



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

**VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
Y ANTIMICÓTICA DE UN EXTRACTO ACUOSO DE
Helietta parvifolia (BARRETA)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ERICK ARAFAT REYES LÓPEZ

DIRECTOR: DR. RUBÉN MARROQUÍN SEGURA

ASESOR: M. en C. MAURILIO FLORES PIMENTEL



México D. F.

2008



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.

AGRADECIMIENTOS

A mi **Dios**, porque en el camino continúe mirando hacia delante y tratando de ser mejor cada día, por mis sueños.

A la **UNAM**, por las posibilidades que me permitió explorar y por las personas que en ella conviven para el logro de un objetivo para la comunidad y para la Nación.

A la **FES Zaragoza**, por proporcionarme el espacio de mis grandes satisfacciones.

A mi Director de Tesis, **Dr. Rubén Marroquín Segura**, por las enseñanzas, el tiempo otorgado, la paciencia y la capacidad de ver lo bueno que hay en las personas. Sin él, todo esto no hubiera sido posible.

A mi Asesor de Tesis, **MC. Maurilio Flores Pimentel**, por todo el apoyo, el tiempo, el conocimiento y la paciencia otorgadas hacia mi persona. Y por el manejo de los ratones.

A mis sinodales, Maestra **Yolanda Flores Cabrera**, con su paciencia y correcciones hizo posible que este trabajo mejorara en gran manera; a la M. en C. **Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara**, por su visión y rigor académicos, y por su paciencia; a la M. en C. **Evangelina López Nieto**, por su colaboración para que este trabajo fuera presentable.

A la M. en C. **Abigail Aguilar Contreras**, por la verificación de la identidad taxonómica de la planta con la cual se trabajó.

A la M. en C. **Martha Mercedes García Burciaga**, por el apoyo incondicional para la elaboración del experimento y su desarrollo subsecuente, por su paciencia, conocimientos y su valioso tiempo.

Al Candidato a Doctor en Ciencias, **Rodolfo Carreón Sánchez**, por el trabajo realizado en la obtención de los extractos utilizados en esta tesis, por su tiempo y correcciones.

A mi profesora, QFB **Patricia Vidal Millán**, por el trabajo realizado para la realización de esta tesis; por su Amistad, mi Gratitud intensa y extensa.

Al Dr. **Luis Mora Guevara**, por su apoyo en la corrección y análisis de este trabajo, por su tiempo y paciencia.

A los profesores y alumnos del laboratorio 1-1 de Inmunología, por haber compartido conmigo su espacio y su ser; especialmente a Julio, aspirante a médico que proporcionó su ánimo y tiempo para completar este trabajo.

A mis **Hermanos**, sin los cuales no tendría sentido el esfuerzo realizado y en los cuales he encontrado apoyo incondicional y mis ejemplos a seguir.

A mi **Padre**, esperando que puedas ver el fruto del esfuerzo compartido.

A mis amigos de antes, que de una u otra manera influyeron de manera vital en mi forma de vivir y de ver la vida: Rosa, Vítor, Troll, Tezca, Omar, Gabi, Héctor, OUVL, IMM, Yurití, Miner, Rober, Goyin, Taverín, Talío y demás personas que nunca olvido.

A mis amigos de la Facultad: Serge, Heracleo, Rafa, George, Eve, Tracy, Ameli y demás compañeros que siempre recuerdo, a los clínicos y farmacéuticos.

DEDICATORIAS

A mi **Consuelo**, mi Mamá, mi primera Maestra en la vida, con la cual tendré siempre una deuda infinita, por enseñarme que la vida también sirve para buscar la justicia y que la honestidad no se agota con el día.

A mi **Estrella**, mi hermana, por ser y por estar para mí cuando más la he necesitado.

A **Miriam**, mi Nvdmp, por tu Amor, Cariño, Paciencia, los momentos compartidos, las Risas y las lágrimas, por Todo.

