



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

Valoración de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Loeselia mexicana* (Lam.) Brandegees "Espinosa", y evaluación de algunos mediadores de la inflamación.

## **TESIS**

Para obtener el título de:

**Química Farmacéutica Biológica**

P R E S E N T A:

**Alvarado Zúñiga Alberto Enrique.**

Director: **Dr. Rubén Marroquín Segura**

Asesor: **M. C. Maurilio Flores Pimentel**



MÉXICO, D.F. 2013



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.

## DEDICATORIA

*Dedico esta tesis a mi esposa Sue Moguel, quien me ha brindado su amor, su cariño, su estímulo y su comprensión a lo largo de todos estos días, además siempre me ofrece su ánimo y ha sido paciente en la espera de ver concluida una meta más en nuestra vida.*

*Te dedico esta tesis no solo como una meta mía, sino como un logro que hemos alcanzado juntos.*

*A mis padres Alberto Alvarado e Irma Zúñiga que han sido los pilares fundamentales en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica, como en la vida, y por el incondicional apoyo que me han brindado a través de toda mi vida.*

*A mi hija Stephanie Naomi, porque tú sin saberlo le diste sentido a mi vida, y gracias a tí me he esforzado aún más para ser un buen ejemplo en tu vida.*

*A mi hija Aytana por ser una luz más en mi vida y dueña de tantas de mis alegrías.*

*A mi hermana Claudia Alvarado porque sé que siempre ha estado ahí y me brinda apoyo y cariño.*

*También dedico esta tesis a mis abuelos, que fueron en gran medida los que me formaron en mis comienzos, ellos fueron los que alimentaron mis ganas de saber y me enseñaron a nunca darme por vencido, a mis tíos, primos y en general a toda mi familia ya que siempre han estado a mi lado, sé que puedo contar con todos ustedes y por consiguiente este trabajo es tan suyo como mío.*

## *Agradecimientos.*

*Te agradezco a tí Sue, ya que me has tenido paciencia y has soportado todo lo que ha costado esta meta, sin mencionar los sacrificios enormes que has hecho por mí, no habrá en toda mi vida la manera de pagar el apoyo que me has brindado, tu mano siempre ha estado ahí para guiarme cuando el camino era tan incierto. Gracias por ser mi fortaleza para nunca darme por vencido.*

*Le doy las gracias a mis padres que siempre confiaron en mí y me han apoyaron en cada uno de los caminos que ha tomado mi vida, y sepan sin duda alguna que sin su apoyo incondicional jamás hubiera culminado este sueño, su ejemplo ha guiado cada uno de mis pasos.*

*Agradezco también a mis hijas que directamente se han visto afectadas en este camino, han pasado malos ratos en mis días difíciles y les he dedicado poco tiempo, y aun así siempre han estado a mi lado con una gran sonrisa.*

*Les agradezco a todos los que han rodeado mi vida y la de mi familia porque de un modo o de otro siempre nos han apoyado.*

*A mi director de tesis Dr. Rubén Marroquín Segura, por dejarme ser parte de ese gran equipo de trabajo que tiene conformado, así como confiarme un proyecto y orientarme para desarrollarlo.*

*A mi asesor de tesis M. C. Maurilio Flores Pimentel por apoyarme en este trabajo y por alentarme a terminar esta tesis.*

*A mi revisor de tesis Dr. Benito Reyes Trejo por brindarme sus conocimientos, y exigir de mí siempre algo mejor.*

*A mis sinodales Mtra. Yolanda Flores Cabrera y M. en C. Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara, por haberme otorgado un poco de su tan valioso tiempo invertido en la revisión de esta tesis.*

*Para empezar un gran proyecto, hace falta valentía.  
Para terminar un gran proyecto, hace falta  
perseverancia.*

**Anónimo.**

# CONTENIDO

1. Marco teórico.....	1
1.1 Inflamación.....	1
1.2 Sustancias que contribuyen a la inflamación.....	1
1.3 Células que influyen en la inflamación.....	3
2. Inflamación crónica.....	6
2.1 Características de la inflamación crónica.....	6
2.2 Infiltración por mononucleares.....	7
2.3 Evolución de la inflamación.....	9
2.4 Tipos de inflamación crónica.....	10
2.5 Inflamación crónica granulomatosa.....	11
2.6 Efectos sistémicos de la inflamación.....	12
3. Inflamación aguda.....	14
3.1 Estímulos de la inflamación aguda.....	16
3.2 Evolución de la inflamación aguda.....	18
4. Técnicas evaluadas.....	18
4.1 Ceruloplasmina.....	19
4.1.1 Reacción Inflamatoria Sistémica (RISS).....	19
4.1.2 Respuesta de fase aguda.....	20
4.1.3 Inmunodifusión radial o técnica de Mancini.....	21
4.1.4 Reacción antígeno-anticuerpo.....	21
4.1.5 Reacción de precipitación.....	21
4.2 Óxido Nítrico (NO).....	22
4.2.1 Reacción de Griess.....	22
4.3 Peroxidación lipídica.....	23
4.3.1 Estrés oxidativo.....	23
4.3.2 Especies reactivas del oxígeno (ERO).....	24
4.3.3 Peroxidación lipídica.....	25
4.3.4 Lesiones producidas por especies reactivas de oxígeno.....	25
5. Agentes antiinflamatorios.....	26
5.1 Antiinflamatorios no esteroideos.....	26
5.2 Antiinflamatorios esteroideos.....	28
6. Plantas medicinales antiinflamatorias.....	30
6.1 Descripción de la planta de espinosilla <i>Loeselia mexicana</i> (Lam.) Brandegees....	31
6.2 Estudios relacionados con la espinosilla <i>Loeselia mexicana</i> (Lam.) Brandegees....	33
7. Planteamiento del problema.....	35
8. Objetivo general.....	35

8.1 Objetivos específicos.....	35
9. Hipótesis.....	36
10. Diseño experimental.....	36
11. Variables.....	36
11.1 Variable independiente.....	36
11.2 Variable dependiente.....	36
12. Materiales.....	37
12.1 Material biológico.....	37
12.2 Material vegetal.....	37
12.3 Reactivos utilizados.....	37
12.4 Material.....	37
12.5 Equipos.....	38
12.6 Instrumentos de medición.....	38
13. Métodos.....	38
13.1. Ensayo de la inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón pellet.....	39
13.2. Ensayo de la inflamación aguda inducido con Carragenina en el cojinete plantar de la pata del ratón.....	39
13.3 Ceruloplasmina.....	40
13.4 Análisis de nitritos.....	41
13.5 Peroxidación lipídica.....	43
14. Diseño estadístico.....	44
15. Diagrama de flujo.....	45
16. Resultados.....	46
16.1 Respuesta de la inflamación aguda.....	46
16.2 Respuesta de la inflamación crónica.....	47
16.2.1 Índice esplénico.....	49
16.2.2 Modelo de granuloma inducido por algodón pellet. (Peso seco).....	51
16.2.3 Ceruloplasmina.....	55
16.2.4 Peroxidación lipídica.....	57
17. Análisis de resultados.....	60
17.1 Inflamación aguda.....	60
17.2 Inflamación crónica.....	60
18. Conclusiones.....	61
19. Referencias.....	62
20. Anexos.....	65

# 1. Marco teórico

## 1.1 Inflamación

Las células que resultan dañadas por microbios o agentes físicos o químicos inician una respuesta defensiva llamada inflamación (*respuesta localizada protectora a lesiones de los tejidos; consiste en destruir, diluir o aislar el agente infeccioso o el tejido lesionado; se caracteriza por enrojecimiento, dolor, calor, y a veces pérdida de la función*). Los cuatro signos y síntomas característicos de este fenómeno son enrojecimiento, calor e hinchazón. Además, la inflamación puede causar pérdida de la función del área lesionada, lo cual depende del sitio y la magnitud de la lesión. En el sitio de inflamación se atrapan microbios, toxinas y otros materiales extraños al sitio de la lesión y prepara a éste para la reparación tisular. Es un fenómeno que ayuda a restaurar la homeostasis tisular, la inflamación es uno de los mecanismos de defensa inespecíficos, de modo que la respuesta de un tejido a una cortadura es similar a la que ocurre con quemaduras, exposición a radiaciones o invasiones bacterianas o virales. En todos esos casos, dicho fenómeno comprende tres etapas básicas: 1) vasodilatación y aumento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos; 2) migración de fagocitos, y por último, 3) la reparación tisular. Inmediatamente después de ocurrido el daño tisular, los vasos sanguíneos del área se dilatan y se vuelven más permeables. La vasodilatación o aumento del diámetro vascular permite que fluya más sangre por el área lesionada, mientras que la permeabilidad incrementada posibilita que salgan más fácilmente de los vasos sanguíneos compuestos y otros elementos que normalmente permanecen en ellos, como anticuerpos, proteínas de la coagulación y fagocitos. El flujo sanguíneo incrementado también ayuda a extraer de la zona productos tóxicos que liberan los microbios invasores y las células muertas.

## 1.2 Sustancias que contribuyen a la inflamación

Entre las sustancias que contribuyen a la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad y otros aspectos de la respuesta inflamatoria, se cuentan las siguientes:

- *Histamina*. En respuesta a la lesión, las células cebadas del tejido conectivo y los basófilos y plaquetas sanguíneas liberan histamina. Los neutrófilos y macrófagos atraídos al sitio de la lesión también estimulan su liberación, lo cual produce vasodilatación y mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos.



- *Cininas*. Estos polipéptidos formados en la sangre a partir de precursores inactivos llamados *cininógenos*, inducen vasodilatación y aumento de la permeabilidad, además de servir como agentes quimiotácticos que atraen a fagocitos.
- *Prostaglandinas (PG)*. Estos lípidos, en especial las prostaglandinas E, son sustancias que liberan las células dañadas e intensifican los efectos de la histamina y las cininas. Las PG también inducen la migración de fagocitos a través de la pared de los capilares.
- *Leucotrienos (LT)*. Producidos en los basófilos y las células cebadas por desdoblamiento de fosfolípidos de la membrana plasmática, los LT incrementan la permeabilidad vascular, además de participar en la adhesión de los fagocitos y como agentes quimiotácticos de los fagocitos mismos.
- *Sistema del complemento*. Los diversos componentes de este sistema estimulan la liberación de histamina, atraen a neutrófilos por quimiotaxia y promueven la fagocitosis, además de que en algunos casos pueden destruir bacterias.

En los minutos que siguen a la lesión, la dilatación de las arteriolas y la mayor permeabilidad de los capilares producen calor, enrojecimiento y edema (hinchazón) del área afectada, el gran volumen de sangre que fluye por la zona afectada genera calor y enrojecimiento (eritema). Al aumentar levemente la temperatura local, las reacciones metabólicas ocurren con rapidez y se libera más calor, el edema resulta de mayor permeabilidad de los vasos sanguíneos, la cual permite que pase más líquido de la sangre a los espacios intersticiales. El dolor, ya sea inmediato o tardío, es síntoma cardinal de la inflamación y es resultado del daño a fibras nerviosas o de irritación que causan sustancias tóxicas provenientes de microbios, las cininas afectan ciertas terminales nerviosas y producen gran parte del dolor relacionado con la inflamación, mientras que las prostaglandinas lo intensifican y prolongan, el dolor también puede deberse al aumento de la presión local derivado del edema. La permeabilidad incrementada de los capilares permite el paso de factores de la coagulación a los tejidos, esto activa la cascada de coagulación y el fibrinógeno se convierte en una red espesa e insoluble de filamentos de fibrina, que localiza y atrapa los microbios invasores y bloquea su diseminación.

En la hora siguiente al inicio del fenómeno inflamatorio, aparecen en escena los fagocitos, primero neutrófilos y luego monocitos. Salen al torrente sanguíneo en el sitio de la inflamación por el proceso de migración (*Proceso por el que los leucocitos salen del torrente sanguíneo, para lo que desacelera su avance, ruedan a lo largo del endotelio y pasan forzosamente entre las células endoteliales. Las moléculas adhesivas ayudan a los leucocitos a fijarse al endotelio también se llama emigración o extravasación*). La migración de los neutrófilos depende de la

quimiotaxia que ejercen sobre ellos microbios, cininas, componentes del complemento y otros neutrófilos que intentan destruir los microorganismos invasores mediante la fagocitosis. El flujo constante de neutrófilos es posible gracias a la producción y liberación de neutrófilos adicionales por la médula ósea roja. Este incremento del número de leucocitos en la sangre se denomina leucocitosis.

Aunque los neutrófilos predominan en la fase inicial de una inflamación, mueren rápidamente. Horas después, al continuar la respuesta inflamatoria, los monocitos siguen a los neutrófilos en el área afectada, una vez en ella, los monocitos se transforman en macrófagos errantes, que intensifican la actividad fagocítica de los macrófagos fijos. Estos últimos son más poderosos que los neutrófilos como fagocitos y engullen restos de tejido dañado, neutrófilos muertos y microbios invasores. Tarde o temprano, los macrófagos también mueren. En cuestión de días, se forma un cúmulo de fagocitos muertos y restos de tejido dañado; este conjunto de células muertas y líquido se denomina pus, cuya formación ocurre en muchas respuestas inflamatorias y suele continuar hasta que cede la infección. En ocasiones, el pus llega hasta la superficie corporal o drena en cavidad interna y se dispersa, mientras que en otras persiste incluso después de que desaparece la infección. De ser así se destruye gradualmente a lo largo de varios días y se absorbe.<sup>1</sup>

### **1.3 Células que influyen en la inflamación.**

Cualquier célula que participa en las reacciones inflamatorias se puede llamar célula inflamatoria. Algunas residen por periodos prolongados en tejidos normales; otras son células circulantes que penetran a los tejidos sólo durante el transcurso de una respuesta inflamatoria. Existen diversas clases de células inflamatorias, los neutrófilos, macrófagos y linfocitos, son las principales células efectoras de la mayor parte de las reacciones inflamatorias o inmunitarias agudas, aunque también pueden actuar otros tipos de células inflamatorias. La mayor parte de estas células expresa receptores superficiales para componentes del complemento, para las porciones fracción constante (Fc) de las moléculas de anticuerpos y para varias citocinas, como resultado, sus actividades tienden a ser controladas de manera directa o indirecta por las respuestas inmunitarias en desarrollo o por activación de la cascada del complemento.

- *Neutrófilos polimorfonucleares (PMN)*: Son las primeras células en llegar al foco inflamatorio, su citoplasma es rico en gránulos lisosomales, los cuales contienen enzimas del tipo de la fosfatasa alcalina, proteasas, ADNasa, etc.; participan en la fagocitosis y en la eliminación de tejidos destruidos.

- *Macrófagos:* Los macrófagos son del tipo celular dominante en la inflamación crónica, estos son unos de los componentes del sistema fagocítico mononuclear, también denominado sistema retículo-endotelial, que está formado por células originadas en la médula ósea. Los macrófagos son células residentes en los tejidos, que se originan a partir de los monocitos del plasma. Sin embargo, mientras que los monocitos tienen una vida media corta (1 día), los macrófagos tisulares sobreviven durante meses o años. Según el tejido en el que se encuentran, los macrófagos tisulares reciben nombres diferentes: por ejemplo, los histiocitos del tejido conjuntivo, las células de Kupffer del hígado, las células de Langerhans de la epidermis, los osteoclastos del tejido óseo, la microglía del Sistema Nervioso Central (SNC) o los macrófagos alveolares del pulmón.

Los productos de los macrófagos activados eliminan microbios e inician el proceso de reparación tisular, y son los responsables de la mayor parte de los daños tisulares en la inflamación crónica. Entre estos productos, podemos destacar las especies reactivas del oxígeno (ERO) y del nitrógeno, así como las enzimas lisosomales, citoquinas, factores de crecimiento y otros mediadores de la inflamación. Algunos de estos productos, como los radicales libres, son tóxicos y destruyen tanto los microbios como los tejidos; otros atraen otros tipos celulares o inducen la producción de colágeno por parte de los fibroblastos o la angiogénesis.

- *Linfocitos:* Los linfocitos son células que se movilizan en la respuesta específica del sistema inmune, activándose con el objetivo de producir anticuerpos y células capaces de identificar y destruir el microbio patógeno. Los macrófagos segregan citoquinas sobre todo el Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y la Interleucina-1 (IL-1) y quimioquinas capaces de reclutar leucocitos a partir de la sangre y movilizarlos hacia la zona afectada. Las interacciones entre linfocitos y macrófagos son bidireccionales, ya que los macrófagos reclutan y activan linfocitos, y estos a su vez segregan citoquinas (sobre todo Interferón-gamma IFN- $\gamma$ ) con una potente capacidad de activar macrófagos. De manera que una vez que los linfocitos entran en acción, la inflamación tiende a agravarse, convirtiéndose en crónica y severa.

El siguiente grupo de células inflamatorias presentan receptores superficiales y son controladas por las respuestas inmunitarias.

- *Células plasmáticas:* Son de mayor tamaño que los linfocitos, tienen unos citoplasmas basófilos, y el núcleo en forma de grumos densos cercanos a la

membrana nuclear, liberan inmunoglobulinas. En el foco inflamatorio, estas células presentan multinucleación, acumulación intracitoplasmática de inmunoglobulinas cristalizadas estas aparecen en la fase tardía de la inflamación.

- *Eosinófilos*: Son granulocitos derivados de la médula ósea que comparten un progenitor común con los basófilos, su significado clínico procede de su fuerte asociación con reacciones alérgicas o con infestaciones por parásitos helmintos. En la sangre o en el tejido se pueden reconocer por su núcleo bilobulado y por sus gránulos característicos en el citoplasma, son un poco más grandes que los neutrófilos, pero contienen una cantidad menor de gránulos; Los componentes principales de sus gránulos son la peroxidasa de eosinófilo (es bioquímicamente diferente a la mieloperoxidasa de los basófilos aunque desarrolla la misma función), la proteína de Charcot-Leyden y otras tres proteínas básicas abundantes.
- *Células cebadas*: Son células residentes en los tejidos, son esenciales para las reacciones inflamatorias mediadas por Inmunoglobulina-E (IgE), estos son grandes y tienen una forma heterogénea redondeada u oval. Poseen un único núcleo redondo u oval situado en posición excéntrica. Sus gránulos contienen cantidades más o menos grandes de histamina, heparina, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) y otros mediadores inflamatorios, también poseen superóxido dismutasa, peroxidasa y múltiples hidrolasas ácidas ( $\beta$ -glucoronidasa, arilsulfatasa).
- *Basófilos*: Tienen muchas de las propiedades de las células cebadas tisulares, son las células más pequeñas de la serie de granulocitos. Como las células cebadas, los basófilos tienen receptores Fc de gran afinidad para IgE y contienen gránulos citoplasmáticos ricos en histamina, estos 2 atributos distinguen a las células cebadas y basófilos de otros tipos celulares humanos.

Cantidades pequeñas a moderadas de basófilos se acumulan en tejidos en diversos padecimientos inflamatorios que afectan piel (como en respuestas alérgicas cutáneas de fase tardía, reacciones de hipersensibilidad de basófilos cutáneos), intestino delgado, riñón, mucosa nasal y ojos. Cabe mencionar que los basófilos únicamente participan en la fase tardía de las reacciones alérgicas relacionadas con IgE en los tejidos. <sup>2</sup>

## 2. Inflamación crónica

### 2.1 Características de la inflamación crónica

La inflamación crónica cuenta con ciertas características generales.

