montar una columna de Sephadex G 200, calibrar y sacar la IgM después del volumen vacío.
15. Pasar el suero de conejo anti LPS (IgM) y eluir con amortiguador de fosfato a 0.1M a pH 6.8, tomando fracciones de 3 mL.
16. Realizar la lectura de las fracciones a 280 nm.
17. El primer pico contiene IgM, α -2 macroglobulina y algunas lipoproteínas, los complejos de hemoglobina–haptoglobina a veces están presentes y son detectables fácilmente por un color rojizo.
18. Cuantificar la muestra y ajustar a 5 mg/mL de anticuerpo si es menor concentrar en tubos de Amicon.

Cuantificación de IgM

19. Cuantificar el IgM por el método de Lowry
20. Realizar curva patrón empleando una serie de 10 tubos
21. Colocar 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 hasta 1.0 mL de un estándar (250 μ g/mL ABS) llevar a 1 mL con agua destilada.

22. Agregar a cada tubo 3 mL de Sol C darle 10 minutos de incubación a temperatura ambiente
23. Adicionar 0.1 mL de folin incubar por 30 minutos y leer a 600 nm
24. Realizar diluciones de las fracciones 1:5 en agua destilada
25. Tomar 0.1 mL y agregar 0.9 mL de agua destilada colocar 3 mL de solución C.
26. Incubar 10 minutos y adicionar 0.1 mL de folin esperar por 30 minutos y leer a 600 nm
27. Realizar las lecturas y hacer la interpolación para saber cuanta IgM se tiene

Acoplamiento mediante Glutaraldehido

28. La IgM pura (5 mg/mL) se conjuga a peroxidasa de rábano picante .Disolver 10 mg de peroxidasa de rábano en 0.2 mL de buffer de fosfatos 0.1M pH 6.8 que contiene 1.25 % de glutaraldehído.
29. Se separa el conjugado (eliminar el glutaraldehido) de la enzima libre dializando contra agua destilada o solución salina al 0.85%.
30. Concentrar a 1 mL y adicionar 1 mL de IgM a 5 mg/mL en salina y 0.1 de buffer de bicarbonato de sodio (carbonato de sodio 1M pH 9.5).
31. Agitar suavemente y dejarlo 24 hrs a 4° C y adicionar 0.1 mL de lisina al 0.2 M.
32. Dejarlo 2 hrs a temperatura ambiente y dializarlo contra PBS a 4° C. El conjugado se separa de la peroxidasa libre por diálisis contra agua destilada en el precipitado.
33. Centrifugar y disolver otra vez en PBS el precipitado con 0.01 de timerozal o formalina.

Extracción de LPS puro, a partir de las cepas de *Escherichia coli* siguiendo el método de Galenos (fenol-agua).

34. De la preparación del antígeno O (LPS) con la solución del paso 4 es con la que se va a trabajar.
35. Centrifugar nuevamente a 2094.54 g (6000 rpm) por una hora y retirar el sobrenadante.
36. Resuspender el paquete celular de cada botella en 3 mL de PBS.

37. A cada tubo agregar 5 mL de la mezcla fenol-agua (9:1), agitar y dejar en refrigeración por 24 h.
38. Agitar los tubos e introducirlos en un baño de agua por 90 minutos a 70° C.
39. Dejar enfriar y centrifugar por 30 min a 3000 rpm.
40. Separar la fase acuosa y extraer de nuevo la interfase y la fase fenólica con 3 ml de PBS en el baño de agua a 70 °C por 60 min.
41. Volver a extraer la interfase y la fase fenólica en las mismas condiciones durante 30 min.
42. Reunir los extractos acuosos y filtrarlos con una membrana estéril.

Purificación de LPS.

43. Dializar los extractos acuosos en una membrana de celulosa por 3 días con cambios de PBS cada 24 hrs.
44. Cuantificar el LPS por el método de fenol ácido sulfúrico
45. Realizar curva patrón empleando una serie de 10 tubos
46. Colocar 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 hasta 1.0 mL de un estándar (0.1 mg/mL) llevar a 2 mL con agua destilada.
47. Llenar con 2 mL de agua destilada el tubo del blanco
48. Agregar a cada tubo 0.1 mL de fenol al 80% y 5mL de ácido sulfúrico concentrado.
49. Realizar diluciones de LPS 1:10, 1: 50 y 1:100 en agua destilada.
50. Tomar 2 mL de cada dilución y agregar 0.1 mL de fenol al 80 % y 5mL de ácido sulfúrico concentrado.
51. Dejar reposar los tubos de 20 a 30 min. y leer a 490 nm.