Esta es una inflamación de duración prolongada (semanas, meses o años) en el que la inflamación activa, la lesión hística y la resolución ocurren simultáneamente. A diferencia de la inflamación aguda, que se distingue por cambios vasculares, edema y, sobre todo, infiltración por neutrófilos, la inflamación crónica muestra las características siguientes:

1. *Infiltración por células mononucleares*, tales como los macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
2. *Destrucción hística*, provocada en gran medida por las células inflamatorias.
3. *Reparación*, que implica la proliferación de nuevos vasos (angiogénesis) y fibrosis.

Aunque los agentes nocivos que median la inflamación crónica quizá sean menos dañinos que los que causan la inflamación aguda, la imposibilidad global de resolver el proceso puede dar lugar a una lesión notablemente más prolongada. La fibrosis, en concreto la proliferación de fibroblasto y la acumulación de un exceso de matriz extracelular, también es una característica habitual de muchas enfermedades inflamatorias crónicas y una causa importante de disfunción orgánica. La inflamación crónica puede aparecer en las siguientes circunstancias:

- *Infecciones víricas*. las infecciones intracelulares de cualquier tipo requieren de la presencia de linfocitos y macrófagos para identificar y eliminar las células infectadas.
- *Infecciones microbianas persistentes*, debidas a un conjunto de microorganismos del que forman parte las micobacterias (bacilo tuberculoso), *Treponema pallidum* y ciertos hongos.
- *Exposición prolongada a agentes potencialmente tóxicos, exógenos o endógenos*. Un ejemplo de exógeno son las partículas de sílice que inhalado durante periodos largos genera una neumopatía inflamatoria llamada silicosis.
- *Enfermedades autoinmunitarias*, en las que la persona presenta una respuesta inmunitaria a autoantígenos y tejidos propios (artritis reumatoide o lupus eritematoso).<sup>34</sup>

## 2.2 Infiltración por mononucleares.

El macrófago es la célula predominante de la inflamación crónica. Los macrófagos son sólo uno de los componentes del sistema mononuclear fagocítico. El sistema mononuclear fagocítico está constituido por células procedentes de la médula ósea, todos ellos se originan a partir de un precursor común situado en la médula ósea. Desde la sangre, los monocitos migran a diferentes tejidos y se transforman en macrófagos. La transformación desde las células precursoras de la médula ósea hasta los macrófagos tisulares está regulada por diversos factores de crecimiento y diferenciación como son; citocinas, moléculas de adhesión e interacciones celulares.

La extravasación de los monocitos está controlada por las moléculas de adhesión y los mediadores químicos con propiedades quimiotácticas y de activación, cuando el monocito alcanza el tejido extravascular, se transforma en una célula fagocitaria de mayor tamaño, el macrófago. Además de la función de fagocitosis, los macrófagos pueden ser activados, un proceso que hace que aumente de tamaño, que se incrementen sus niveles de enzimas lisosomales, que su metabolismo sea más activo y que se incremente su capacidad para fagocitar y destruir los microorganismos que ingiere. Entre las señales de activación se incluyen las citocinas, las endotoxinas bacterianas, otros mediadores químicos y proteínas de la matriz extracelular, como la fibronectina. Tras su activación, los macrófagos secretan una amplia variedad de productos biológicamente activos que, cuando no están contrarrestados, son mediadores importantes en la destrucción tisular, en la proliferación vascular y en la fibrosis.

En la inflamación crónica, persiste la acumulación de macrófagos, mediada por:

1. Reclutamiento continuo de monocitos procedentes de la circulación, lo que se debe a la expresión sostenida de las moléculas de adhesión y de los factores quimiotácticos.
2. Proliferación local de macrófagos tras su migración desde el torrente sanguíneo.
3. Inmovilización de los macrófagos en la zona de la inflamación.<sup>36</sup>

Los macrófagos cumplen una función importante en la inflamación. En ciertas enfermedades pueden formar asociaciones densas (“células epitelioides”). Alrededor de un cuerpo extraño pueden fusionarse muchos macrófagos para formar un sincitio multinucleado (“células gigantes de cuerpo extraño”).

El macrófago es importante en la inflamación debido al gran número de sustancias biológicamente activas que puede producir. Algunas de ellas son tóxicas para las

células o para la matriz extracelular, otras atraen a todo tipo de células y, finalmente, otras dan lugar a la proliferación de fibroblasto, al depósito de colágeno y a la angiogénesis (desarrollo del sistema vascular). Además los macrófagos son componentes fundamentales de un sistema de células fagocíticas que derivan de los monocitos o tienen un parentesco estrecho con ellos y cumplen funciones importantes de limpieza y defensa de muchos órganos, con frecuencia en sitios especiales. Este sistema celular recibe el nombre de sistema fagocítico mononuclear, algunos ejemplos de estos macrófagos específicos de órganos son: los histiocitos (del tejido fino conectivo), las células de Kupffer (del hígado) o las células de Mesangiales (del riñón). La destrucción tisular es una de las características clave de la inflamación crónica, los macrófagos liberan en el foco inflamatorio proteasas, que destruyen los tejidos y factores estimulantes de célula que forman el tejido de granulación, esencialmente fibroblastos y células endoteliales. Otro tipo de células presentes en la inflamación crónica son los linfocitos, las células plasmáticas, los eosinófilos y los mastocitos.<sup>35</sup>

Los linfocitos T y B migran hacia el foco inflamatorio usando algunos de los pares de moléculas de adherencia (quimiocinas) que reclutan a los monocitos. Los linfocitos T tienen una relación recíproca con los macrófagos en la inflamación crónica: en primer lugar se activan por interacción con los macrófagos que presentan fragmentos de antígenos “procesados” en su superficie, a continuación, los linfocitos activados liberan distintos mediadores, como IFN (interferones) para la activación de los monocitos y macrófagos. Los macrófagos activados, a su vez, sintetizan citocinas, tales como interleuquina-1 (IL-1) y el Factor de Necrosis Tumoral (TNF), que contribuyen a activar aún más a los linfocitos y también a otras células. El resultado final es un foco inflamatorio donde los macrófagos y los linfocitos T se estimulan continuamente entre sí, hasta que desaparece el antígeno desencadenante. Las células plasmáticas son el resultado de la diferenciación final de los linfocitos B (LB) activados, pueden producir anticuerpos dirigidos contra los antígenos presentes en el lugar de la inflamación o contra los componentes hísticos alterados.

Los linfocitos B son estimulados en numerosas infecciones de origen bacteriano como el tétanos o difteria mientras que los linfocitos T aparecen en los focos inflamatorios de origen viral y en enfermedades granulomatosas como tuberculosis, lepra y micosis. Ambos aparecen en todas las reacciones inmunes.

Las células plasmáticas son el efecto de la estimulación persistente de un antígeno, son el resultado de una activación de los LB y tienen la capacidad de fabricar inmunoglobulinas (anticuerpo) específicas para ese antígeno. Pueden permanecer en el foco hasta muchos años después de desaparecer la actividad del foco inflamatorio. Además de las células mononucleadas en determinadas

situaciones pueden aparecer otras células inflamatorias como LPMN y eosinófilos. Estos últimos son especialmente abundantes en reacciones de hipersensibilidad tipo 1 y como respuesta a parásitos.

Los eosinófilos son células características de la inflamación que rodea a los parásitos o forman parte de las reacciones inmunitarias mediadas por IgE, típicamente asociada a la alergia. Su reclutamiento implica extravasación desde la sangre y migración a los tejidos en un proceso similar al de los leucocitos. Una de las quimiocinas que es específicamente importante en el reclutamiento eosinofílico es la eotaxina. Los orgánulos de los eosinófilos tienen una proteína básica mayor, altamente catiónica y tóxica para los parásitos pero también produce la lisis de las células epiteliales. Por ello, benefician el control de las infecciones por parásitos, pero pueden contribuir al daño tisular en las reacciones inmunitarias.

Por otro lado, los mastocitos son abundantes en el tejido conectivo y participan en las reacciones inflamatorias crónicas, así como también en las agudas. Expresan en su superficie un R (receptor) que se fija a la Fc (fracción constante) del Ac (anticuerpo) de IgE. En las reacciones inflamatorias crónicas se encargan de producir citocinas que contribuyen a la fibrosis.<sup>34</sup>

### **Formación de tejido**

Consiste en la angiogénesis (formación de nuevos vasos) y en la fibrosis. La fibrosis se realiza mediante la migración y proliferación de fibroblastos con un depósito de matriz extracelular y un remodelamiento final que se trata de una maduración y organización del tejido fibroso.<sup>36</sup>

## **2.3 Evolución de la inflamación**

El resultado final puede ser muy variable:

1. **Curación total.** La resolución de la inflamación se establece de forma progresiva. Inicialmente regresan los síntomas cardinales, posteriormente se establecen las condiciones circulatorias normales y finalmente se produce la reabsorción del exudado (materia más o menos fluida salida de los vasos pequeños o capilares que se deposita en los intersticios de los tejidos o en la cavidad serosa). En el foco inflamatorio permanecen durante mucho tiempo macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células plasmáticas que van disminuyendo lentamente.
2. **Cicatrización y fibrosis.** Si ha habido destrucción de tejido, la resolución se establece a través de la regeneración de los tejidos y/o de la formación de tejido de granulación, en el que los fibroblastos van a formar una



verdadera cicatriz, que deja como secuela estenosis (estrechez patológica) de conductos, estrías, cicatrices o adherencias.

3. **Propagación.** Algunas inflamaciones, específicamente las de origen infeccioso, tienden a propagarse por contigüidad a los tejidos vecinos. El pus, que se forma en muchas inflamaciones agudas, es muy necrosante y destruye tejidos de alrededor para formar fístulas o abscesos por los que drenan hacia el exterior o hacia cavidades.

Las inflamaciones pueden propagarse a zonas alejadas del foco a través de los vasos linfáticos o del torrente circulatorio. La progresión a través de los linfáticos produce linfagitis, en los tejidos alrededor de los linfáticos perilinfangitis y en los ganglios linfáticos linfadenitis, a partir de los ganglios la inflamación puede pasar a la sangre.

La llegada de gérmenes a la sangre se produce a través de los linfáticos o directamente desde el foco primario. Los gérmenes pueden pasar transitoriamente a la sangre provocando bacteriemia o pueden permanecer mucho tiempo multiplicándose en la sangre sin formar focos nuevos –septicemia- o formando nuevos focos infecciosos –piemia o septicopiemia.

## 2.4 Tipos de inflamación crónica

**Inflamación crónica no proliferativa:** Se caracteriza por la inflamación difusa o perivascular de las células mononucleadas, con escasa proliferación de tejido de granulación, se observa en las fases terminales de muchas infecciones agudas poco necrosantes, en las gastritis, en las nefritis intersticiales y en la hepatitis.

**Inflamación crónica proliferante o granulomatosa:** Es la forma más habitual de inflamación crónica, se caracteriza por la formación de tejido de granulación por proliferación vascular y de fibroblastos generalmente acompañados de un infiltrado de linfocitos, células plasmáticas y monocitos.

Las reacciones inflamatorias granulomatosas se producen cuando la fagocitosis por neutrófilos es inadecuada para neutralizar el agente causal. En ciertas enfermedades la respuesta inflamatoria aguda, dominada por neutrófilos, es transitoria y rápidamente sustituida por una reacción celular de base inmunitaria, que se caracteriza por cúmulos de macrófagos y linfocitos. Los macrófagos son denominados granulomas. Por eso, a este patrón se le denomina, con frecuencia, inflamación granulomatosa. Es un ejemplo de respuesta inflamatoria crónica, en la cual la persistencia del agente lesivo hace que se produzca lesión tisular, inflamación y reparación al mismo tiempo.<sup>37</sup>

## 2.5 Inflamación crónica granulomatosa

Es un tipo específico de reacción inflamatoria crónica, que se caracteriza por la acumulación de macrófagos modificados (células epitelioides) y que está iniciada por diversos agentes infecciosos y no infecciosos. Para la formación de granulomas es necesaria la presencia de productos irritantes no digeribles, de una reacción inmunitaria mediada por células T frente al agente irritante o de ambos.

El monocito evoluciona a macrófago, que es más activo y tiene gránulos más potentes, citoplasma más amplio y con mayor capacidad de división. El macrófago se activa por respuesta a un estímulo y se convierte en una célula más grande, con un citoplasma más amplio, más retículo endoplásmico rugoso, más mitocondrias y un núcleo alargado (célula epitelioides), el macrófago es sensible a agentes inflamatorios que son irritantes y difíciles de degradar, pero que son inertes, la formación de un granuloma “separa por medio de una pared” de modo efectivo al agente causal y es, por tanto, un mecanismo de defensa útil. Sin embargo, la formación de un granuloma no siempre lleva a la erradicación del agente causal, que con frecuencia es resistente a la destrucción o degradación, y la inflamación granulomatosa con la posterior fibrosis puede incluso ser la principal causa de disfunción del órgano en algunas enfermedades como la tuberculosis.<sup>38</sup>

- Granuloma: es una zona local de la inflamación granulomatosa, que consiste en la acumulación microscópica de macrófagos transformados en células epitelioides, rodeadas de un collar de leucocitos mononucleares, principalmente linfocitos y en ocasiones células plasmáticas, los granulomas más evolucionados aparecen rodeados de fibroblastos. Con frecuencia las células epitelioides se fusionan y forman células gigantes en la periferia de los granulomas, estas están constituidas por una masa de citoplasma que contiene veinte o más núcleos dispersos por el mismo (células gigantes de tipo cuerpo extraño), si se disponen en la periferia se denominan células gigantes tipo Langhans y si son centrales, con citoplasma vacuolado, se denominan células gigantes de tipo Touton además estas células pueden tener inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpo concoides o de Schaumann.

Tipos de granuloma:

- Por cuerpo extraño.
- Endógeno: moco, queratina, colesterol, ácido graso, ácido úrico, etc.
- Exógeno: frecuentemente debido al uso de prótesis, material quirúrgico, sílice, berilio, etc.

- Inmunitario: tuberculosis, sífilis, vasculitis, sarcoidosis, lepra, etc.

El granuloma puede ir asociado a:

- Necrosis.
- Caseosa: producida por micobacterias.
- Abscesificada: en la enfermedad producida por el arañazo de gato, infecciones por bartonella, etc.
- Fibrosis: que limita perfectamente el granuloma como ocurre en la sarcoidosis.
- Linfocitos y células plasmáticas: rodeándolo.
- Otros granulomas: no individuales, sino fusionados (tuberculosis o brucelosis).

Cuando existe mucha fibrosis se diferencia perfectamente el granuloma y se denomina sarcoidosis: enfermedad que afecta principalmente al pulmón, ganglios linfáticos, piel, conjuntiva, riñón...

Otras veces se puede formar un espacio con gas, también pueden aparecer cristales de ácido úrico, que se depositan formando ese granuloma (gota). Y en la tuberculosis el granuloma se caracteriza por necrosis caseosa central sin inclusiones y sin fibrosis, lo que lo diferencia de la sarcoidosis.<sup>39</sup>

## **2.6 Efectos sistémicos de la inflamación**

Los efectos sistémicos de la inflamación son denominados en conjunto reacción de fase aguda o, en los casos graves, síndrome sistémico de respuesta inflamatoria (SSRI).

Los efectos sistémicos de la inflamación son:

- Fiebre.
- Somnolencia.
- Malestar general.
- Anorexia.
- Degradación acelerada de las proteínas del músculo esquelético.
- Hipotensión.
- Síntesis hepática de proteínas.
- Alteraciones de la reserva de leucocitos circulantes.
- Aumento de pulso.
- Disminución de la sudoración.
- Temblores y escalofríos.

- En infecciones bacterianas graves se elevan de forma muy considerable las citocinas, TNF e IL-1, dando una triada clínica conocida como shock séptico: coagulación intravascular diseminada, hipoglucemia e insuficiencia cardiovascular.

Las citocinas IL-1, IL-6 y TNF son los mediadores más importantes de las reacciones de la fase aguda. Estas citocinas se sintetizan en los leucocitos en respuesta a la infección o a agresiones inmunitarias o tóxicas y se liberan hacia la circulación general, a menudo en forma de una cascada de citocinas. Así, el TNF induce la producción de IL-1, que a su vez estimula la síntesis de IL-6. Aunque con ciertas diferencias, TNF e IL-1 ejercen efectos semejante; por ejemplo, ambos influyen en el centro termorregulador del hipotálamo para producir fiebre. La IL-6 estimula la síntesis hepática de varias proteínas plasmáticas, en concreto de fibrinógeno y el ascenso de su concentración facilita la aglutinación de los eritrocitos, lo que explica la elevación de la velocidad de sedimentación globular asociada a la inflamación.

Otra característica frecuente en la inflamación es la leucocitosis, sobre todo las que son generadas por una infección bacteriana. La leucocitosis es el resultado inicial de la liberación de células por la médula ósea (causada por IL-1 y TNF) y se asocia a un mayor número de neutrófilos relativamente inmaduros en la sangre (“desviación a la izquierda”). Sin embargo, la infección prolongada también desencadena la proliferación de precursores en la médula ósea, ya que tanto IL-1 como TNF incrementa la producción de factores estimulante de colonias.

Las infecciones parasitarias causan una eosinofilia característica. Ciertos virus, como los de la mononucleosis infecciosa, la parotiditis epidémica y la rubéola, provocan un incremento selectivo del número de linfocitos.

Por el contrario la leucopenia también aparece en infecciones en pacientes debilitados; generalmente en infecciones víricas y también en las debidas a rickettsias y protozoos y ciertas infecciones bacterianas.<sup>36</sup>

Con los antecedentes conocemos que existen dos tipos de inflamación, la crónica y la aguda en el experimento que se realizó se evaluaron ambas, en el caso de la inflamación aguda se indujo la inflamación mediante la inoculación de un agente externo como lo es la carragenina para así poder evaluar si nuestro extracto tenía algún efecto antiinflamatorio.

### 3. Inflamación aguda

La inflamación aguda es una respuesta rápida ante un agente agresor que sirve para liberar mediadores de defensa del huésped (leucocitos y proteínas plasmáticas) en el sitio de la lesión, normalmente dura menos de 15 días.

La inflamación aguda tiene tres componentes principales: 1) Alteraciones en el calibre vascular, que dan lugar a un aumento en el flujo sanguíneo. 2) Cambios estructurales que permiten a las proteínas plasmáticas y los leucocitos abandonen la circulación para producir exudados inflamatorios, 3) Migración de leucocitos de los vasos sanguíneos y acumulación de los mismos en el foco de la lesión. Los leucocitos principales en la inflamación aguda son los neutrófilos polimorfonucleares.<sup>38</sup>

Estas alteraciones producen los signos clínicos clásicos de la inflamación. Existen cuatro signos cardinales de la inflamación:

- Enrojecimiento o rubor: se debe principalmente a la vasodilatación que se produce en la zona inflamada.
- Edema o tumor: aumento del líquido intersticial y formación de edema.
- Calor: aumento de la temperatura en la zona inflamada. Se debe a la vasodilatación y al incremento del consumo local de oxígeno.
- Dolor: aparece como la consecuencia de la liberación de sustancias capaces de provocar la activación de los nociceptores que son terminaciones nerviosas libres de neuronas sensitivas primarias, cuyos cuerpos neuronales se encuentran en los ganglios raquídeos, esto quiere decir que los nociceptores no están rodeados de estructuras especiales, como es el caso de otros receptores sensoriales de la piel, como los corpúsculos de Pacini que detectan las vibraciones, o los discos de Merkel, que detectan la presión. Hay tres grandes clases de nociceptores: térmicos, mecánicos y polimodales. Todos ellos tienen en común la existencia de umbrales de excitación elevados, en comparación con los receptores del tacto y de la temperatura normal. Esto implica que normalmente no se activan en ausencia de estimulaciones nocivas.

La pérdida de la función y el dolor ocurren como consecuencia de la síntesis de mediadores y de la lesión mediada por leucocitos.<sup>40</sup>

Si comparamos la inflamación crónica con la aguda, encontramos como primera diferencia la evolución en el tiempo, se observa que la aguda se resuelve más o menos en una semana, mientras que la crónica permanece en el tiempo. Otra diferencia es el tipo de célula que participa en cada una: el protagonista de la

inflamación aguda son los leucocitos polimorfonucleares, mientras que en la crónica son los mononucleares.

El destino final del proceso inflamatorio, en ambos tipos, es la curación por regeneración de tejidos volviéndose de nuevo funcionales (son células lábiles) o por proliferación de fibroblastos con depósitos de colágeno, es decir, una cicatrización propia de tejidos y células no lábiles (están en fase G0).

La inflamación es una reacción compleja ante agentes lesivos, tales como microbios y células dañadas, habitualmente necróticas, que consta de respuestas vasculares, migración y activación de leucocitos y reacciones sistemáticas. La característica única del proceso inflamatorio es la reacción de vasos sanguíneos, que da lugar a la acumulación de líquido y leucocitos en los tejidos extravasculares. La respuesta inflamatoria está estrechamente entrelazada con el proceso de reparación, de hecho la inflamación sirve para destruir, diluir o desnudar al agente agresor, y se pone en acción una serie de acontecimientos que tratan de curar y reconstruir el tejido dañado.

La inflamación es una respuesta protectora cuyo objetivo es librar al organismo de la causa inicial de agresión celular y las consecuencias de la agresión. Sin inflamación las infecciones quedarían incontroladas y las heridas nunca curarían, sin embargo, la inflamación y su reparación pueden ser potencialmente dañinas.

La respuesta inflamatoria consta de dos componentes principales: una reacción vascular y una reacción celular. En ambos participan muchos tejidos y células, incluyendo el líquido y proteínas del plasma, células circulantes (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas), vasos sanguíneos y elementos celulares y extracelulares del tejido conectivo (mastocitos, fibroblastos, macrófagos y linfocitos). La MEC (matriz extracelular) consta de proteínas fibrosas estructurales (colágeno, elastina), glucoproteínas adherentes (fibronectina, colágeno no fibrilar, tenascina y otras) y proteoglicanos. La membrana basal es un componente especializado de la MEC que consta de glucoproteínas adherentes y proteoglicanos.

La inflamación aguda tienen un comienzo rápido (segundos o minutos) y dura relativamente pocos (minutos, horas o días). Tiene una exudación de líquido y proteínas plasmáticas (edema) y migración de leucocitos, fundamentalmente neutrófilos.

La inflamación crónica es de duración más larga y se asocia a la presencia de linfocitos y macrófagos, proliferación de vasos, fibrosis y necrosis tisular.

Las reacciones vasculares y celulares de la inflamación aguda y crónica están mediadas por factores químicos derivados de proteínas plasmáticas o de células, y son después de estímulos inflamatorios. Tales mediadores operan actuando aislados, en combinación o en secuencia, y como resultado amplifican la respuesta inflamatoria e influyen sobre la evolución. Las mismas células o tejido necrótico pueden desencadenar la elaboración de mediadores inflamatorios.

La inflamación termina cuando el agente ofensor se elimina y los mediadores se disipan, además hay mecanismos activos antiinflamatorios que controlan la respuesta y evitan un daño excesivo.

### **3.1 Estímulos de la inflamación aguda**

Las reacciones de inflamación aguda están desencadenadas por diversos estímulos:

- Las infecciones se encuentran entre las causas más comunes y medicamente importantes en la inflamación.
- Traumatismos.
- Agentes físicos y químicos (lesión térmica, lesiones por congelación, irradiación, agentes químicos o ambientales).
- Necrosis tisular.

Se sabe que varias moléculas liberadas por las células necróticas inducen la inflamación; entre ellas se encuentra el ácido úrico, un metabolito de la purina, la adenosina trifosfato que es la reserva normal de energía, además de una proteína ligadora de ADN (ácido desoxirribonucleico) de función desconocida que se llama HMGB-1 (grupo de proteína de alta movilidad B1, por sus siglas en inglés); e incluso el ADN liberado hacia el citoplasma y que no se encuentra secuestrado dentro del núcleo, como sucede en condiciones normales. La hipoxia, que con frecuencia es la base de las lesiones celulares, también induce por sí misma la respuesta inflamatoria. Esta respuesta viene mediada en gran parte por la proteína llamada HIF-1 alfa (factor inducido por la hipoxia 1 alfa), que se produce por las células privadas de oxígeno y que activa la transcripción de muchos genes implicados en la inflamación, incluido el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que incrementa la permeabilidad vascular.

- Cuerpos extraños (astillas, suciedad, suturas) inducen típicamente una inflamación, porque provocan lesiones tisulares traumáticas o porque contienen microbios.
- Reacciones inmunitarias:

Llamadas también reacciones de hipersensibilidad. Son reacciones en las que el sistema inmunitario, que en condiciones normales debería ser protector, produce

lesiones en los tejidos del individuo (lesión autoinmune). Las respuestas inmunitarias lesivas pueden dirigirse frente a auto antígenos (también llamados proteínas del MHC, el complejo mayor de histocompatibilidad), lo que determina las enfermedades autoinmunitarias, o pueden ser reacciones excesivas frente a sustancias ambientales o microbios.

### **Modificaciones en el flujo y el calibre de los vasos**

Las modificaciones en el flujo y el calibre de los vasos constituyen uno de los tres componentes inflamatorios de la respuesta inflamatoria, estos se inician inmediatamente tras la lesión y su velocidad de desarrollo depende de la gravedad de la misma.

1. Se produce vasoconstricción transitoria inicial de las arteriolas.
2. Aparece vasodilatación con aumento del flujo, por apertura de esfínteres pre-capilares. Este proceso explica el calor y el enrojecimiento. La vasodilatación esta inducida por la acción de varios mediadores, especialmente histamina y óxido nítrico, sobre el musculo liso vascular.
3. La disminución de la velocidad de la circulación y el aumento de la viscosidad de la sangre se debe al incremento de la permeabilidad vascular y al de la concentración local de los eritrocitos. Todos estos cambios se manifiestan por la presencia de pequeños vasos dilatados llenos de eritrocitos, un proceso denominado estasis. El aumento de la permeabilidad es la causa del edema.
4. A medida que se desarrolla la estasis, los leucocitos (principalmente neutrófilos) empiezan a separarse de la sangre en movimientos y a acumularse en la superficie endotelial vascular, un proceso denominado marginación. Tras adherirse a las células endoteliales, se deslizan entre ellas y atraviesan la pared vascular y migran hacia los tejidos intersticiales.<sup>38</sup>

Los fenómenos locales vasculares que tienen lugar en la inflamación pueden ilustrarse con la llamada triple respuesta de Lewis (1927), que permite demostrar la importancia de la liberación de sustancias químicas en el foco inflamatorio y su papel en el desarrollo de la inflamación.

- a. **La reacción inicial** es inmediata y se caracteriza por la aparición de una zona roja mate debida probablemente a la liberación de histamina por las células cebadas tisulares, que produce una vasodilatación inmediata. Dura de 0 a 5 minutos.



**b. La fase precoz** dura de 3 a 10 minutos, y en ella se produce una vasodilatación periférica que se traduce en un halo rojo intenso –eritema-. Probablemente depende de una vasodilatación de origen neurógeno reflejo, ya que desaparece si se seccionan los nervios de la zona. En la inflamación aguda de los tejidos no es importante la contribución de los nervios, ya que pueden producirse inflamaciones en tejidos desnervados.

**c. La fase tardía** dura de ½ a 4 horas y regresa en menos de 6 horas. En esta fase aparece una tumefacción con palidez. Microscópicamente hay exudación y salida de líquidos. Esta fase se debe a la liberación de los mediadores químicos tardíos de la inflamación. Algunas noxas (agentes externos que producen algún malestar) como la luz ultravioleta o las toxinas bacterianas producen sólo la fase tardía, que por otro lado puede cronificarse.<sup>41</sup>

### **3.2 Evolución de la inflamación aguda**

El proceso de la inflamación aguda se puede alterar por la naturaleza e intensidad de la lesión, por la localización y el tejido afectado, y por la respuesta del huésped, aunque generalmente el proceso tiene alguna de las siguientes cuatro formas de evolución:

- a) Resolución completa, con regeneración de las células originales y restablecimiento a la normalidad de la zona en la que se produjo la inflamación aguda
- b) Formación de abscesos, especialmente en las infecciones producidas por microorganismos piógenos.
- c) Curación mediante sustitución por tejido conjuntivo (fibrosis) cicatrización, que se produce cuando ha existido una destrucción tisular importante, cuando la inflamación afecta a tejidos que no se presentan regeneración, o cuando existe una exudación de fibrina abundante.
- d) Evolución hacia inflamación crónica.<sup>40</sup>

## **4. Técnicas evaluadas**

En este estudio se utilizaron distintas técnicas con las cuales se evaluó el grado de afecciones causadas por procesos inflamatorios, con lo cual podremos determinar si el extracto que se está estudiando tiene propiedades

antiinflamatorias, estos marcadores son utilizados ya que anteriormente han sido evaluados en estudios previos en los cuales tuvieron efectividad.

En general, para la evaluación de sustancias con interés como antiinflamatorios, será necesario caracterizar su acción sobre diferentes mediadores y componentes implicados en las reacciones inflamatorias, solamente hemos seleccionado dos marcadores de respuesta inflamatoria y dos técnicas sencillas que son utilizadas en los laboratorios de investigación para evaluar la acción antiinflamatoria.

Las pruebas seleccionadas son:

- Determinación de ceruloplasmina mediante la técnica de Inmunodifusión radial (Técnica de Mancini)
- Valoración de la concentración de óxido nítrico (NO) mediante la reacción de Griess.

## 4.1 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina es una glucoproteína cuyo peso molecular es de 134 kDa y un punto isoeléctrico de 4.4, esta glucoproteína migra con las  $\alpha$ -2-globulinas y cataliza el paso ferrosférico. El 90-95% del cobre circula ligado a la ceruloplasmina y sólo se libera al catalizarse ésta. El 5-10% del cobre se transporta unido a la albúmina y los aminoácidos (histidina, treonina). Estos se intercambian con los tejidos (músculo, riñón, médula ósea, y cerebro). Los tejidos más ricos en cobre son el hígado y el cerebro. Se excreta principalmente por vía biliar y orina y en menor cantidad por el sudor.<sup>9</sup> Se denomina ceruloplasmina por su color azul. Tiene ocho sitios de unión para cobre, uno tanto  $\text{Cu}^+$  como  $\text{Cu}^{2+}$ , esta proteína actúa como una ferroxidasa, transformando  $\text{Fe}^{2+}$  en  $\text{Fe}^{3+}$  antes de la incorporación del  $\text{Fe}^{3+}$  a la transferrina, es el vehículo de transporte del cobre por la sangre, y participa en su homeostasis, (la ceruloplasmina es una proteína multifuncional que realiza, al mismo tiempo, un papel enzimático como oxidasa y el transporte de cobre).<sup>7</sup>

### 4.1.1 Reacción Inflamatoria Sistémica

En los casos más graves, sobre todo en pacientes sometidos a cirugías extensas o con afecciones u otras complicaciones, puede aparecer la respuesta inflamatoria sistémica, en ocasiones una reacción inflamatoria local también puede hacerse exagerada y desproporcionada respecto al estímulo por efecto del reclutamiento de otros componentes por parte de los mecanismos de amplificación. La activación inadecuada de los granulocitos polimorfonucleares, su adhesión a las células endoteliales y la consiguiente liberación de productos citotóxicos tienen un

papel crucial en el proceso. En la cirugía cardíaca, durante la circulación extracorpórea, puede observarse una forma especial de respuesta inflamatoria sistémica, al estar en contacto la sangre con superficies endoteliales, se ponen en marcha las complejas vías de la inflamación y la coagulación para activar las plaquetas, los neutrófilos y el sistema de contacto de las proteasas plasmáticas. La prolongación de la respuesta sistémica a causa de concentraciones elevadas de citocinas y otros mediadores, contribuye a la aparición del síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica (RISS), al síndrome de disfunción multiorgánica (MODS) y al fracaso multiorgánico (MOF). Este desarrollo puede deberse a un amplio espectro de compuestos, ya actúen como desencadenantes, mediadores o efectores de la cascada inflamatoria. La respuesta inflamatoria sistémica, que posiblemente no era infecciosa al principio, puede volverse de carácter infeccioso debido a una translocación bacteriana de origen digestivo o a una infección focal o nosocomial.<sup>8</sup>

#### **4.1.2 Respuesta de fase aguda**

En su sentido más amplio, la respuesta de fase aguda comprende todas las reacciones ante una lesión o infección, pero en su acepción más restringida sólo se refiere a las modificaciones que sufren en la sangre las concentraciones de las proteínas de fase aguda.

Las proteínas de fase aguda pueden dividirse en aquellas cuyas concentraciones plasmáticas se incrementan (proteínas de fase agudas positivas) y aquellas otras cuyas concentraciones disminuyen (proteínas de fase aguda negativas) en al menos un 25% durante el trastorno inflamatorio. Las proteínas de fase aguda se sintetizan principalmente en el hígado, y las citocinas son importantes mediadores de esta respuesta.

Las concentraciones séricas de las proteínas de fase aguda aumentan rápidamente, mientras los reactantes de fase aguda negativos –albumina sérica, transferrina, prealbúmina y proteína de unión del retino- disminuyen. Las proteínas de fase aguda participan en la coagulación de la sangre (fibrinógeno), la curación de heridas (fibrinógeno, haptoglobina), la fagocitosis y la lisis bacteriana (complemento, CRP), la antitrombosis (glucoproteína ácida alfa-1), la antiapoptosis (inhibidor de proteasa alfa-1, antiapoptotripsina alfa-1), la antioxidación (ceruloplasmina, glutatión) y el transporte (ceruloplasmina, haptoglobina, hemopexina).

La proteína C reactiva (CRP) es la más conocida de las principales proteínas de fase aguda. Es un mediador antiinflamatorio implicado en las funciones microbicidas y fagocítica, y que bloquea la acción de la IL-1 mediante la inducción

de antagonismo en su receptor. Es una forma primitiva e inespecífica de la respuesta inmune.<sup>8</sup>

La ceruloplasmina se determina por la técnica de inmunodifusión radial.

#### **4.1.3 Inmunodifusión radial o técnica de Mancini.**

Este método se basa en mezclar los anticuerpos en una solución de agarosa mantenida entre 40 y 45° C, al enfriarse la agarosa gelifica, constituyendo el soporte semisólido donde los anticuerpos se someten a una interacción con los antígenos homólogos. Los antígenos solubles colocados en las perforaciones practicadas en el gel se difunden radialmente, al tiempo que interaccionan con los anticuerpos incluidos en el mismo, originando al alcanzarse las concentraciones de equivalencia, halos o anillos definidos por precipitación.

#### **4.1.4 Reacción antígeno-anticuerpo.**

Una reacción antígeno-anticuerpo es la interacción del antígeno con su respectivo anticuerpo, este acoplamiento estructural se da por varias fuerzas débiles que disminuyen con la distancia, podemos citar como ejemplo los puentes de hidrógeno y la fuerza de Van der Waals.

Esta unión depende de la complementariedad entre ambas moléculas, por lo que se efectúa a través de múltiples enlaces no covalentes entre una parte del antígeno y los aminoácidos del sitio de unión del anticuerpo. La reacción se caracteriza por ser específica, rápida, reversible y espontánea.

#### **4.1.5 Reacción de precipitación.**

La reacción de precipitación se efectúa cuando un anticuerpo, por lo menos divalente se une con un antígeno soluble y esto conlleva a la formación de agregados que precipitan, para que tal precipitación ocurra en forma máxima se necesitan que tanto el antígeno como el anticuerpo se hallen en concentraciones óptimas, cuando cualquiera de los reaccionantes se encuentre en exceso no se pueden formar grandes agregados de antígeno-anticuerpo; en este caso el antígeno se encuentra disuelto y al unirse al anticuerpo se forman macro-complejos moleculares semejantes a una red tridimensional, que debido a su tamaño precipita. Esta etapa se acelera con el aumento de la temperatura y además es dependiente de la concentración de electrolitos.<sup>9</sup>

## 4.2 Óxido Nítrico (NO)

El NO es un radical libre gaseoso que en los mamíferos se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS). Tiene funciones importantes en el organismo como son: reducir la agregación y adhesión plaquetaria, en el sistema vascular actúa como regulador de la presión sanguínea, el NO se sintetiza en las células del endotelio, en la capa de células que forma el interior de los vasos sanguíneos y actúa como vasodilatador de las arterias de mayor musculatura. Se trata de una reacción molecular compleja que necesita oxígeno molecular y coenzimas como la tetrahidrobiopterina, NADPH, FAD y FMN. Como productos de la reacción aparecen el NO y L-citrulina. Este radical libre gaseoso se difunde fácilmente desde las células donde se produce a las células musculares lisas vasculares, en donde estimula a la guanilatociclasa soluble y cataliza la formación de GMPc que provoca vasodilatación.

Existen tres isoenzimas de NOS: inducible (iNOS), neuronal constitutiva (nNOS) y endotelial constitutiva (eNOS). Las isoenzimas constitutivas generan pequeñas cantidades de NO, mientras que la isoforma (iNOS) produce cantidades mucho mayores que caracterizan algunos estados patológicos en los que se induce la expresión de esta enzima. La iNOS se expresa en macrófagos, hepatocitos, neutrófilos, musculatura lisa y células endoteliales en respuesta a diversos estímulos inmunológicos como el IF TNF $\alpha$ . También es inducido por el propio lipopolisacarido bacteriano a través de la activación de NF-kappa  $\beta$  (factor nuclear Kappa de cadenas ligeras-potenciadas de células B activadas, es un complejo de proteína que controla la transcripción de ADN, se encuentra en casi todos los tipos de células animales y está implicado en las respuestas celulares a los estímulos tales como el estrés, citocinas, radicales libres, irritación ultravioleta, oxidasa LDL, y bacterianas o virales antígenos).

La determinación del radical NO por sí sólo, es difícil debido a su naturaleza como radical y su corta vida media. Por lo tanto, la medición de la producción del radical NO se realiza mediante la determinación de productos finales del NO, nitratos y nitritos en suero. Estas medidas se llevan a cabo con la reacción de Griess, basada en la determinación de nitritos.<sup>10</sup>

### 4.2.1 Reacción de Griess.

La prueba de Griess es una prueba química que detecta la presencia de nitritos orgánicos. El nitrito es detectado y analizado por la formación de un color rojo-rosado, sobre el tratamiento de NO<sub>2</sub>, que contiene la muestra de Griess reactivo. Cuando el ácido sulfanílico se agrega, los nitritos forman una sal de diazonio. Cuando se agrega el  $\alpha$ -naftilamina, se desarrolla un color rosado.<sup>11</sup>

## **4.3 Peroxidación lipídica**

Los radicales libres son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado o libre por lo que son muy reactivos ya que tienden a captar un electrón de moléculas estables con el fin de alcanzar su estabilidad electroquímica. Una vez que el radical libre ha conseguido sustraer el electrón que necesita, la molécula estable que se lo cede se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una verdadera reacción en cadena que destruye nuestras células. La vida media biológica del radical libre es de microsegundos, pero tiene la capacidad de reaccionar con todo lo que esté a su alrededor provocando un gran daño a moléculas, membranas celulares y tejidos. Los radicales libres no son intrínsecamente deletéreos; de hecho, nuestro propio cuerpo los produce en cantidades moderadas para luchar contra bacterias y virus.