Bibliografía

1. Artuso A, Drugs of natural origin, Economic and Policy aspects of discovery development and marketing, New York: The Pharmaceutical Products Press, 1997 1-2
 2. Vólac JS, Plantas Medicinales, España 1997, 6° edición, pp: 6
 3. Kumate J, La medicina herbolaria contemporánea, La investigación científica de la herbolaria medicinal mexicana, México Secretaria de Salud 1993: 11 y 12.
 4. Martínez M. Las plantas medicinales de México, 6° edición, Editorial Botas, México 1967: 493
 5. Garibay-Gómez F, Plantas mexicanas: genero *Tephrosia*, Instituto de Química, México 2001:7-35
 6. Martínez Flórez S. González Gallego J. et al. Los Flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes, Departamento de Fisiología, Universidad de León y Hospital de León. España. Nutr. Hosp. 2002, 17: 271-278
 7. Jeffrey B. Harborne, Christine A. Williams, Review Advances in Favonoid research since 1992, Phytochemistry 55 (2000) 481-504.
 8. Flavia Carla Meotti, Fabiana Cristina Missau, Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice, Biochemical pharmacology (2006); 72; 1707–1713.
 9. Zeng Yueqin, Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias, Departamento de farmacología, Universidad de Valencia, Servei de Publicacions; (2007): 29-34.
 10. Alexander M. Introducción a la microbiología del suelo, AGT editor , México 1980: 63-80
 11. Koneman E.W. Diagnostico Microbiológico, Editorial Medica panamericana, 5° edición, Argentina Buenos Aires 1999: 955-979
 12. Arenas R. Micología Médica, Editorial McGraw-Hill Interamericana, 1° edición, México 1993:3
 13. Frazier W.C. Microbiología de los alimentos, Editorial Acribia, 4° edición, Zaragoza España 1993:583-588
-

14. Tovar JC. Microbiología General, Editorial Limusa, 1° edición, México DF 1987: 38, 39.
15. Prescott L. Microbiología, Editorial McGraw-Hill Interamericana, 4° edición, España 1999: 844 y 949
16. Jay J.M. Microbiología moderna de los alimentos, Editorial Acribia, 4° edición España Zaragoza 1992: 30-34
17. Mossel D.A.A. Microbiología de los alimentos. Fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la inocuidad y la calidad de los alimentos, Editorial Acribia, 1° edición, España Zaragoza 1982: 31-33
18. Ortega N C, Pérez G, et al, Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link, Revista mexicana de ciencias farmacéuticas 2005: 21-26
19. Pietro Buzzini, Stefano Menichetti, Antimycotic activity of 4-thioisosteres of flavonoids towards yeast and yeast-like microorganisms, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 18 (2008) 3731–3733.
20. Laurence L.B. Goodman & Gilman: Las bases farmacológicas de la Terapéutica. Editorial McGraw-Hill 11° edición, México 2007: 1225-1240
21. Cowan MM, Plant products as antimicrobial agents, Clinical microbiology Reviews 1999, 12(4): 564-582
22. Manual de práctica para el laboratorio de análisis bioquímico clínico I, Manual de Hematología. FES Zaragoza UNAM 2000; 49-55.
23. Marroquín R, Flores M. Manual de laboratorio de inmunología básica y clínica. México Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.; 2002: 23-25, 48-49.
24. Stites PD, Terr IA. Inmunología humana y básica. Editorial manual moderno. México 1994.
25. Abba IT. Inmunología básica y clínica. Novena edición. El manual moderno, México 1998.
26. Abul KA, Andrew HL. Inmunología celular y molecular. Segunda edición. Editorial Interamericana. Madrid España 1995.