Estas acciones se dan constantemente en las células de nuestro cuerpo, proceso que debe ser controlado con una adecuada protección antioxidante. Un antioxidante es una sustancia capaz de neutralizar la acción oxidante de los radicales libres mediante la liberación de electrones en nuestra sangre, los que son captados por los radicales libres. El problema para la salud se produce cuando nuestro organismo tiene que soportar un exceso de radicales libre durante años, producidos mayormente por contaminantes externos, que provienen principalmente de la contaminación atmosférica y el humo de cigarrillos, los que producen distintos tipos de radicales libres en nuestro organismo. El consumo de aceites vegetales hidrogenados tales como la margarina y el consumo de ácidos grasos trans como los de las grasas de la carne y de la leche también contribuye al aumento de los radicales libres.

### **4.3.1 Estrés oxidativo**

Especies reactivas del oxígeno (ERO) es el término que se aplica colectivamente a las moléculas que son agentes oxidantes y/o son fácilmente convertidos en radicales. En la última década se han acumulado evidencias que permiten afirmar que los radicales libres y el conjunto de especies reactivas que se asocian juegan un papel central en nuestro equilibrio homeostático, y que es normal en el funcionamiento de los mecanismos de regulación que conservan el estado normal fisiológico de los organismos. En mamíferos son muchos los procesos fisiopatológicos causados por estas especies tales como los mecanismos patogénicos asociados a virus, bacterias, parásitos y células anormales, constituyendo un mecanismo de defensa del organismo frente a estos agresores. Cuando el aumento del contenido intracelular de ERO sobrepasa las defensas

antioxidantes de la célula se produce el estrés oxidativo, a través del cual se induce daño a moléculas biológicas como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. El estrés oxidativo se presenta en diversos estados patológicos en los cuales se altera la funcionalidad celular, contribuyendo o retroalimentando el desarrollo de enfermedades degenerativas como la aterosclerosis, cardiomiopatías, enfermedades neurológicas y cáncer.<sup>42</sup>

#### 4.3.2 Especies reactivas del oxígeno (ERO)

El oxígeno es una molécula básicamente oxidante, hasta el punto que en las células que lo utilizan para su metabolismo es el principal responsable de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo, no todas las especies oxidantes tienen un origen endógeno; la existencia de factores exógenos, como la radiación solar, toxinas fúngicas, pesticidas o xenobióticos, pueden incrementar su nivel. En condiciones normales, las células metabolizan la mayor parte del oxígeno ( $O_2$ ) con la formación de agua sin formación de intermediarios tóxicos, mientras que en un pequeño porcentaje (en torno al 5%) forman tres intermediarios altamente tóxicos, dos de los cuales son literalmente radicales libres (el anión superóxido y el hidroxilo). En situaciones en las que exista una mayor actividad metabólica (etapas del crecimiento, desarrollos activos o **procesos inflamatorios**) ocurre una mayor demanda tisular de  $O_2$  y parte de él se metaboliza, generándose un alto número de sustancias oxidantes.

La segunda gran fuente de ERO también es endógena y está constituida por el metabolismo de las células defensivas tales como los polimorfonucleares, los monocitos sensibilizados, los macrófagos y los eosinófilos. Para que éstas puedan cumplir su misión, están dotadas de diversas proteínas así como de vías metabólicas que generan varias especies químicamente agresivas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo, cuyo fin último es lesionar y destruir elementos extraños. En condiciones normales estas especies reactivas son producidas y utilizadas en compartimientos celulares como los lisosomas que, aunque en el interior de los fagocitos, no tienen por qué dañar a las células siempre y cuando los mecanismos antioxidantes de éstas funcionen adecuadamente.

Los oxidantes pueden también proceder del exterior, bien sea directamente o como consecuencia del metabolismo de ciertas sustancias. Algunos ejemplos lo constituyen la contaminación ambiental, la luz solar, las radiaciones ionizantes, una concentración de oxígeno demasiado elevado, los pesticidas, metales pesados, la acción de ciertos xenobióticos (cloroformo, paracetamol, etanol, tetracloruro de carbono, violeta de genciana) o el humo de tabaco. Sin embargo el papel de los radicales libres no ha de ser abordado sólo desde una perspectiva

negativa o patológica. Estos compuestos cumplen también una función fisiológica al participar, en condiciones normales, en la defensa frente a las infecciones, en el metabolismo normal, en la fagocitosis e inflamación.<sup>43</sup>

#### **4.3.3 Peroxidación lipídica**

Todas las células están rodeadas por una membrana que las separa del medio extracelular, esta membrana celular contiene proteínas que juegan papeles vitales en la interacción de una célula con otras células, hormonas y agentes reguladores del líquido extracelular. La estructura básica de todas las membranas biológicas es la capa bilipídica, la que funciona como una barrera de permeabilidad selectiva. Éstas son ricas en ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) y por lo tanto vulnerables al ataque de radicales libres que traen como consecuencia la peroxidación lipídica. Esta es generalmente inducida por un radical hidroxilo que sustrae un hidrógeno a la cadena lateral de un ácido graso formando un radical carbonado, lo que genera una cadena de reacciones oxidativas. Los antioxidantes, pueden formar complejos estables impidiendo la acción catabólica de los radicales libres en la membrana celular.

Los mecanismos homeostáticos con que el organismo enfrenta el daño oxidativo que habitualmente causan estas especies son numerosos y diversos, reflejando la multiplicidad de formas de radicales libres y especies reactivas, como también los numerosos compartimientos donde actúan en el organismo y las propiedades físicas de éstos.<sup>12</sup>

#### **4.3.4 Lesiones producidas por especies reactivas de oxígeno**

Las especies reactivas de oxígeno reaccionan con las principales clases de macromoléculas celulares causándoles lesiones. Los fosfolípidos presentes en las membranas plasmática y de orgánulos están sujetos a peroxidación lipídica, una reacción en cadena de radicales libres iniciada por la eliminación de hidrógeno de un ácido graso poliinsaturado por el radical hidroxilo. Los radicales lipídicos resultantes reaccionan a continuación con O<sub>2</sub> para formar radicales peróxido lipídicos junto con malonildialdehído, que es hidrosoluble y se puede detectar en la sangre. Un ejemplo de los efectos de la peroxidación lipídica en el hombre son las manchas marrones que se observan frecuentemente en las manos de las personas ancianas. Estas manchas “de la edad” contienen el pigmento lipofucsina que se cree que es una mezcla de lípidos entrecruzados y productos de la peroxidación de lípidos que se acumula en los individuos a lo largo de los años. Una consecuencia significativa de la peroxidación lipídica es un aumento de la permeabilidad de las membranas a una afluencia de calcio y otros iones con la



consiguiente hinchazón de la célula. Incrementos parecidos en la permeabilidad de las membranas de los orgánulos pueden dar lugar a una distribución incorrecta de iones con el resultado de lesión intracelular. Por ejemplo, la acumulación de cantidades excesivas de calcio en las mitocondrias puede desencadenar la apoptosis.<sup>13</sup>

El tratamiento de la inflamación va a depender del trastorno en particular y el tipo de citocina responsable de la enfermedad, en algunos casos será indispensable el uso de algún fármaco, en algunos casos, existen medios para reducir la inflamación como una correcta alimentación (artritis reumatoide) y en algunos casos los remedios homeopáticos tienen efecto positivo (árnica), en el caso de los fármacos podremos usar de dos tipos, los agentes antiinflamatorios esteroideos y los no esteroideos.

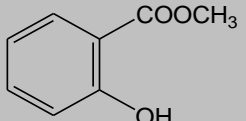
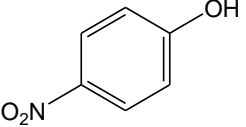
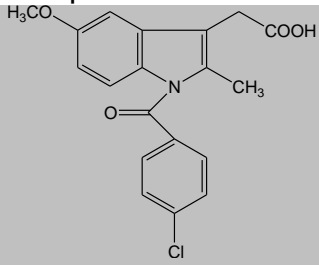
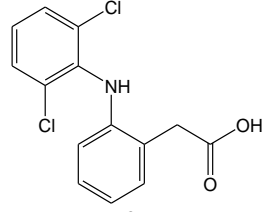
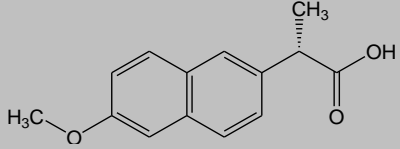
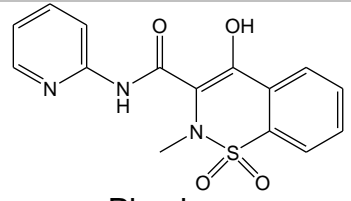
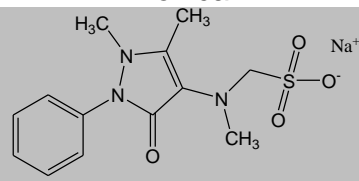
## **5. Agentes antiinflamatorios**

### **5.1 Antiinflamatorios no esteroideos**

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINES) son un grupo variado y químicamente heterogéneo de fármacos principalmente antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos, por lo que reducen los síntomas de la inflamación, el dolor y la fiebre respectivamente. Todos ejercen sus efectos por acción de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa (COX).

Los AINES inhiben la actividad tanto de la ciclooxigenasa-1 (COX-1) como a la ciclooxigenasa-2 (COX-2), y por lo tanto, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Se piensa que es la inhibición de la COX-2 la que en parte conlleva a la acción antiinflamatoria, analgésica y antipirética de los AINES, sin embargo, aquellos que simultáneamente inhiben a la COX-1 tiene la capacidad de causar hemorragias digestivas y úlceras. Por lo tanto, se enfatizan las ventajas de inhibidores selectivos para la COX-2.<sup>3</sup> Sin embargo, es importante señalar que todos los AINES comparten en mayor o menor medida una serie de efectos adversos como: reacciones de hipersensibilidad, intolerancia gastrointestinal, hasta el sangrado y ulceración (efectos gastrotóxicos); inhibición de la agregación plaquetaria y prolongación del tiempo de sangrado; en algunos casos promueven la inhibición de la motilidad uterina con la consecuente prolongación de la gestación e inhibición de la función renal (nefrotoxicidad), dependiente de prostaglandinas.<sup>4</sup> En la tabla 1 se incluyen ejemplos de agentes antiinflamatorios no esteroideos AINES, además se puede apreciar cómo es que estos encuentran clasificados.

**Tabla 1.** Clasificación de agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

<b>CLASIFICACIÓN</b>	<b>FÁRMACOS REPRESENTATIVOS</b>	<b>ESTRUCTURA</b>
<b>Derivados del salicilato</b>	Ácido acetilsalicílico, salicilato de sodio, sulfasalazina, olsalazina.	 <p>Salicilato de metilo</p>
<b>Derivados del <i>p</i>-aminofenol</b>	Acetaminofen, paracetamol.	 <p><i>p</i>-aminofenol</p>
<b>Derivados del indol y ácido indenacético</b>	Indometacina, Etodolac, Acemetacina.	 <p>Indometacina</p>
<b>Derivados del ácido heteroarilacético</b>	Tolmetin, Diclofenaco, Ketorolaco.	 <p>Diclofenaco</p>
<b>Derivados del ácido arilpropiónico</b>	Naproxeno, Ibuprofeno, Ketoprofeno, Fenoprofeno, Oxaprocin.	 <p>Naproxeno</p>
<b>Derivados del ácido enólico</b>	Piroxicam, Tenoxicam, Meloxicam.	 <p>Piroxicam</p>
<b>Derivados de las pirazonolas</b>	Metamizol (dipirona), Fenilbutazona, Oxifenbutazona.	 <p>Metamizol</p>

- **Indometacina**

La indometacina es un medicamento de tipo antiinflamatorio no esteroideo derivado del indol metilado, el cual inhibe la producción de prostaglandinas por lo que se indica para el alivio del dolor, fiebre y la inflamación. La actividad de la indometacina se logra por su capacidad para inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX-1), responsable de la síntesis de prostaglandinas. En este fármaco tiene una mayor selectividad hacia la COX-1 que sobre la COX-2.

La indometacina se absorbe de manera rápida ( $t_{m\acute{a}x}$ = 2 horas) y casi completamente (90% en 4 horas) por vía oral, y se une en un 90% a las proteínas del plasma sanguíneo. Presenta un importante fenómeno de recirculación enterohepática, lo que explica la variabilidad de su vida media plasmática (1-6 horas). El 10-20% se elimina sin metabolizar por secreción tubular activa. Se distribuye por todo el organismo y en el líquido sinovial alcanza concentraciones similares a las del plasma sanguíneo en 5 horas.<sup>5</sup>

## **5.2 Antiinflamatorios esteroideos.**

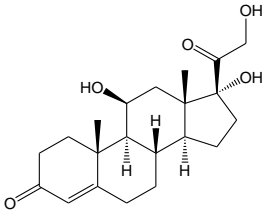
Los antiinflamatorios naturales, segregados por el propio organismo, son los derivados de los corticoides, sustancias de origen esteroideo de potente acción antiinflamatoria, pero que desarrollan importantes efectos secundarios.

Los glucocorticoides ejercen una poderosa acción antiinflamatoria, sea cual fuere la causa de la inflamación (infecciosa, química, física o inmunológica), pudiendo inhibir tanto las manifestaciones inmediatas de la inflamación (rubor, dolor, etc.) como tardías, entendiéndose por tales ciertos procesos de cicatrización y proliferación celular. Inhiben la dilatación vascular, reducen la trasudación líquida y la formación de edema, disminuyen el exudado celular y reducen el depósito de fibrina alrededor, son necesarias dosis farmacológicas, pero la respuesta es tan intensa que los glucocorticoides son los antiinflamatorios más eficaces. Varios son los mecanismos responsables de estas acciones.

Los glucocorticoides producen efectos sobre las células inflamatorias, como la disminución de la salida de neutrófilos de los vasos sanguíneos y reducción de la actividad de neutrófilos y macrófagos, debido a una menor transcripción de los genes de factores de adherencia celular y citoquinas implicadas. Disminución de los linfocitos T colaboradores y la proliferación clonal de los mismos, principalmente a través de la menor transcripción de los genes de interleucina 2 (IL-2) y su receptor. Disminución de la función de los fibroblastos y menor producción de colágeno y glucosamínoglucanos, esto reduce la contribución de estos mecanismos a la inflamación crónica, cicatrización y reparación. Producen

también disminución de la función de los osteoblastos y aumento de la actividad de los osteoclastos con la consiguiente tendencia a desarrollar osteoporosis.<sup>35</sup>

- **Hidrocortisona**



La hidrocortisona, es un corticoide sintético con similares mecanismos de acción que el glucocorticoide natural, es decir, induce profundos y rápidos cambios en el metabolismo, entre estos: protege los niveles de glucosa mediante inducción de glucogenosíntesis, promueve la gluconeogénesis a partir de las proteínas, facilita la lipólisis y tiene la capacidad de suprimir las manifestaciones inflamatorias, gracias a que bloquean parcialmente las funciones de los neutrófilos (liberación de enzimas lisosómicas, estallido respiratorio). Los glucocorticoides antagonizan la diferencia de los macrófagos e inhiben muchas de sus funciones: inhiben la producción de monocitos en la médula ósea, inhiben la expresión de antígenos de histocompatibilidad de clase II, bloquean la síntesis de numerosas citocinas inflamatorias (interleucina1 (IL-1) e interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral, etc.), disminuyen la producción de eicosanoides inflamatorios e inhiben la expresión de la NO-sintasa inducible.

El cortisol es digerido por la zona fasciculada de la corteza suprarrenal, una de las dos partes de la glándula suprarrenal. Esta liberación está controlada por el hipotálamo en respuesta al estrés o a un nivel bajo de glucocorticoides en la sangre. La secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) por parte del hipotálamo desencadena la secreción de la hipófisis de la hormona suprarrenal corticotropina (ACTH) o Adrenocorticotropica; esta hormona es transportada por la sangre hasta la corteza suprarrenal, en la cual desencadena la secreción de glucocorticoides.

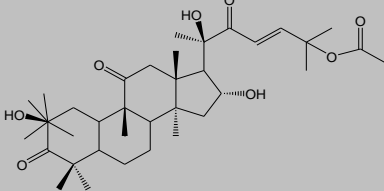
El cortisol se une a proteínas en el plasma sanguíneo, principalmente a la globulina fijadora de cortisol (CBG) y un 5% a la albúmina, el resto, entre el 10 y 15% se encuentra circulando libre. Cuando la concentración de cortisol alcanza niveles de 20-30 g/dL en la sangre, la CBG se encuentra saturada y los niveles de cortisol plasmáticos aumentan velozmente.

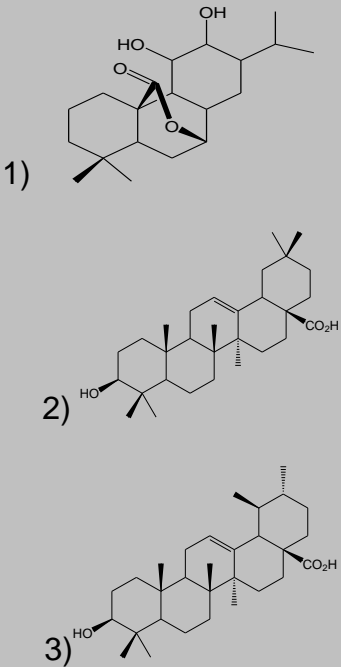
La vida media del cortisol es de 60 – 90 minutos, aunque tiende a aumentar con la administración de hidrocortisona, en el hipertiroidismo, la insuficiencia hepática o en situaciones de estrés.<sup>6</sup>

## 6. Plantas medicinales antiinflamatorias

Existen antecedentes de estudios que demuestran que las plantas tienen propiedades antiinflamatorias, además sobre estos mismos estudios se han realizado pruebas y evaluaciones (fitoquímica) en los cuales se han podido aislar los componentes que tienen estas propiedades. Como se describen algunos ejemplos en la tabla 2.

**Tabla 2.** Plantas con estudios antiinflamatorios

Nombre común	Nombre científico	Resultados	Estructura del principio aislado
<b>Sandía</b>	<i>Citrullus lanatus</i> .	Potencialmente útil gracias a la inhibición de ambas enzimas COX. <sup>14</sup>	 <p>Cucurbitacin E.</p>
<b>Cuajaleche</b>	<i>Galium mexicanum</i> Kunth	Se observa que la fracción de metanol ME 13-15 mostró una potente actividad anti-inflamatoria cuando se comparó con dexametasona. <sup>15</sup>	
	<i>Laennecia confusa</i> Nesom	Los extractos de hexano y de metanol muestran actividad anti-inflamatoria mediante la supresión de la secreción de interleucina-6. <sup>16</sup>	
<b>Toronjil</b>	<i>Agastache mexicana</i>	El extracto orgánico inhibió las respuestas del comportamiento en ambas fases de la prueba de la formalina al dolor, en que se observó un efecto más intenso en la fase inflamatoria que en la neurogénica. <sup>17</sup>	

<p><b>Salvia</b></p>	<p><i>Salvia officinalis</i></p>	<p>En la prueba de la formalina, redujo tanto la fase inflamatoria como la fase neurogénica.<sup>18</sup></p>	<p>Carnosol (1), Ácido oleanólico (2), Ácido ursólico (3).</p> 
<p><b>Chilacayote</b></p>	<p><i>Cucurbita ficifolia</i> Bouché</p>	<p>La fracción AP generó un aumento de la IL-10 que es un contra-inflamatorio de citoquinas. Los resultados sugieren que se puede utilizar como medicamento alternativo antiinflamatorio.<sup>19</sup></p>	

## 6.1 Descripción de la planta de espinosilla *Loeselia mexicana* (Lam.) Brandegee.

La planta de *Loeselia mexicana* es también conocida con los nombres de chuparrosa, espinosilla, gallina ciega, hierba de la virgen, etc.

### Descripción

Es una planta que mide de 50 a 80 cm de altura sus hojas son rígidas, más anchas en la parte de abajo y en la parte superior son puntiagudas, en sus bordes tiene diente-cillos con pequeñas espinas. Las flores son tubulosas y rojas, crecen en las axilas de las hojas. Los frutos son capsulas globosas de 2 a 5 semillas aladas.

Es una planta que crece desde Texas hasta Guatemala. Habita en climas desde cálidos, hasta semi-secos, entre los 80 y 39000 msnm. Planta silvestre que crece en terrenos de cultivo abandonados y está presente como maleza en el interior de bosques templados.

### **Usos.**

El uso medicinal que se le da a esta planta es para fiebres puerperales, este uso se extiende en la franja central del país que va de costa a costa.

Es empleada con mayor frecuencia para la fiebre, padecimiento que puede provenir de diferentes causas y se caracteriza por dolencia de cuerpo y cabeza, a causa de resfriado o gripe, o por temperatura en el estómago como suponen en Tlaxcala, o en consecuencia de fiebres puerperales.

Es también utilizada contra desórdenes de tipo digestivo como bilis, disentería, dolor de estómago, indigestión, inflamación de estómago, tifoidea, y vómito.

Así mismo se recurre a la espinosilla en enfermedades respiratorias tales como bronquitis, gripa, resfriados, ronquera y tos.

Sirve para evitar la caída de cabello, contra la caspa y el cabello graso. Se emplea además en padecimientos renales, contra cálculos e inflamación de riñón. Es útil para tratar dolor de cabeza e inflamación del abdomen.

Son las ramas con o sin flor, las partes de la planta más utilizadas, y su preparación en cocimiento, tomada o aplicada en lavados, es su forma de tratamiento más frecuentemente empleada; aunque también es usada en baños para después del parto, combinada junto con achanchlan.<sup>24</sup>

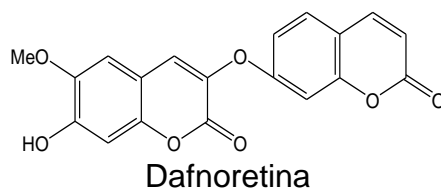
El cocimiento del follaje se utiliza para cálculos renales, inflamación del riñón, como diurética y depurativa de la sangre, como purgante y para casos de susto y mal de aire, vómito, venteados, bronquitis, ronquera y tos.<sup>25</sup>

La planta de la espinosilla cuenta ya con distintos estudios sobre sus propiedades debido a que es una planta común y se le han adjudicado diferentes propiedades.

## 6.2 Estudios relacionados con la espinosilla *Loeselia mexicana* (Lam.) Brandege

### Derivados de la cumarina de *Loeselia mexicana*. Determinación del efecto ansiolítico de Dafnoretina en el laberinto elevado en forma de cruz.

En este estudio se estableció que el extracto etanólico crudo y la dafnoretina pura obtenidos de esta planta mostraron efecto ansiolítico en ratones machos ICR sometidos al experimento del laberinto elevado en forma de cruz. Los diferentes tratamientos de dafnoretina no modificaron la actividad motora espontánea medida con el método de campo abierto. Este es el primer estudio que describe el efecto ansiolítico de la dafnoretina.<sup>20</sup>



### Estudio de las propiedades antidiarreicas de *Loeselia mexicana* en ratones y ratas.

En este estudio se evaluaron las propiedades antidiarreicas del extracto acuoso, del extracto en hexano, cloroformo y metanol de *Loeselia mexicana*, fueron estudiados usando ratones y ratas en modelos animales. Flavonas y sesquiterpenlactonas fueron detectados en el cribado químico del extracto acuoso. En el trabajo la diarrea fue inducida por aceite de ricino. En el caso del extracto de metanol la diarrea inducida por el aceite de ricino mostró una disminución en los ratones, mientras que el extracto acuoso también mostró un efecto sobre el aceite de ricino, además el extracto acuoso inhibe la defecación en ratones normales. Los resultados obtenidos muestran un alivio sintomático de la diarrea. Los resultados de la evaluación de los extractos de hexano y cloroformo no tuvieron ningún efecto sobre los animales en los modelos farmacológicos utilizados en este trabajo.<sup>21</sup>

### Actividad espasmolítica de algunas plantas usadas por los indígenas otomíes de Querétaro (México) para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.

Este estudio se realizó para investigar el efecto de los extractos de cloroformo-metanol (1:1) de *Baccharis berteropbylla* H.B K (Asteraceae), *Desmodium grahami* Gray (Leguminosae), *Dyssodia pinnata* var *pinnata* Rob. (Asteraceae), *Gentiana spathacea* H.B.K. (Gentianaceae), *Loeselia mexicana* Brand. (Polemoniaceae),



*Selaginella pallescens* primavera. (Selaginellaceae) y *Zornia diphylla* Pers. (Fabaceae) sobre las contracciones espontáneas de íleon aislado de rata. Las curvas de concentración-respuesta y el IC<sub>50</sub> dieron los valores y las potencias relajantes respectivamente, estas, las del cloroformo y el metanol (1:1) fueron comparadas contra el extracto de *Datura lanosa*. Los datos mostraron que todos los extractos producen una inhibición dependiente de la concentración contra las contracciones espontáneas del íleon. Además, fue probada la actividad antimicrobiana de los extractos frente a enterobacterias patógenas. Las acciones farmacológicas mostradas por los extractos de las especies seleccionadas tienden a apoyar etno-medicamente el uso de las plantas para el tratamiento de trastornos gastrointestinales.<sup>22</sup>

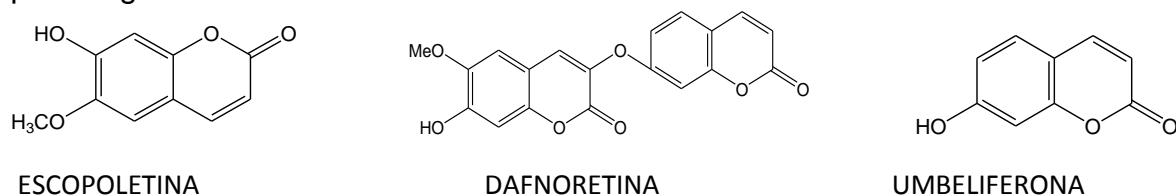
### Actividad anti-fúngica evaluada in-vitro de la cumarina extraída de *Loeselia mexicana*.

La bis-cumarina mejor conocida como dafnoretina y sus precursores monoméricos, como la escopoletina y umbelliferona se aislaron por primera vez a partir de la parte aérea de *Loeselia mexicana* Brand (una especie vegetal utilizada en la medicina tradicional mexicana), mismos que fueron purificados por técnicas cromatográficas. Las estructuras de estos compuestos se determinaron por análisis de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno y Carbono<sup>13</sup> (RMN-H<sup>1</sup> y C<sup>13</sup>). Estas cumarinas se probaron in vitro para evaluar su actividad anti-fúngica significativa.

Las aplicaciones tradicionales de la planta de *Loeselia mexicana* son; el tratamiento de, entre otras dolencias, enfermedades de la piel ocasionada por dermatofitos y la caspa con su principal agente causal *Malassezia furfur*. En estos trastornos, los hongos están implicados como agentes causales.

En el mencionado estudio se procedió a investigar las propiedades anti-fúngicas de dafnoretina, umbelliferone y escopoletina (fig. 1) que fueron aisladas de un extracto de diclorometano de la parte aérea de la *Loeselia mexicana* contra tres hongos miceliales y una levadura que son causantes de enfermedades infecciosas graves.

Los resultados del estudio indican que el extracto de *L. mexicana* en diclorometano posee considerables propiedades anti-fúngicas. Esto explica el uso de esta planta en la medicina popular para el tratamiento de diversas infecciones por hongos asociados a las enfermedades.<sup>23</sup>



**Figura 1.** Coumarinas aisladas de *Loeselia mexicana*.

## **7. Planteamiento del problema**

Con el correr de los tiempos se mejoró la tecnología y los procedimientos para la obtención y purificación de principios activos que ayudan en los padecimientos y en enfermedades para finalmente obtener fitofármacos.

Actualmente la planta de la Espinosilla carece de algún estudio que constate que dicha planta tiene algún efecto antiinflamatorio, de tal modo que al realizar este estudio se determinará si la planta tiene la propiedad antiinflamatoria que se le adjudica.

De tal manera que el objetivo del estudio en la planta *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand "Espinosilla", es conocer si el extracto acuoso de esta planta tiene propiedades antiinflamatorias utilizando modelos ya establecidos así como analizando marcadores presentes en la inflamación. Por lo que se plantearon los siguientes objetivos.

## **8. Objetivo general**

Se evaluó el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso de la planta *Loeselia mexicana* en un modelo in vivo en ratones macho CD 1

### **8.1 Objetivos específicos**

- 1.- Se valoró el efecto antiinflamatorio agudo del extracto acuoso de la planta de *Loeselia mexicana*
- 2.- Se evaluó el efecto antiinflamatorio crónico del extracto acuoso de la planta de *Loeselia mexicana*
- 3.- Se determinaron los mediadores de la inflamación en los modelos animales de: Ceruloplasmina, Nitritos y Peroxidación lipídica.
- 4.- Se estimó si el extracto empleado en el estudio tiene algún efecto sobre los órganos internos de los ratones.

## 9. Hipótesis

Al ser administrado por sonda intragástrica a un grupo de ratones distintas dosis del extracto acuoso de *Loeselia mexicana*, se observará una respuesta antiinflamatoria en el modelo de granuloma inducido por algodón-pellet.

Con el mismo extracto de *Loeselia mexicana* se tendrá un efecto antiinflamatorio utilizando en un modelo de edema inducido con carragenina en cojinete plantar de ratón.

## 10. Diseño experimental

**Tipo de estudio:** Experimental

**Población de estudio:** Se emplearon ratones CD1 machos (entre 25 y 35 g de peso corporal), los mismos fueron mantenidos a temperatura ambiente con libre acceso al agua y a los alimentos.

**Criterios de inclusión:** Ratones macho de entre 25 y 35 g de peso, con mes y medio de edad, sanos.

**Criterios de exclusión:** Ratones hembra y ratones que no cumplan con la edad peso y estado de salud adecuados para el experimento.

## 11. Variables

### 11.1 Variable independiente

Tratamiento

- Hidrocortisona (control positivo en el ensayo de inflamación crónica).
- Solución salina (control negativo).
- Extracto de “Espinosa” en dosis de 25, 50 y 100 mg/kg.
- Indometacina (control positivo en el ensayo de inflamación aguda).
- Carragenina tipo IV.

### 11.2 Variable dependiente

- El grosor de la pata al administrar las distintas dosis de medicamentos y el extracto.
- La concentración de nitritos, ceruloplasmina y además se estimó la concentración de especies reactivas de oxígeno.

## 12. Materiales

### 12.1 Material biológico

Para el desarrollo de este proyecto se emplearon 60 ratones CD1 machos (entre 25 y 35 g de peso corporal) mantenidos a temperatura ambiente con libre acceso a alimento y al agua. Los experimentos se realizaron siguiendo las especificaciones emitidas por el Comité de Ética local<sup>26</sup> para el cuidado y uso de animales de laboratorio con base en la norma NOM-062-ZOO-1999.

Se empleó suero de conejo anti-ceruloplasmina.

### 12.2 Material vegetal

Los 400 g de flores, hojas y follaje de la planta *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand fueron colectados en los alrededores del pueblo de San Juan Texcalpan, Municipio de Atlatlahuacán en el Estado de Morelos, en el mes de Noviembre del 2012. El espécimen fue identificado por la botánica Ma. Magdalena Ayala Hernández en el Herbario de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza y una muestra de esta planta se encuentra depositada en el mismo herbario con el número de inventario 13448 FEZA.

### 12.3 Reactivos utilizados:

- Indometacina (Indocid 25 mg, cápsulas)
- Hidrocortisona (Flebocortid 100 mg, solución inyectable)
- Solución salina (solución inyectable 0.9%)
- Carragenina tipo IV
- Agarosa al 1%
- Buffer Fosfato Salino (PBS)
- Azida de sodio
- Ácido tiobarbitúrico (TBA)
- Butil-hidroxi-tolueno (BHT)
- Ácido ortofosfórico
- Butanol
- Cadmio granular
- Ácido clorhídrico
- Sulfato de cobre al 5%
- Cloruro de amonio al 5% pH=9
- Sulfato de zinc

### 12.4 Material

- Sonda gástrica
- Placas Falcón
- Vasos de precipitado de 20, 50, 100 y 200 mL
- Matraz volumétrico de 1000 mL
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL

- Pipetas Pasteur
- Tubos Eppendorff
- Tubos de ensayo 13x100 mm y 12x75 mm (KIMAX).
- Matraz Erlenmeyer 4000 mL (KIMAX)

## 12.5 Equipos

- Centrífuga (Hamilton Bell)
- Vórtex (Scientific Industries, Inc. Modelo K-550G)
- Agitador mecánico de placa horizontal (Rocker plataform)
- Centrífuga (Hamilton Bell)
- Rotavapor (Yamato Rotary Evaporator RE300)
- Horno de microondas SAMSUNG modelo MW840WA

## 12.6 Instrumentos de medición

- Espectrofotómetro (Jenway 6305 UV/Vis)
- Micrómetro (Scala)
- Balanza granataria (OHAUS)
- Balanza granataria con canastilla (OHAUS)
- Balanza analítica (a-e ADAM)

## 13. Métodos

Se colectaron 400 g de la planta *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand en los alrededores del pueblo de San Juan Texcalpan, Municipio de Atlatlahuacan en el Estado de Morelos en el mes de noviembre, se dejó secar al medio ambiente en la oscuridad, posteriormente una vez seco, el follaje, hojas y flores se colocaron en una licuadora comercial y se molió, este producto se colocó en un matraz Erlenmeyer de 4000 mL al cual se le agregó agua y se mantuvo a temperatura ambiente y en la oscuridad por 48 hs con el fin de que se liberara el principio activo. Se filtró esta solución con alto vacío utilizando un filtro de poro cerrado, y el líquido obtenido fue el que se usó en el trabajo como extracto acuoso. Posteriormente el extracto obtenido fue evaporado a 50° C en un rotavapor al vacío con el fin de eliminar el agua de éste para obtener el principio activo sólido, una vez obtenido el extracto sólido se dejó secar en una estufa a 37° C por 24 hs. Con este extracto se realizaron los cálculos para preparar diferentes dosis de este producto como son de 25, 50 y 100 mg/Kg de peso corporal, así como la solución de hidrocortisona que fue el control positivo y la solución salina fue el control negativo.

Para la prueba de inflamación crónica se prepararon los pellets (pequeñas bolas de algodón comprimido) con un peso aproximado de 10 mg pesados en una

balanza analítica los cuales fueron colocados en una autoclave para su esterilización y para su posterior colocación en los ratones para el ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón pellet.

### **13.1 Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón-pellet.**

Se formaron 5 grupos de 6 ratones macho de entre 25 y 35 g de peso corporal a los cuales se les implantaron subcutáneamente en el dorso un algodón-pellet, los cuales han sido previamente esterilizados y pesados. Al grupo 1, que será conocido como control negativo se le administró por vía oral una dosis diaria de 0.2 mL de solución salina isotónica y una de hidrocortisona en la concentración de 15 mg/kg (dependiendo del peso corporal del ratón) al grupo 2 como control positivo, a los restantes tres grupos (3, 4, y 5) se les aplicó la solución problema de *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand en dosis de 25, 50, y 100 mg/kg respectivamente, mediante sonda intragástrica, las cuatro últimas dosis se les administró dependiendo del peso del animal en cuestión. La administración antes mencionada se mantuvo por un periodo de 10 días teniendo evaluaciones intermedias de peso con el fin de ajustar las dosis, al final de este periodo, el día once del ensayo se procedió a efectuar el sacrificio de los animales, el primer paso de este proceso consistió en anestésiar al animal en cámara de éter y se le realizó una incisión en el plexo axilar con el fin de colectar una muestra de sangre que fue guardada en un tubo Eppendorff, estas muestras de sangre fueron centrifugadas a 5000 rpm por un lapso de 5 minutos, con el fin de obtener el suero de estos ejemplares los cuales se conservaron en refrigeración para su subsiguiente análisis, posteriormente se sacrificó al animal y se extirparon y pesaron órganos como el corazón, bazo, riñones y el hígado, además se les extrajo el pellet, los cuales fueron colocados en orden en una placa de microtitulación para ser pesados después determinar el peso húmedo como el peso seco el cual se obtuvo después de colocar los pellets en una estufa de incubación a 37° C durante una semana para volverlos a pesar.

### **13.2 Ensayo de la inflamación aguda inducido con Carragenina en el cojinete plantar de la pata del ratón**

Se obtuvieron 30 ratones macho para este estudio, de 25 a 35 g de peso, estos se dividieron en 5 grupos de 6 ratones a estos ratones se les mantuvo en un ayuno de 16 horas pero con acceso libre de agua. A estos animales se les administró por vía oral, mediante la técnica de sonda gástrica las dosis de solución salina 0.2 mL al primer grupo, al grupo 2 se les administró aproximadamente 0.2 mL de

indometacina en una concentración de 10 mg/kg, este grupo funcionó como grupo de referencia, al tercer, cuarto y quinto grupo se les administró las dosis de 25, 50 y 100 mg/kg respectivamente del extracto de *Loeselia mexicana*.

Una hora después se les aplicó a los ratones una inyección de 50 µL de carragenina al 1% en el cojinete plantar de la pata izquierda trasera. El grosor de la pata se midió en los tiempos 0, 1, 2, 3, 4, y 5 horas después de la inyección de la carragenina, esta medida se tomó con la ayuda de un micrómetro, al terminar el estudio los ratones fueron sacrificados en cámara de éter.

Para calcular el porcentaje de inhibición de la inflamación se empleó la siguiente ecuación.

$$\% \text{ inhibición} = \frac{[(Ct - C0) \text{ control} - (Ct - C0) \text{ tratado}] \times 100}{(Ct - C0) \text{ control}}$$

En donde el Ct es el tamaño del cojinete plantar 3 horas después de la inyección y C0 es el tamaño del cojinete plantar inmediatamente después de la inyección con carragenina.<sup>27</sup>

### 13.3 Ceruloplasmina

#### Técnica para la determinación de la Ceruloplasmina.

La inmunodifusión radial simple utiliza geles de agarosa que contienen anticuerpos específicos y en los que se hacen pocillos. En cada uno se agregan las diluciones de un calibrador o suero de referencia y de las muestras problema. Después de 24 o 48 horas de incubación, los antígenos se difunden a su alrededor, diluyéndose al mismo tiempo, hasta alcanzar la denominada zona de equivalencia (proporción equivalente de antígeno y anticuerpo). En ese punto (que es un círculo) se forman los inmuno-complejos, que se detectan como un halo de precipitado. La concentración de antígeno se relaciona directamente con la medida del diámetro del anillo de precipitación, cuyo valor se interpola en una curva estándar construida con los valores de las concentraciones conocidas del calibrador.<sup>28</sup>

#### Procedimiento

6 tubos de ensaye de 13X100 mm fueron precalentados en un baño de temperatura constante a 45° C

## Preparación de las placas

Se preparó agarosa al 1% pesando 0.2 g de está y se colocó en 20 mL de PBS, se mantuvo a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente se le dieron tres ciclos de 10 min cada uno en el horno de microondas, hasta que se disolvió, una vez disuelto se procedió a agregar 1 mg de azida de sodio. Se adicionaron a los 6 tubos de ensaye 2 mL de agar, a estos tubos se les agregaron 150  $\mu$ L de suero de conejo de anti-ceruloplasmina, y se procedió a homogenizar en el vórtex. El contenido de cada tubo se vació en las cajas Falcón y se le permitió gelificar por cuatro minutos a temperatura ambiente. A cada círculo de las cajas Falcón se les realizaron cuatro orificios pequeños siguiendo el sentido de las manecillas del reloj para identificarlos y enumerarlos.