27. Donald WM, Stewart J. Inmunología. Segunda edición. Manual moderno 1995.
28. Ahmed e., Mina T. In vitro effects of aqueous seeds extract of *Acacia cyanophylla* on the opsonized zymosan-induced superoxide anions production by rat polymorphonuclear leukocytes. Pub Med. 2004; 5: 35-36.
29. Piemonte MM, Zampronio AR, et al, Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenantherio culubrina* (angico blanco) Immunology Letters 93, (2004): 189-197.
30. Benecia F, Coulombié FC, et al, *Trichilia glabra*: Effect on the phagocytic activity and respiratory burst response of peritoneal macrophages, Immunopharmacology 41 (1999): 45-53.
31. Monica Comalada, Isabel Ballester Elvira Bailon, Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship, Biochemical pharmacology 72 (2006) 1010–1021.
32. Reyes LE. Valoración de la actividad antiinflamatoria y antimicótica de un extracto acuoso de *Helietta parvifolia* (Barreta). [Tesis]. México FES Zaragoza. UNAM. 2008; 3-24, 53-54
33. Filomena Conforti, Silvio Sosa, Mariangela Marrelli, In vivo anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants, Journal of ethnopharmacology 116 (2008) 144–15.
34. Jong Soon Kang, Yeo Dae Yoon, Mi Hwa Han, Sang-Bae Han, Kiho Lee, Song-Kyu Park, Hwan Mook Kim, Equol inhibits nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase gene expression through down-regulating the activation of Akt, International Immunopharmacology 7 (2007) 491–499.
35. Yen-Chou Chen, Shing-Chuan Shen, Inhibition of Nitric Oxide synthase Inhibitors and Lipopolysaccharide Induced Inducible NOS and Cyclooxygenase-2 Gene Expressions by Rutin, Quercetin, and Quercetin Pentaacetate in RAW 264.7 Macrophages, Journal of Cellular Biochemistry (2001) 82:537-548

36. T. Komutarin, S. Azadi, Extract of the seed coat of *Tamarindus indica* inhibits nitric oxide production by murine macrophages in vitro and in vivo, *Food and Chemical Toxicology* 42 (2004) 649–658.
37. Goldsby Richard, et al, *Inmunología*, 5ta edición, McGraw-Hill, México 2004: 357-359
38. Parslow Tristan G, et al, *Inmunología básica y clínica*, 10 ed., El manual Moderno, México 2002: 29-44, 215-230, 879-883
39. M. R. Moreno Brea y J. A. Micó, Inhibidores de la COX-2: Mecanismo de acción, *Revista Sedolor*, Reunión Científica de la Sociedad Española del Dolor, España, 2000:3-6
40. Marjoribanks J. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for primary dysmenorrhoea (Cochrane Review). In: the Cochrane Library, Issue 4, 2003
41. Boyce, Eric G., Takiya, Liza. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Review of factors guiding formulary selection 2004 Jun 1; 125 (11): 25-30.
42. Rivera-Ordóñez Arizbe, AINEs: Su mecanismo de acción en el Sistema Nervioso Central, *Revista Mexicana de Anestesiología* 2006; 29, 36-40.
43. Baehner RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N. Engl J Med.* 1968; 287: 971.
44. Yukiko U, Hiromasa N, Mizue M, Kazuo T, Motoo S, Haruhisa U, Crystal Structure of a 2:1 Complex of Indomethacin and Lidocaine, *ANALYTICAL SCIENCES VOL. 23 (2007),: 15-16*
45. Tetsuya Hori, Jun Ishijima, Takehiko Yokomizo, Hideo Ago, Takao Shimizu, Masashi Miyano, Crystal Structure of Anti-Configuration of Indomethacin and Leukotriene B₄ 12-Hydroxydehydrogenase/15-Oxo-Prostaglandin 13-Reductase Complex Reveals the Structural Basis of Broad Spectrum Indomethacin Efficacy, *J. Biochem.* (2006) 140, 457–466.
46. Rodríguez RC, *Vademécum académico de medicamentos*, 4ta edición McGraw-Hill México Df 2005: 234-414.
47. Paula A. Belinky, Michael Aviram, The antioxidative effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation, *Atherosclerosis* 137 (1998) 49–6

48. Hua Wang, Xiang Dong Gao, Gao Chao Zhou, In vitro and in vivo antioxidant activity of aqueous extract from *Choerospondias axillaris* fruit, *Food Chemistry* 106 (2008) 888–895
49. Alessandra Braca, Gelsomina Fico Antioxidant and free radical scavenging activity of flavonol glycosides from different *Aconitum* species, *Journal of ethnopharmacology* 86 (2003) 63–67
50. Michael Aviram, Flavonoids-rich nutrients with potent antioxidant activity prevent atherosclerosis development: the licorice example, *International Congress Series* 1262 (2004) 320–327
51. Yasukazu Yoshida, Yoshiro Saito, Mieko Hayakawa, Levels of Lipid Peroxidation in Human Plasma and Erythrocytes: Comparison between Fatty Acids and Cholesterol, *Lipids* (2007) 42:439–449.
52. Kumiko Ishige, David Schubret, Yutaka S, Flavonoids protect Neuronal Cells from oxidative stress by three distinct mechanisms, *Free Radical Biology & Medicine*, (2001) Vol. 30, No. 4: 433–446