## Procesamiento de la muestra

Se colocaron 5  $\mu$ L del suero obtenido de los ratones en los orificios de la placa, los cuales fueron numerados de acuerdo a cada muestra, las placas se mantuvieron en refrigeración durante 48 h y posteriormente se les midió el halo de precipitación en milímetros de cada uno de los pozos y se obtuvieron la concentración de estos, se tomó como referencia una concentración de 21.6 mg/dL de ceruloplasmina con un halo de precipitación de 4 mm de diámetro.<sup>29</sup>

## 13.4 Análisis de nitritos

Principio del método.

El nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) siempre se reduce cuantitativamente a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) en presencia de cadmio (Cd). Este método emplea gránulos de Cd, disponible comercialmente, tratándolo con sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) y empacado en columna de vidrio. El  $\text{NO}_2^-$  producido se determinó entonces por diazotización de la Sulfanilamida acoplada con diclorhidrato de N-(1-naftil) etilendiamina para formar un azo compuesto altamente colorido que se midió espectrofotométricamente o colorimétricamente. Este método es aplicable en el intervalo de concentraciones entre 0.01 mg de  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$  a 1,0 mg de  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ . El método se recomienda especialmente para niveles de nitrato por debajo de 0,1 mg  $\text{N-NO}_3^-/\text{L}$ , donde otros métodos carecen de la sensibilidad adecuada.<sup>31</sup>



## Procedimiento

Reducción de  $\text{NO}_3^-$  a  $\text{NO}_2^-$  mediante el uso de Cadmio metálico

### ACTIVACIÓN DEL CADMIO

- 1) En 30 tubos de ensaye limpios de 13X100 mm se colocaron 0.5 g de cadmio metálico y se lavaron con ácido clorhídrico 0.1 N, esta operación se realizó en la campana de extracción.
- 2) El Cd se plateo con una solución acuosa de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 5% (2 mL), se agitó con un agitador mecánico de placa horizontal hasta que el cadmio se plateó, (aproximadamente 10 min).
- 3) A los 30 tubos se les efectuaron 3 lavados exhaustivos con el tubo lleno de  $\text{H}_2\text{O}$  destilada para eliminar el cobre.
- 4) Se volvió a lavar con ácido clorhídrico 0.1 N, mediante centrifugación a 3500 rpm durante 5 min.
- 5) Después se lavó el Cd con una solución de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 5% ajustando el pH a 9 con una disolución de Borato de sodio.

Se utilizó Sulfato de zinc ( $\text{ZnSO}_4$ ) para desproteínizar, se prepara la solución de  $\text{ZnSO}_4$  pesando 300 g/L o 30 g/dL.

Se preparó una solución de estándar de Nitrito de sodio de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### Preparación de reactivos

- Solución acuosa de ácido acético al 15% (v/v)
- Reactivo de sulfanilamida

Se disolvieron 0.5 g de sulfanilamida en 150 mL en una disolución de ácido acético al 15%. Se protegió de la luz y se guardó en refrigeración.

### Reactivo de NED

Se disolvieron 0.2 g de di-clorhidrato de N-(1-nafto) diaminoetileno en 150 mL de ácido acético al 15%. Se etiquetó y guardó en un frasco protegiéndolo de la luz.

### Protocolo

- Se tomaron 100  $\mu\text{L}$  de suero de ratón y se le agregaron 300  $\mu\text{L}$  de agua bi-distilada, se agitó. Posteriormente se tomó una alícuota de 20  $\mu\text{L}$  de esta solución.
- A esta alícuota se le adicionaron 20  $\mu\text{L}$  de una disolución que contenía  $\text{ZnSO}_4$  y se mezcló bien, el precipitado que se formó se debe separar por centrifugación a 10000 rpm por 5 min.

- Se tomó un tubo con Cd activado y se le desechó el  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se le adicionó al tubo todo el sobrenadante de la muestra que contiene el suero y se taparon, se dejaron en agitación en un agitador mecánico de placa horizontal durante 15 min, se centrifugaron los tubos a 3000 rpm por un lapso de 5 min y de este se tomaron 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante para el análisis.
- Se determinó la concentración de nitritos en el suero problema y se reportaron los resultados con la utilización de la curva estándar de nitrito de sodio (tabla 3).<sup>30</sup>

<b>CURVA ESTANDAR DE NITRITOS</b>			
<b>TUBO</b>	<b>ESTANDAR (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>AGUA DESTILADA (<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>RESULTADO</b>
<b>1</b>	0	900	0.100
<b>2</b>	100	800	0.195
<b>3</b>	200	700	0.267
<b>4</b>	300	600	0.378
<b>5</b>	400	500	0.492
<b>6</b>	500	400	0.607
<b>Muestra</b>	200	700	-

**Tabla 3.** Se observa la curva realizada para evaluar la cantidad de nitritos observada en el suero de los ratones.

### **13.5. Peroxidación lipídica**

#### **Procesamiento del suero de ratón**

De las muestras obtenidas del suero de los ratones se tomaron 100  $\mu\text{L}$  del suero de cada uno de los ratones y se colocaron en tubos Eppendorf, cada muestra se diluyó con 400  $\mu\text{L}$  de PBS. Se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de BHT 12.6 nM y 400  $\mu\text{L}$  de ácido ortofosfórico 0.2 M. Esta solución se mezcló en un vórtex durante 10 seg. y posteriormente se le adicionaron 50  $\mu\text{L}$  de TBA 0.11 M y se volvió a homogenizar en el vórtex.

#### **Desarrollo del color**

- Se colocó la mezcla de reacción en un baño de agua a 90° C durante un periodo de 15 min, los tubos se taparon con papel aluminio
- Se enfriaron en baño de hielo
- Se agregaron 1000  $\mu\text{L}$  de n-butanol y 100  $\mu\text{L}$  de una disolución de Cloruro de sodio.

- Se agitó vigorosamente en vórtex por un periodo de 30 seg. y se centrifugó a 5000 rpm durante 5 min.
- Posteriormente se transfirieron 500 µL de la fase de n-butanol a una celda, y se tomó la lectura a 535 nm y a 572 nm para corregir la absorbancia.
- Se tuvo que construir una curva estándar de MDA (Tabla 4), para así obtener las concentraciones de este y reportar la peroxidación lipídica en suero de ratón.
- Los resultados se obtuvieron en mmoles/L. <sup>32</sup>

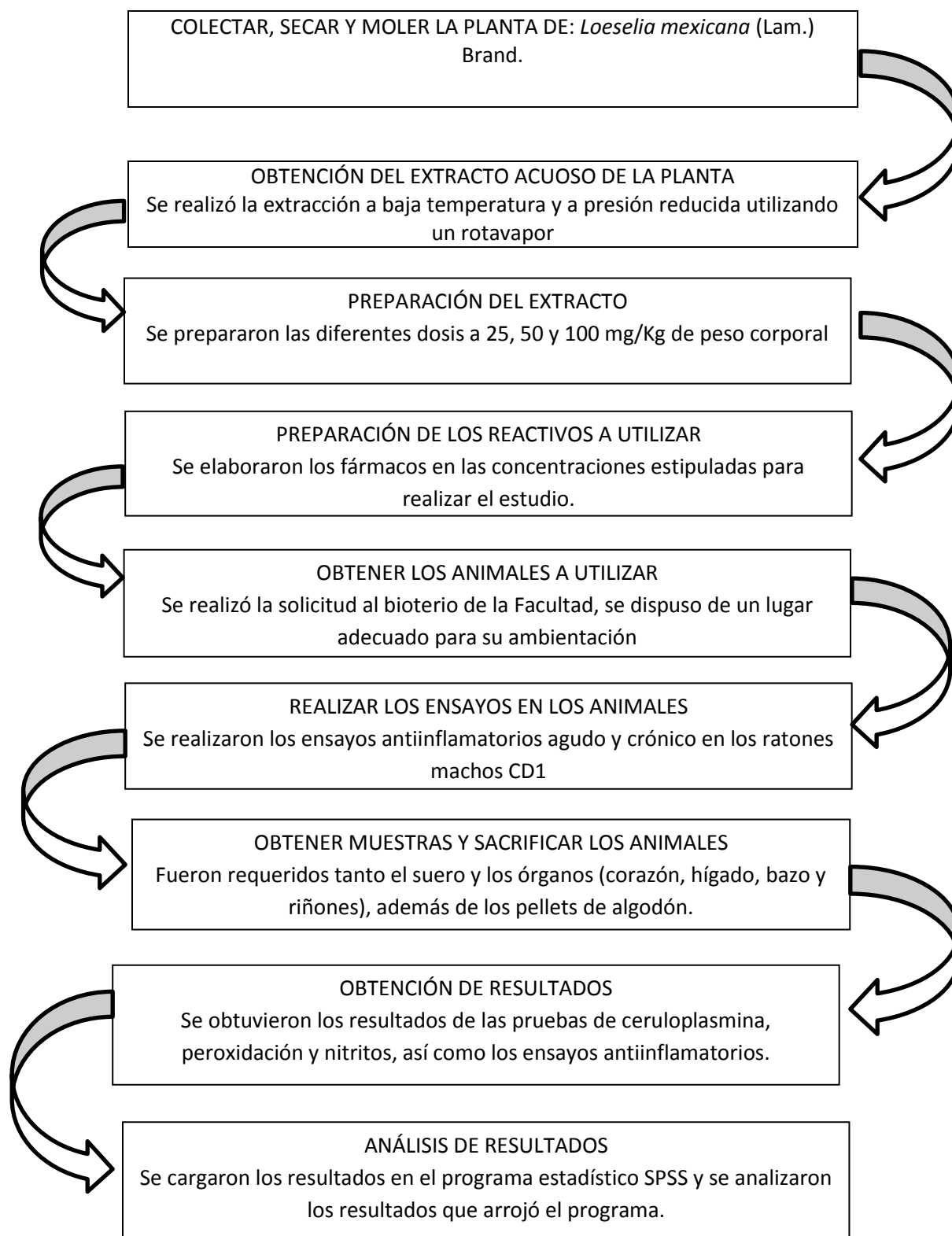
<b>CURVA ESTÁNDAR DE MDA</b>					
<b>TUBOS</b>	MDA (µmol/L)	TMP (µL)	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (µL)	TBA (µL)	AGUA (µL)
<b>Blanco</b>	0	0	600	200	200
<b>1</b>	0.2	5	600	200	195
<b>2</b>	0.4	10	600	200	190
<b>3</b>	0.8	20	600	200	180
<b>4</b>	1.2	30	600	200	170

**Tabla 4.** Curva empleada para obtener las concentraciones de peroxidación en el suero de los ratones.

## 14. Diseño estadístico

Se realizó un análisis estadístico que consiste en una comparación de medias utilizando el análisis de varianza ANOVA de un factor.

## 15. Diagrama de flujo



## 16. Resultados

Se observaran los resultados obtenidos en el ensayo de inflamación aguda y crónica, en el caso de la inflamación aguda se tomaron en cuenta los resultados obtenidos a las tres horas, debido a que el pico máximo del efecto de la indometacina que es el control positivo es a las tres horas de administrado el fármaco, por lo cual este es el tiempo de referencia.

### 16.1 Respuesta de la inflamación aguda

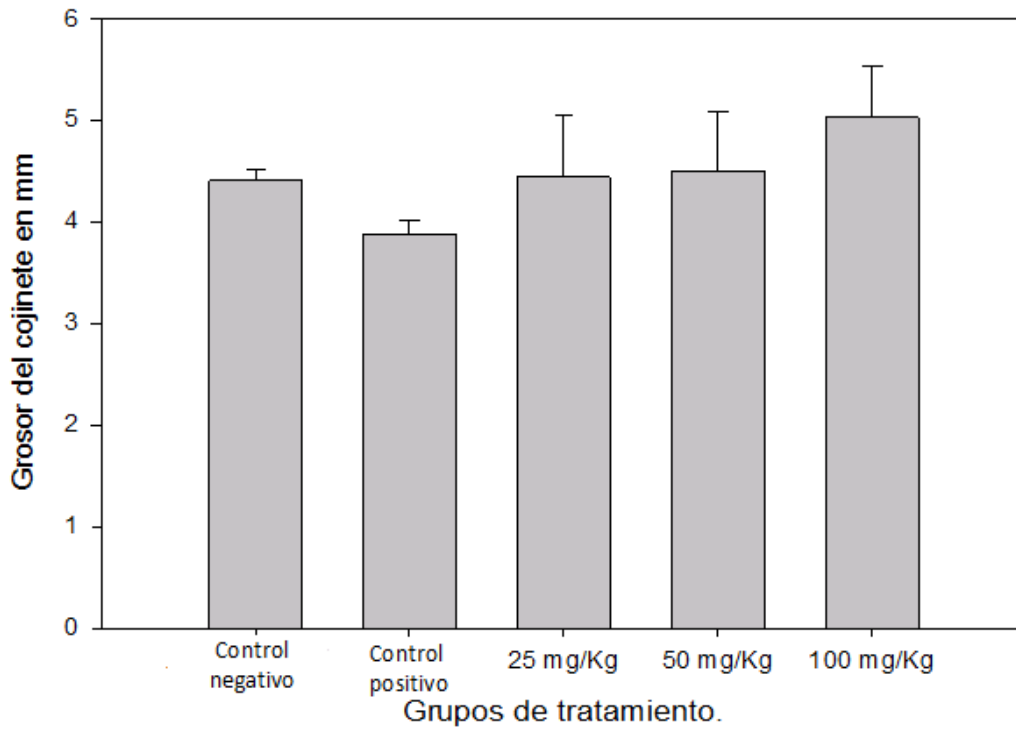
En la tabla 5 se pueden observar los porcentajes de inhibición de la inflamación que fue inducida por la carragenina en la pata de los ratones, del ensayo anti-inflamatorio agudo.

**Tabla 5.** Porcentajes de inhibición de los diferentes grupos tratados con *Loeselia mexicana*.

Grupo	Dosis mg/Kg	Porcentaje de inhibición
Solución salina	-	-
Indometacina	<b>10</b>	<b>24.3%</b>
<i>Loeselia mexicana</i>	<b>25</b>	<b>-1.8%</b>
<i>Loeselia mexicana</i>	<b>50</b>	<b>-0.92%</b>
<i>Loeselia mexicana</i>	<b>100</b>	<b>-4.3%</b>

En la gráfica 1 de grupos de tratamiento contra el grosor del cojinete plantar medido en milímetros se observa el efecto de la indometacina tres horas después de su administración, en esta hora es cuando se observa el efecto máximo del fármaco. Por otro lado, se observa que las dosis del extracto a sus concentraciones de 25, 50 y 100 mg/Kg de la espinosilla favorecen la inflamación ya que en este tiempo la inflamación supera incluso a la administración de la solución salina.

### Tamaño de la pata a las 3 horas.



**Gráfica 1.** Comportamiento de la inflamación en las patas de los ratones 3 horas después de la administración, donde se observa una evidente significancia entre la indometacina (control positivo) vs solución salina (control negativo), del mismo modo se aprecia una gran significancia entre el control positivo (indometacina) vs 100 mg del extracto de *Loeselia mexicana*. (Ver tabla de comparativos anexo A y análisis de varianza de ANOVA anexo B).

### 16.2 Respuesta de la inflamación crónica

Se realizaron varios estudios estadísticos con el fin de identificar cuáles eran los valores con mayor significancia, y de este modo enfocar los estudios y el análisis sobre estos, se tomó en cuenta el tamaño de los órganos de los ratones los cuales fueron pesados una vez que se realizó el sacrificio y tomando en cuenta el peso del ratón se obtuvo el porcentaje del peso del órgano, lo cual se apreció como el índice de cada órgano para observar de este modo si existe una significancia a evaluar en estos resultados.

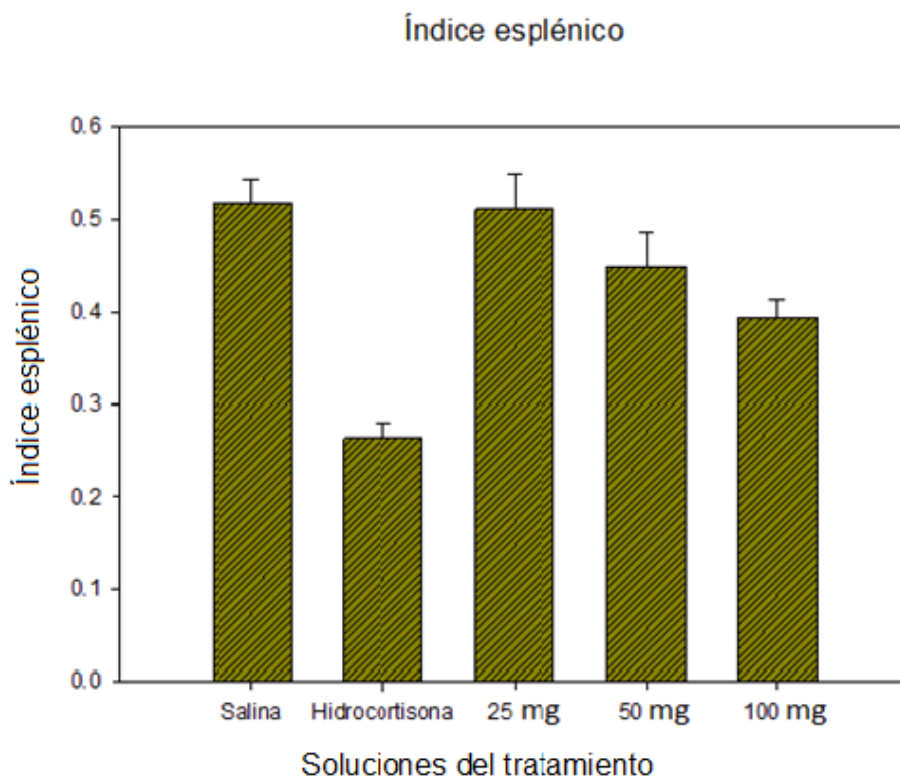
Como se puede apreciar en la tabla 6 los valores que son de mayor importancia en el estudio son los del índice esplénico, peso seco, ceruloplasmina y peroxidación lipídica, ya que estos son los que presentan significancia estadística en este estudio.

**Tabla 6.** ANOVA de los estudios realizados en inflamación crónica

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Índice cardíaco	Inter-grupos	0.040	4	0.010	1.568	0.214
	Intra-grupos	0.159	25	0.006		
	Total	0.199	29			
Índice hepático	Inter-grupos	1.206	4	0.301	0.894	0.482
	Intra-grupos	8.434	25	0.337		
	Total	9.639	29			
Índice renal	Inter-grupos	0.034	4	0.009	0.540	0.708
	Intra-grupos	0.396	25	0.016		
	Total	0.430	29			
Índice esplénico	Inter-grupos	0.262	4	0.066	12.618	0.000
	Intra-grupos	0.130	25	0.005		
	Total	0.393	29			
Peso húmedo en mg	Inter-grupos	1414.511	4	353.628	1.510	0.230
	Intra-grupos	5855.723	25	234.229		
	Total	7270.235	29			
Peso seco en mg	Inter-grupos	142.667	4	35.667	3.801	0.015
	Intra-grupos	234.595	25	9.384		
	Total	377.262	29			
ceruloplasmina mg/dL	Inter-grupos	2027.592	4	506.898	17.155	0.000
	Intra-grupos	738.720	25	29.549		
	Total	2766.312	29			
Peroxidación	Inter-grupos	0.002	4	0.001	5.398	0.003
	Intra-grupos	0.002	25	0.000		
	Total	0.004	29			
Nitritos	Inter-grupos	0.113	4	0.028	1.732	0.175
	Intra-grupos	0.409	25	0.016		
	Total	0.523	29			

### 16.2.1 Índice esplénico

La gráfica 2 nos indica el comportamiento del índice esplénico, el cual se aprecia con una significancia en la tabla 6 de ANOVA.



**Gráfica 2.** Valores del índice esplénico en el que se observa la media  $\pm$  el error estándar de los grupos control como los del extracto (Ver tabla de comparativos anexo C).

En los datos de la tabla 7 se observan valores significativos como lo son los de hidrocortisona con salina y en las concentraciones de 25, 50 y 100 mg del extracto, este comportamiento se podrían explicar debido a que el fármaco de hidrocortisona suprime la serie linfóide, con lo cual se observa un tamaño del bazo reducido.

**Tabla 7.** Descriptivo del índice esplénico en el que se observa una diferencia significativa entre los grupos de **hidrocortisona VS la solución salina**, y las de **25 mg, 50 mg y 100 mg/kg** del extracto de Espinosilla. Además que también hay una significancia entre la **solución salina VS la solución de 100 mg/kg** del extracto.



## Comparaciones múltiples

Índice esplénico

HSD de Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Solución salina	Hidrocortisona	0.2545667 <sup>*</sup>	0.0416369	0.000	0.132284	0.376849
	25 mg de extracto	0.0065500	0.0416369	1.000	-0.115732	0.128832
	50 mg de extracto	0.0698333	0.0416369	0.465	-0.052449	0.192116
	100 mg de extracto	0.1246833 <sup>*</sup>	0.0416369	0.044	0.002401	0.246966
Hidrocortisona	Solución salina	-0.2545667 <sup>*</sup>	0.0416369	0.000	-0.376849	-0.132284
	25 mg de extracto	-0.2480167 <sup>*</sup>	0.0416369	0.000	-0.370299	-0.125734
	50 mg de extracto	-0.1847333 <sup>*</sup>	0.0416369	0.001	-0.307016	-0.062451
	100mg de extracto	-0.1298833 <sup>*</sup>	0.0416369	0.033	-0.252166	-0.007601
25 mg de extracto	Solución salina	-0.0065500	0.0416369	1.000	-0.128832	0.115732
	Hidrocortisona	0.2480167 <sup>*</sup>	0.0416369	0.000	0.125734	0.370299
	50 mg de extracto	0.0632833	0.0416369	0.560	-0.058999	0.185566
	100 mg de extracto	0.1181333	0.0416369	0.062	-0.004149	0.240416
50 mg de extracto	solución salina	-0.0698333	0.0416369	0.465	-0.192116	0.052449
	Hidrocortisona	0.1847333 <sup>*</sup>	0.0416369	0.001	0.062451	0.307016
	25 mg de extracto	-0.0632833	0.0416369	0.560	-0.185566	0.058999
	100 mg de extracto	0.0548500	0.0416369	0.683	-0.067432	0.177132
100 mg de extracto	solución salina	-0.1246833 <sup>*</sup>	0.0416369	0.044	-0.246966	-0.002401
	Hidrocortisona	0.1298833 <sup>*</sup>	0.0416369	0.033	0.007601	0.252166
	25 mg de extracto	-0.1181333	0.0416369	0.062	-0.240416	0.004149
	50 mg de extracto	-0.0548500	0.0416369	0.683	-0.177132	0.067432

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

En la tabla 8 se observan tres distintos niveles de las medias del peso del órgano (bazo), esto debido a que el peso tienen gran divergencia entre las dosis administradas, como se puede suponer el valor del bazo de los ratones que tratamos con hidrocortisona es de menor tamaño puesto que el fármaco tiene efecto sobre este órgano, por lo cual se encuentra en un solo nivel, todas las dosis del extracto las podemos observar en el segundo nivel, ya que en estos casos el tamaño del bazo se mantuvo en un tamaño parecido, por último se observa que en

el tercer nivel están los ratones con tratamiento de 50 y 25 mg/kg, además se encuentra la solución salina por lo que podemos suponer que por ser las dosis bajas y control no se ve un cambio significativo en el tamaño del bazo, a lo que podemos concluir que a dosis altas de la solución del extracto de 100 mg/kg de Espinosilla se tendría un efecto parecido al de la hidrocortisona con una reducción en el tamaño del bazo.

**Tabla 8.** Subconjuntos homogéneos que nos permite evaluar los distintos niveles en los que se dividieron las medias del índice esplénico

HSD de Tukey<sup>a</sup>

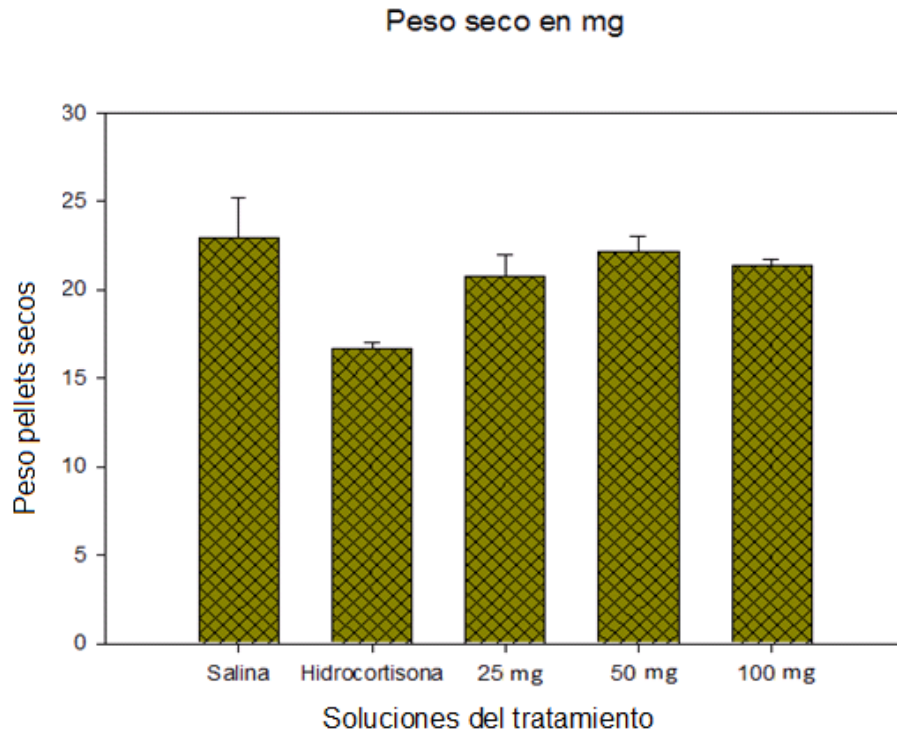
Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Hidrocortisona	6	0.263933		
100 mg de extracto	6		0.393817	
50 mg de extracto	6		0.448667	0.448667
25 mg de extracto	6		0.511950	0.511950
Solución salina	6			0.518500
Sig.		1.000	0.062	0.465

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

### 16.2.2 Modelo de granuloma inducido por algodón-pellet. (Peso seco)

Si tomamos como base que contamos con un control positivo (hidrocortisona), y uno negativo (solución salina), entenderemos que el control positivo inhibe la formación de un contenido fibrogranuloso, de este modo si el extracto funciona como antiinflamatorio tendrá como resultado que la formación del contenido fibrogranuloso será similar o menor que el que se forma con la solución de hidrocortisona, de lo contrario, los efectos serán similares a los de la solución salina, formando la misma cantidad de contenido fibrogranuloso o uno similar a éste.



**Gráfica 3.** Peso de pellets secos que fueron extraídos de los ratones, secados y posteriormente pesados, los valores son de la media  $\pm$  error estándar.

En la tabla 9 se observa que la solución de hidrocortisona tiene una media más baja que los demás tratamientos, por lo tanto el contenido fibrogranuloso es menor, con lo que se puede observar que el control positivo si ejerció su labor que es la inhibir la formación de este último. Del mismo modo el control negativo tiene el mayor peso de las medias de todas las soluciones, con lo que se aprecia que este también realizó la función para de este modo obtener un comparativo. Aunque las medias de los extractos de 25, 50 y 100 mg/kg del extracto de espinosilla son menores que las del control negativo estos valores están en un margen muy estrecho como para adjudicarle algún efecto antiinflamatorio.

**Tabla 9.** Valores de la media, desviación estándar y el error típico usado para la realización de la gráfica 3.

**Descriptivos**

**Peso seco en mg**

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
<b>solución salina</b>	6	22.9167	5.61548	2.29251	17.0236	28.8098	17.40	30.30
<b>Hidrocortisona</b>	6	16.6500	1.00349	0.40967	15.5969	17.7031	15.30	18.00
<b>25 mg de extracto</b>	6	20.7833	2.88126	1.17627	17.7596	23.8070	17.70	24.60
<b>50 mg de extracto</b>	6	22.1333	2.30188	0.93974	19.7177	24.5490	18.90	25.30
<b>100 mg de extracto</b>	6	21.3500	0.88204	0.36009	20.4244	22.2756	20.40	23.00
<b>Total</b>	30	20.7667	3.60680	0.65851	19.4199	22.1135	15.30	30.30

Se observa que en la tabla 10 la diferencia más importante en cuanto al peso seco de los pellets de algodón se presenta entre los grupos a los que se les administró la hidrocortisona contra los ratones que recibieron la dosis de solución salina, este comportamiento suena lógico desde el punto de vista de que el primer grupo es el control positivo, con lo cual debemos de obtener el menor peso, y el segundo que es nuestro control negativo, siendo este el que va a tener el mayor peso puesto que no debe de generar ningún efecto antiinflamatorio. Siguiendo los resultados que arroja la tabla 10 observamos que la hidrocortisona tiene también una significancia importante entre los extractos de 50 y 100 mg/Kg de espinosilla, siendo estos dos últimos muy próximos a la solución salina, lo que da como resultado que estas concentraciones del extracto no tienen ningún efecto como antiinflamatorio.

**Tabla 10.** Descriptivo del peso seco, en el que se observa una diferencia significativa entre los grupos de **hidrocortisona VS la solución salina, la de 50 y la de 100 mg/kg** del extracto de espinosilla.

### Comparaciones múltiples

peso seco en mg

HSD de Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Solución salina	Hidrocortisona	6.26667 <sup>*</sup>	1.76860	0.013	1.0725	11.4608
	25 mg de extracto	2.13333	1.76860	0.748	-3.0608	7.3275
	50 mg de extracto	0.78333	1.76860	0.992	-4.4108	5.9775
	100 mg de extracto	1.56667	1.76860	0.899	-3.6275	6.7608
Hidrocortisona	Solución salina	-6.26667 <sup>*</sup>	1.76860	0.013	-11.4608	-1.0725
	25 mg de extracto	-4.13333	1.76860	0.167	-9.3275	1.0608
	50 mg de extracto	-5.48333 <sup>*</sup>	1.76860	0.035	-10.6775	-0.2892
	100 mg de extracto	-4.70000	1.76860	0.090	-9.8941	0.4941
25 mg de extracto	Solución salina	-2.13333	1.76860	0.748	-7.3275	3.0608
	Hidrocortisona	4.13333	1.76860	0.167	-1.0608	9.3275
	50 mg de extracto	-1.35000	1.76860	0.939	-6.5441	3.8441
	100 mg de extracto	-0.56667	1.76860	0.998	-5.7608	4.6275
50 mg de extracto	Solución salina	-0.78333	1.76860	0.992	-5.9775	4.4108
	Hidrocortisona	5.48333 <sup>*</sup>	1.76860	0.035	0.2892	10.6775
	25 mg de extracto	1.35000	1.76860	0.939	-3.8441	6.5441
	100 mg de extracto	0.78333	1.76860	0.992	-4.4108	5.9775
100 mg de extracto	Solución salina	-1.56667	1.76860	0.899	-6.7608	3.6275
	Hidrocortisona	4.70000	1.76860	0.090	-0.4941	9.8941
	25 mg de extracto	0.56667	1.76860	0.998	-4.6275	5.7608
	50 mg de extracto	-0.78333	1.76860	0.992	-5.9775	4.4108

En la tabla 11 puede apreciarse que los valores agrupados en el nivel 1 son los de hidrocortisona, 25 mg y 100 mg/kg del extracto los cuales son los que tienen el menor peso, en el nivel 2 se van a agrupar aquellas que alcanzaron un nivel de contenido granulomatoso mayor en los pellets.

**Tabla 11. Valor promedio de las medias obtenidas de los pellets secos divididos niveles.**

**Subconjuntos homogéneos  
peso seco en mg**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Hidrocortisona	6	16.6500	
25 mg de extracto	6	20.7833	20.7833
100 mg de extracto	6	21.3500	21.3500
50 mg de extracto	6		22.1333
Solución salina	6		22.9167
Sig.		0.090	0.748

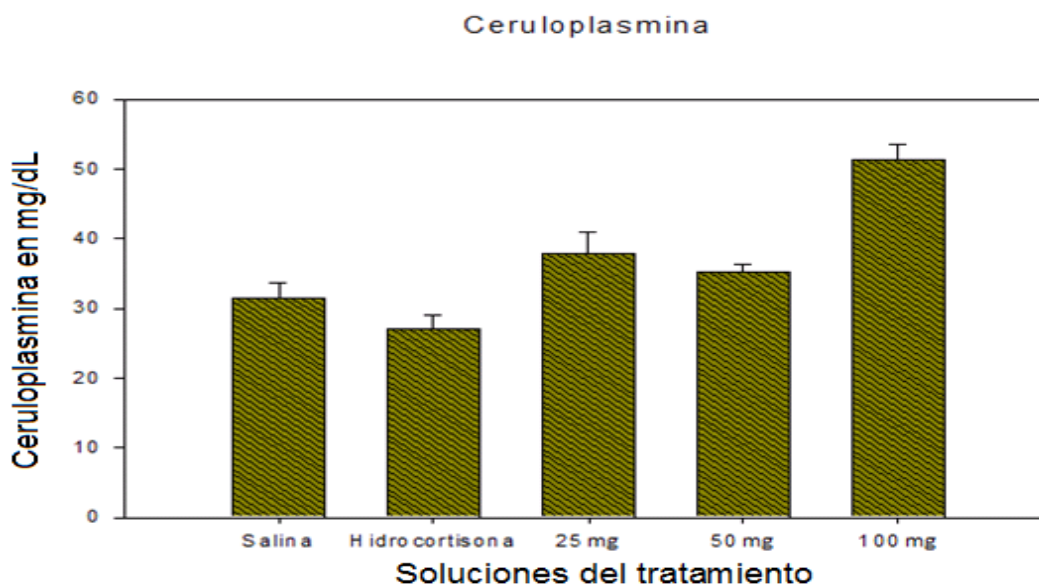
Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

### 16.2.3 Ceruloplasmina

Es importante tomar en cuenta que la ceruloplasmina se ve incrementada en los procesos inflamatorios. De tal manera, si se analiza la **gráfica 4** se observa que la hidrocortisona (control positivo) si ejerció su función antiinflamatoria puesto que el valor de su media de ceruloplasmina es el menor a todas las medias. Sin embargo, se aprecia a su vez que el control negativo (solución salina) se vio superado por las concentraciones de 25, 50 y 100 mg/Kg del extracto de espinosilla, con lo que se puede asumir que el extracto contrariamente a lo que se presume carece de algún efecto antiinflamatorio ya que se observa que favorece a la inflamación puesto que los valores de las medias del extracto en todos los casos supera por amplio rango a la solución salina.

En la **tabla 13** se aprecia que los valores de las medias se agrupan en 3 distintos niveles. En el nivel 1 se advierte que se encuentra la hidrocortisona que como se observa en la **gráfica 4**, esta era la media de menor tamaño, por semejanza en los pesos la solución salina, y las concentraciones de 50 y 25 mg/Kg del extracto se encuentran en el segundo nivel, y por último, en el tercer nivel se observa el extracto con concentración de 100mg/Kg, demostrando así que este último muestra un incremento muy amplio con respecto a las medias restantes, notando así que a mayor concentración del extracto de espinosilla observaremos un incremento en la inflamación.



**Gráfica 4.** Valores de ceruloplasmina donde se evaluó la media  $\pm$  el error estándar. Concentración de ceruloplasmina VS el tratamiento. (Ver los valores descriptivos en anexo D).

**Tabla 12.** Comparaciones múltiples de ceruloplasmina, en el que se observa una diferencia significativa entre los grupos de **hidrocortisona VS la solución salina**, y la de **25 mg** y la de **100 mg/kg** del extracto de espinosilla.

Ceruloplasmina mg/dL      HSD de Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Solución salina	Hidrocortisona	4.50000	3.13841	0.613	-4.7171	13.7171
	25 mg de extracto	-6.30000	3.13841	0.292	-15.5171	2.9171
	50 mg de extracto	-3.60000	3.13841	0.780	-12.8171	5.6171
	100 mg de extracto	-19.80000	3.13841	0.000	-29.0171	-10.5829
Hidrocortisona	Solución salina	-4.50000	3.13841	0.613	-13.7171	4.7171
	25 mg de extracto	-10.80000	3.13841	0.016	-20.0171	-1.5829
	50 mg de extracto	-8.10000	3.13841	0.105	-17.3171	1.1171
	100 mg de extracto	-24.30000	3.13841	0.000	-33.5171	-15.0829
25 mg de extracto	Solución salina	6.30000	3.13841	0.292	-2.9171	15.5171
	Hidrocortisona	10.80000	3.13841	0.016	1.5829	20.0171
	50 mg de extracto	2.70000	3.13841	0.909	-6.5171	11.9171
	100 mg de extracto	-13.50000	3.13841	0.002	-22.7171	-4.2829
50 mg de extracto	Solución salina	3.60000	3.13841	0.780	-5.6171	12.8171
	Hidrocortisona	8.10000	3.13841	0.105	-1.1171	17.3171
	25 mg de extracto	-2.70000	3.13841	0.909	-11.9171	6.5171
	100 mg de extracto	-16.20000	3.13841	0.000	-25.4171	-6.9829
100 mg de extracto	Solución salina	19.80000	3.13841	0.000	10.5829	29.0171
	Hidrocortisona	24.30000	3.13841	0.000	15.0829	33.5171
	25 mg de extracto	13.50000	3.13841	0.002	4.2829	22.7171
	50 mg de extracto	16.20000	3.13841	0.000	6.9829	25.4171

**Tabla 13.** Valores promedio obtenidos de las medias de ceruloplasmina.  
Subconjuntos homogéneos

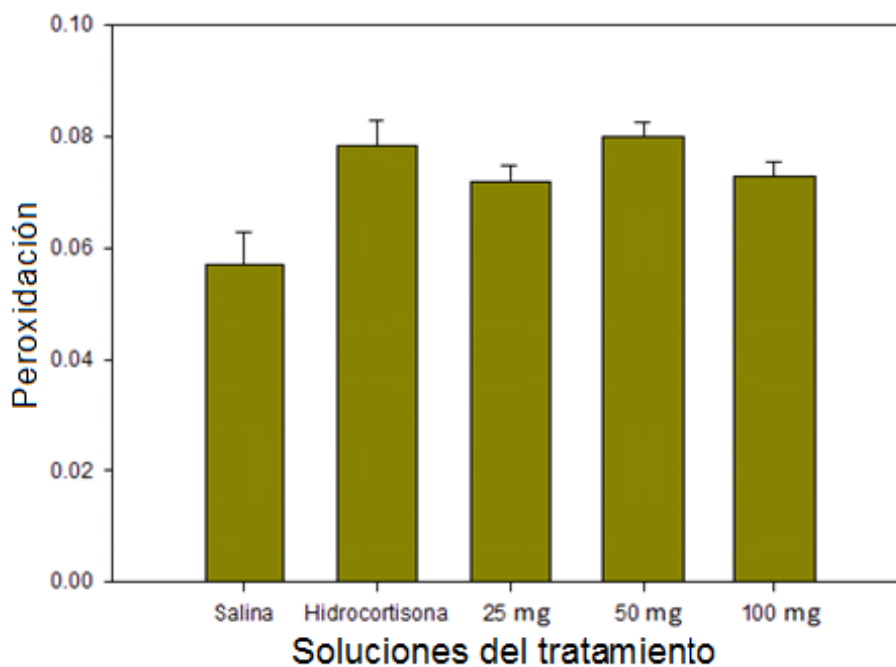
**ceruloplasmina mg/dL**

HSD de Tukey<sup>a</sup>

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Hidrocortisona	6	27.0000		
Solución salina	6	31.5000	31.5000	
50 mg de extracto	6	35.1000	35.1000	
25 mg de extracto	6		37.8000	
100 mg de extracto	6			51.3000
Sig.		0.105	0.292	1.000

**16.2.4 Peroxidación lipídica**

**Peroxidación**



**Gráfica 5.** Medias de peroxidación donde se evaluó la media  $\pm$  el error estándar. Concentración de la peroxidación VS el tratamiento. (Ver la tabla descriptivos de la gráfica 5, en anexo E).



**Tabla 14.** Descriptivo de peroxidación, en el que se observa una diferencia significativa entre los grupos de **hidrocortisona VS la solución salina**, y la de **solución salina VS 50 mg/kg** del extracto de Espinosilla.

**Comparaciones múltiples**

Peroxidación lipídica

HSD de Tukey

(I) tratamiento	(J) tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
Solución salina	Hidrocortisona	-0.0215000 <sup>*</sup>	0.0055665	0.006	-0.037848	-0.005152
	25 mg de extracto	-0.0148333	0.0055665	0.089	-0.031181	0.001515
	50 mg de extracto	-0.0231667 <sup>*</sup>	0.0055665	0.003	-0.039515	-0.006819
	100 mg de extracto	-0.0157333	0.0055665	0.063	-0.032081	0.000615
Hidrocortisona	Solución salina	0.0215000	0.0055665	0.006	0.005152	0.037848
	25 mg de extracto	0.0066667	0.0055665	0.753	-0.009681	0.023015
	50 mg de extracto	-0.0016667	0.0055665	0.998	-0.018015	0.014681
	100 mg de extracto	0.0057667	0.0055665	0.836	-0.010581	0.022115
25 mg de extracto	solución salina	0.0148333	0.0055665	0.089	-0.001515	0.031181
	Hidrocortisona	-0.0066667	0.0055665	0.753	-0.023015	0.009681
	50 mg de extracto	-0.0083333	0.0055665	0.574	-0.024681	0.008015
	100 mg de extracto	-0.0009000	0.0055665	1.000	-0.017248	0.015448
50 mg de extracto	Solución salina	0.0231667 <sup>*</sup>	0.0055665	0.003	0.006819	0.039515
	Hidrocortisona	0.0016667	0.0055665	0.998	-0.014681	0.018015
	25 mg de extracto	0.0083333	0.0055665	0.574	-0.008015	0.024681
	100 mg de extracto	0.0074333	0.0055665	0.672	-0.008915	0.023781
100 mg de extracto	Solución salina	0.0157333	0.0055665	0.063	-0.000615	0.032081
	Hidrocortisona	-0.0057667	0.0055665	0.836	-0.022115	0.010581
	25 mg de extracto	0.0009000	0.0055665	1.000	-0.015448	0.017248
	50 mg de extracto	-0.0074333	0.0055665	0.672	-0.023781	0.008915

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

**Tabla 15.** Valores de media promedio obtenidos de la peroxidación.

**Subconjuntos homogéneos**

**Peroxidación**

HSD de Tukey

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Solución salina	6	0.057000	
25 mg de extracto	6	0.071833	0.071833
100 mg de extracto	6	0.072733	0.072733
Hidrocortisona	6		0.078500
50 mg de extracto	6		0.080167
Sig.		0.063	0.574

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.  
 a. Usa el tamaño muestral de la media armónica = 6.000.

Es conocido que un incremento en la peroxidación lipídica es consecuencia de un incremento a su vez de radicales libres, y que son estos los que generan un daño sobre la membrana lipídica de las células con su consecuente destrucción (muerte celular), lo que los datos anteriores nos describen es que al administrarles solución salina al grupo de ratones no se fomenta un aumento considerable de peroxidación lo que no trae consigo ningún daño sobre los ratones en estudio.

Al administrar hidrocortisona al grupo 2 de nuestro experimento notamos que este fármaco genera un notable incremento de radicales libres con su consecuente aumento de peroxidación generando un daño celular.

Si tomamos estos datos como antecedentes podemos notar que en la **tabla 15** los grupos están acomodados en dos distintos niveles por su semejanza, la hidrocortisona está colocada en el nivel 2 por su número elevado, acompañada por las concentraciones de los extractos 25, y 100 mg/kg de la Espinosilla que no superan los valores de la hidrocortisona, además en este mismo nivel y superando el nivel de daño generado por la hidrocortisona se encuentra la concentración de 50 mg/kg del extracto, dando una idea de que esta concentración genera más daño que la generada por el fármaco.

## **17. Análisis de resultados.**

### **17.1 Inflamación aguda.**

Como se puede observar con los resultados obtenidos y registrados, se deduce que el extracto de la planta de la “Espinosa” no presenta ningún efecto antiinflamatorio en ninguna de las concentraciones, de hecho se puede considerar que este extracto tiene cierta tendencia a promover o coadyuvar a la inflamación, debido a que a todas horas los grupos tratados con el extracto de la “Espinosa” presentaron una inflamación mayor a los tratados con la indometacina, incluso presentan una inflamación mayor a la que se presenta en los ratones a los que se les administro solución salina.

### **17.2 Inflamación crónica**

El conjunto de los resultados obtenidos en el ensayo de inflamación crónica, es una confirmación de los resultados obtenidos en el ensayo agudo, ya que en este último se observó un incremento en el tamaño de las patas de los ratones CD1 que fueron tratados con el extracto de la Espinosa, y los porcentajes de inhibición de la inflamación resultaron negativos.

En el caso de la inflamación crónica se encontró que los pesos de los pellets secos se encuentran elevados en los ratones a los que se les administró el extracto de la planta, esto debido al incremento de contenido fibrogranuloso que se presenta cuando hay una respuesta inflamatoria.

Hay un aumento considerable en la ceruloplasmina, llegando a ser incluso mayor al que se presenta con la solución salina y este incremento es explicado debido a que la ceruloplasmina es un marcador que se observa elevado en una respuesta inflamatoria, y en este caso al verse ampliamente superado el control, se puede asegurar que el extracto de Espinosa promueve la inflamación.

En el caso de la peroxidación lipídica también existe daño a los ratones, ya que nuestro control negativo genera un aumento de este marcador, pero el extracto de planta también presenta un incremento, en uno de los casos superior al generado por la hidrocortisona.

Para el caso del índice esplénico del grupo tratado con hidrocortisona se observa un órgano disminuido de tamaño, esto es lo esperado debido a que los corticoesteroides en general, inhiben la síntesis de ADN y ARN además de inducir apoptosis en algunas poblaciones de linfocitos.<sup>11</sup>

## 18. Conclusiones

En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el extracto acuoso de la *Loeselia mexicana* (Lam.) Brand “Espinosa” no posee ninguna propiedad antiinflamatoria, por lo que se debe informar y concientizar a la población que acostumbra el uso de este extracto para que se abstenga de su uso en caso de presentar algún episodio de inflamación, ya que con los resultados obtenidos se observó que el extracto de esta planta fomenta y promueve la inflamación.

## 19. Referencias

- 1) Tortora GJ, Grabowski SR. Principios de anatomía y fisiología, Estados Unidos de Norteamérica: Editorial Oxford University Press; 2002.
- 2) Parslow TG, Stites. PD. Inmunología básica y clínica. 10ª ed. México: El manual moderno; 2002.
- 3) Goodman G, Goodman SL, Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica, España: McGraw-Hill Interamericana de España; 1980.
- 4) Mendoza PN. Farmacología médica, México: Editorial Médica Panamericana: UNAM, Facultad de Medicina; 2008.
- 5) [MedlinePlus] Indometacina. Enciclopedia médica en español. Consultado el 31 de marzo del 2013.
- 6) Katzung BG. Basic & Clinical Pharmacology 9 edición. España: McGraw-Hill Profesional; 2007.
- 7) Herrerías GJM, Díaz BA, Jiménez SM. Tratado de Hepatología. España: Universidad de Sevilla secretariado de publicaciones: 1996.
- 8) Torres LM, Aguilar JL, de Andrés JA, de León O, Gómez-Luque A, Montero A. Tratado de anestesia y reanimación. Madrid: Arán Ediciones; 2001.
- 9) Bautista J. Factores que intervienen en la reacción antígeno-anticuerpo. Gaceta Médica México. 2004; 140: 28-30.
- 10) Suarez MPJ. Liberación de óxido nítrico inducido por el flujo sanguíneo. Asch Inst. Cardiología México. 2000; 70: 197-202.
- 11) Margni R. Inmunología e Inmunoquímica fundamentos. Quinta edición, Buenos Aires: Panamericana; 1996.
- 12) Avello M, Suwalsky M. Radicales libres, antioxidantes naturales y mecanismos de protección. Atenea (Concepc.)[online]. 2006, n.494, pp.161-172
- 13) Devlin TM. Bioquímica: Libro de texto con aplicaciones clínicas, 4ª edición, Barcelona: Editorial Reverte; 2004.
- 14) Ibrahim AS, Ahmed HLE, Mohd SH, Ahmed YSM, Koko WS, Mohan S. 2011 Anti-inflammatory activities of cucurbitacin E isolated from *Citrullus lanatus* var. Citroides: role of reactive nitrogen species and cyclooxygenase enzyme inhibition. *Fitoterapia* 82. 1190-1197.
- 15) Bolivar P, Paredes-Cruz C, Hernández RL, Juárez NZ, Sánchez-Arreola E, Av-Gay Y, Bach H. 2012 Antimicrobial, anti-inflammatory, antiparasitic, and cytotoxic activities of *Galium mexicanum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 137 (2011) 141-147.
- 16) Martínez RMG, Richard-Greenblatt M, Juárez NZ, Av-Gay Y, Bach H, Hernández LR. 2012 *The Scientific World Journal*, ID 263572.

- 17) González-Ramírez A, González-Trujano ME, Pellicer F, Muñoz-López FJ. 2012 Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the *Agastache mexicana* extracts by using several experimental models in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 142; 700-705.
- 18) Alves RRM, Sales KKL, Machado NLT, Francielle SC, Horst H, Pizzolatti GM, Soares SAR, Hatsuko BC, de Paula WMF. 2012 Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 139, 519-526.
- 19) Roman RR, Almanza PJC, Fortis BA, Mejia A, Banderas DTR, Zamilpa AA, Diaz FM. 2005 Antioxidant and anti-inflammatory effects of Hypoglycemic fraction from *Cucurbita ficifolia* Bouché in Streptozotocin-induced diabetes mice. *The American Journal of Chinese Medicine* 40, 97-110
- 20) Navarro GVM, Herrera RM, Rojas G, Zepeda LG. Coumarin derivatives from *Loeselia mexicana*. 2007 Determination of the anxiolytic effect of daphnoretin on elevated plus-maze. *Journal of the Mexican Chemical Society* 51, 193-197.
- 21) Pérez Salud G, Pérez GC, Zavala SMA. 2005 A study of the antidiarrheal properties of *Loeselia mexicana* on mice and rats. *Phytomedicine* 12, 670-674.
- 22) Rojas A, Bah M, Rojas JI, Serrano V, Pacheco S. 1999 Spasmolytic activity of some plants used by Otomi Indians of Querétaro (México) for the treatment of gastrointestinal disorders. *Phytomedicine* 6, 367-371.
- 23) Navarro GVM, Rojas G, Zepeda LG, Aviles M, Fuentes M, Herrera A, Jiménez E. 2006 Antifungal and Antibacterial Activity of Four Selected Mexican Medicinal Plants. *Pharmaceutical Biology* 44, 297-300.
- 24) Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana, Atlas de las plantas de la Medicina Tradicional Mexicana, Espinosilla (*Loeselia mexicana* (Lam.) Brandege). Consultado el 30 de marzo del 2013.
- 25) <http://www.hipernatural.com/es/pltespinosilla.html> (Consultado el 30 de marzo del 2013)
- 26) Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y alimentación, NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio. <http://www.senasica.gob.mx/?doc=743> Disponible en el diario oficial.
- 27) Marroquín-Segura R, Flores PM, Carreón-SR, García-BMM, Mora GJLM, Aguilar CA, Hernández-AVJ. 2009 The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw oedema and granuloma tissue formation in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 639-641.

- 28) Regueiro GJR, López LC, González RS, Martínez NE. Inmunología: Biología y patología del sistema inmune, España; editorial médica panamericana; 2004.
- 29) Calabrese L, Malatesta F, Barra D. 1998 Purification and properties of bovine caeruloplasmin. *Biochem Journal* 199, 667-673.
- 30) Guevara I, Iwanejko J, Dembi A, Pankiewicz J. Determination of nitrite/nitrate biological material by the simple Griess reaction. *Clinical Chemical, Act* 1998; 274:177-188.
- 31) Secretaria de economía, nmx-aa-079-scfi-2001, análisis de aguas - determinación de nitratos en aguas naturales, potables, residuales y residuales tratadas - método de prueba (cancela a la nmx-aa-079-1986).
- 32) Estepa V, Ródenas S, Martín MC. 2001 Optimización de un método para la determinación de la peroxidación lipídica en suero humano. *Anal. Real Acad. Farm*, 67(3): 1-17
- 33) Mendoza PN. Farmacología médica. México. Editorial Médica Panamericana; 2008.
- 34) Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Patología humana 7.<sup>a</sup> edición, España. Editorial Elsevier; 2004.
- 35) Welsch U, Sobotta J. Histología 2.<sup>a</sup> edición, España. Editorial Médica Panamericana; 2008.
- 36) Duce MA. Patología quirúrgica, España. Editorial Elsevier; 2005.
- 37) Stevens A, Lowe J. Anatomía patológica 2.<sup>a</sup> edición. España. Editorial Harcourt; 2001.
- 38) Kumar AA, Fausto N, Mitchell RN. Robbins; Patología humana 8<sup>a</sup> edición. España. Editorial Elsevier; 2008.
- 39) García BMJ, Colom VMF, Pérez SM, Belso SE, Castillo TL, Gómez MD. Técnico especialista en anatomía patológica. España. Editorial Mad S.L.; 2006.
- 40) Cameron HC. Agentes físicos en rehabilitación: De la investigación a la práctica. 3.<sup>a</sup> edición. España, Editorial Elsevier; 2009.
- 41) Fitzpatrick BT. Dermatología en Medicina general 7.a edición. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana; 2009.
- 42) Sabán RJ. Control global del riesgo cardiometabólico: La disfunción endotelial como diana de preferencia. Madrid, Editorial Diaz de Santos; 2009.
- 43) Camacho REM. Daño hepático y alteraciones de la coagulación sanguínea producidas por el malati3n-efecto del Ginkgo biloba. [tesis de maestría]. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Centro de Ciencias Básicas; 2009.

## 20. Anexos

**Anexo A.** Valores descriptivos del índice esplénico con los cuales se realizó la gráfica 1.

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Solución salina	6	4.4050	0.28725	0.11727	4.1036	4.7064	4.15	4.94
Indometacina	6	3.8717	0.14034	0.05730	3.7244	4.0189	3.63	4.05
25 mg del extracto	6	4.4417	0.60387	0.24653	3.8079	5.0754	3.67	5.27
50 mg del extracto	6	4.4967	0.59116	0.24134	3.8763	5.1170	3.68	5.29
100 mg del extracto	6	5.0250	0.50883	0.20773	4.4910	5.5590	4.17	5.65
Total	30	4.4480	0.56910	0.10390	4.2355	4.6605	3.63	5.65

**Anexo B** resultados del análisis de varianza ANOVA de una vía.

Inflamación 3 horas después

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	4.016	4	1.004	4.669	0.006
Intra-grupos	5.376	25	0.215		
Total	9.392	29			

**Anexo C.** Valores descriptivos del índice esplénico que fueron usados para la gráfica 2.

Índice esplénico

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
solución salina	6	0.518500	0.0628360	0.0256527	0.452558	0.584442	0.4400	0.5840
Hidrocortisona	6	0.263933	0.0405806	0.0165669	0.221347	0.306520	0.2310	0.3282
25 mg de extracto	6	0.511950	0.0950472	0.0388029	0.412204	0.611696	0.4050	0.6387
50 mg de extracto	6	0.448667	0.0948107	0.0387063	0.349169	0.548164	0.3370	0.6050
100 mg de extracto	6	0.393817	0.0488502	0.0199430	0.342551	0.445082	0.3156	0.4617
Total	30	0.427373	0.1163406	0.0212408	0.383931	0.470816	0.2310	0.6387



**Anexo D.** Comparación de medias de ceruloplasmina con respecto a diferentes tratamientos, valores que fueron utilizados para elaborar la gráfica 4.

### Descriptivos

Ceruloplasmina mg/dL

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Solución salina	6	31.5000	5.30924	2.16749	25.9283	37.0717	27.00	37.80
Hidrocortisona	6	27.0000	4.82991	1.97180	21.9313	32.0687	21.60	32.40
25 mg de extracto	6	37.8000	7.63675	3.11769	29.7857	45.8143	27.00	48.60
50 mg de extracto	6	35.1000	2.95770	1.20748	31.9961	38.2039	32.40	37.80
100 mg de extracto	6	51.3000	5.40000	2.20454	45.6330	56.9670	43.20	59.40
Total	30	36.5400	9.76678	1.78316	32.8930	40.1870	21.60	59.40

**Anexo E.** Comparación de medias de Peroxidación con respecto a diferentes tratamientos, con las cuales se realizó la gráfica 5.

### Descriptivos

Peroxidación

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Solución salina	6	0.057000	0.0146697	0.0059889	0.041605	0.072395	0.0350	0.0720
Hidrocortisona	6	0.078500	0.0106160	0.0043340	0.067359	0.089641	0.0660	0.0940
25 mg de extracto	6	0.071833	0.0074409	0.0030377	0.064025	0.079642	0.0610	0.0840
50 mg de extracto	6	0.080167	0.0057417	0.0023440	0.074141	0.086192	0.0740	0.0880
100 mg de extracto	6	0.072733	0.0069678	0.0028446	0.065421	0.080046	0.0600	0.0800
Total	30	0.072047	0.0122206	0.0022312	0.067483	0.076610	0.0350	0.0940