ÍNDICE	
RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
1. MARCO TEÓRICO	3
1.1 LA INFLAMACIÓN	3
1.1.1 <i>Los Cambios Vasculares</i>	3
1.1.2 <i>La Marginación Leucocitaria</i>	3
1.1.4 <i>La Formación del Edema</i>	4
1.2 LAS CÉLULAS DE LA INFLAMACIÓN	5
<i>Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN)</i>	5
<i>Eosinófilos</i>	5
<i>Basófilos y Células Cebadas (CC)</i>	5
<i>Monocitos y Sistema Fagocítico Mononuclear</i>	5
<i>Linfocitos</i>	6
<i>Células Plasmáticas</i>	6
<i>Fibroblastos</i>	7
<i>Células Endoteliales (CE)</i>	7
1.3 ACONTECIMIENTOS CELULARES	7
1.3.1 <i>La Marginación, Rodamiento y Adhesión</i>	7
1.3.2 <i>La Activación Leucocitaria</i>	8
1.3.3 <i>La Fagocitosis</i>	8
1.4 LOS MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN	10
1.4.1 <i>Las Aminas Vasoactivas</i>	10
1.4.2 <i>Las Proteasas Plasmáticas</i>	10
1.4.3 <i>Los Metabolitos del Ácido Araquidónico (AA)</i>	12
1.4.4 <i>El Factor Activador de Plaquetas (FAP)</i>	14
1.4.5 <i>Las Citocinas y las Quimiocinas</i>	14
1.4.6 <i>El Óxido Nítrico</i>	15
1.4.7 <i>Los Constituyentes Lisosomales de Leucocitos</i>	16
1.4.8 <i>Los Radicales Libres Derivados del Oxígeno</i>	16
1.4.9 <i>Los Neuropeptidos</i>	16
1.5 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS	17
1.6 LA FARMACOGNOSIA	19
1.7 LA FITOQUÍMICA	21
1.8 EL MATORRAL SUBMONTANO	23
1.8.1 <i>Descripción botánica de Helietta parvifolia (Barreta)</i>	24
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
3. HIPÓTESIS	26
4. OBJETIVO GENERAL	26
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
6. DISEÑO DEL ESTUDIO	27
7. MATERIAL Y MÉTODOS	28
8. RESULTADOS Y SU INTERPRETACIÓN	32
9. CONCLUSIONES	53
10. PERSPECTIVAS	55
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

RESUMEN

La inflamación es una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa de la lesión celular. El tratamiento farmacológico de la inflamación aguda o crónica presenta efectos secundarios que pueden ser graves, por lo que se ha buscado una alternativa, utilizando el conocimiento tradicional herbolario. Desde hace décadas se han desarrollado modelos experimentales para determinar la actividad antiinflamatoria o antimicótica, de varias plantas clasificadas científicamente. El empleo de las diversas partes del árbol llamado *Helietta parvifolia* (conocido comúnmente como Barreta) ha sido de forma empírica más que con bases científicas. En este estudio se utilizó un modelo *in vivo* en ratones hembra CD1 para el ensayo antiinflamatorio y un modelo *in vitro* antimicótico en placas de agar sembradas con una cepa de *Aspergillus flavus*, utilizando en ambos un extracto acuoso de corteza de *H. parvifolia*. Se determinó que el extracto de *H. parvifolia* tuvo una dosis efectiva media antiinflamatoria de 51.4 mg/kg y que no presentó actividad antimicótica. Este trabajo es trascendente ya que aporta elementos válidos que corroboran la actividad antiinflamatoria y así mismo se determinó que la corteza no posee actividad antifúngica.

INTRODUCCIÓN

La inflamación es una reacción compleja del sistema inmunitario innato que tiene lugar en los tejidos vascularizados, que consiste en la acumulación y activación de leucocitos y proteínas plasmáticas en el foco de la lesión celular. La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas aguda y crónica, la aguda puede oscilar entre minutos, horas, hasta pocos días.^(1,2)

En el tratamiento de pacientes con procesos inflamatorios se usan diferentes tipos de medicamentos, entre los que se encuentran los fármacos no esteroideos y las hormonas glucocorticoesteroides. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) se pueden clasificar en inhibidores de la prostaglandina sintetasa y en no inhibidores de la prostaglandina sintetasa. La actividad antiinflamatoria está mediada por la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas.⁽³⁾ Muchos de estos principios activos se han extraído de plantas, las cuales se evalúan como fuente de nuevos fármacos, sea para obtener antiinflamatorios, antimicóticos o anticancerígenos.⁽⁵⁾

La inducción de inflamación en animales de experimentación es el punto inicial para los ensayos antiinflamatorios^(40,44). Estos experimentos son variados, especialmente la inducción del edema en cojinete plantar de rata o ratón, en un intento de imitar la artritis e inflamación patológica. Algunos ensayos son simples y varios agentes irritantes se utilizan, como es el caso de la carragenina.^(7,8,9)

Una de las preocupaciones de los países en vías de desarrollo como México, es la producción, disponibilidad y conservación de granos y semillas. Dentro de los factores que ocasionan la pérdida de éstos recursos es la presencia de hongos, donde algunos producen micotoxinas y ocasionan ennegrecimiento de granos y semillas. La evaluación de la actividad antifúngica se llevó a cabo en un estudio *in vitro*, utilizando la técnica de pozo en placas de agar para probar la actividad del extracto acuoso de corteza de Barreta sobre *A. flavus*.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 LA INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta de carácter protector cuyo objetivo final es librar al organismo de la causa de la lesión celular y de las consecuencias de la misma.⁽¹⁾ La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas, aguda y crónica. La inflamación aguda puede oscilar entre minutos, horas y pocos días; se caracteriza por la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas, y la migración de leucocitos, es de carácter inmediato (fig.1). La inflamación aguda presenta tres componentes principales:

- a) modificaciones en el calibre de los vasos sanguíneos, permitiendo el aumento en el flujo de sangre,
- b) alteraciones en la estructura de la microvasculatura, que permite la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas y los leucocitos, y
- c) la migración de los leucocitos desde el punto en el que abandonan la microcirculación, hasta el foco de la lesión, en donde se acumulan.⁽¹⁾

1.1.1 Los Cambios Vasculares. Se produce la vasodilatación, posterior a una vasoconstricción arteriolar y posteriormente dando lugar a la apertura de nuevos lechos capilares en la zona lesionada. Después de la vasodilatación se produce una disminución de la circulación. El retraso de la circulación se debe al aumento de la permeabilidad de la microvasculatura. La disminución del líquido en el compartimiento intravascular da origen a la concentración de los hematíes en los vasos de pequeño calibre y al aumento de la viscosidad sanguínea, lo que ocasiona la presencia de pequeños vasos dilatados y repletos de hematíes, llamado comúnmente estasis.^(1,2)

1.1.2 La Marginación Leucocitaria. Es la orientación periférica de los leucocitos (principalmente neutrófilos), a lo largo del endotelio vascular. Primero los leucocitos se adhieren en forma transitoria al endotelio, y después con mayor

intensidad, al cabo de poco tiempo, atraviesan la pared vascular y se dirigen al intersticio.^(1,2)

1.1.3 La Formación del Edema. La característica principal y de mayor especificidad en la inflamación aguda es el aumento de la permeabilidad vascular, ocasionando la salida de un fluido rico en proteínas hacia el intersticio. La permeabilidad vascular aumenta debido a la acción de diversos mediadores bioquímicos, lesión directa, toxinas bacterianas y por la angiogénesis.

Existe reducción de la presión osmótica intravascular e incremento de la presión osmótica del líquido intersticial. Aunado al aumento de la presión hidrostática secundaria a la vasodilatación, este mecanismo produce una salida y acumulación de líquido en el tejido intersticial, donde el incremento neto del líquido extravascular constituye el edema.^(1,2)

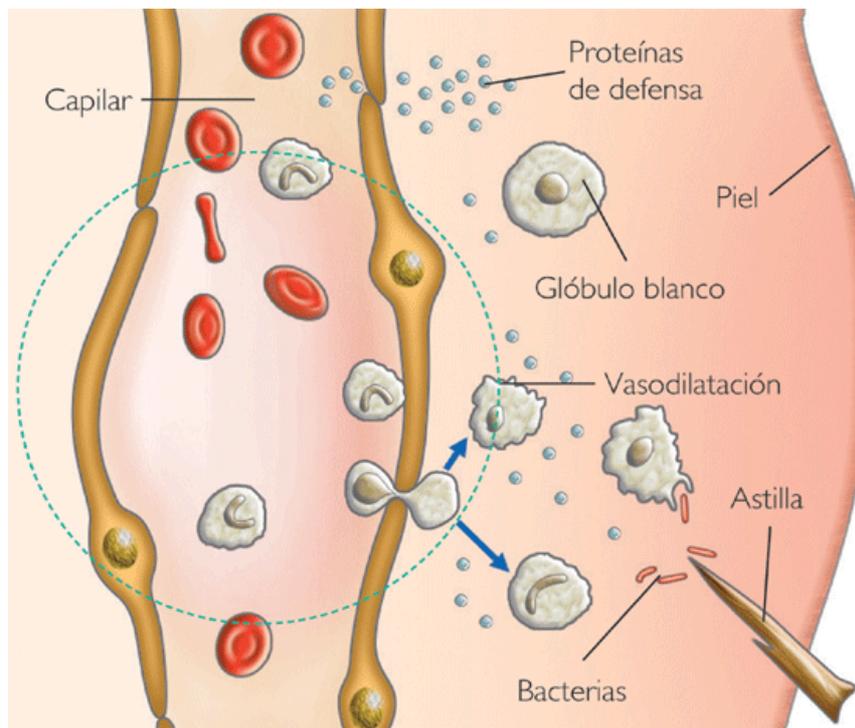


Figura 1. En esta imagen se representa el proceso inflamatorio que se produce por un daño mecánico.⁽⁵³⁾

1.2 LAS CÉLULAS DE LA INFLAMACIÓN

Neutrófilos Polimorfonucleares (PMN). Son las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Tienen una vida en circulación de 3-4 días, el citoplasma es rico en gránulos lisosomales, que contienen enzimas del tipo de la fosfatasa alcalina, proteasas, ADNasa, etc; participan en la fagocitosis y en la eliminación de tejidos destruidos. El daño a los tejidos se basa en la capacidad de éstas células de liberar gránulos tóxicos de su citoplasma o de generar radicales libres derivados del oxígeno.^(2,10,41)

Eosinófilos. Tienen un núcleo bilobulado y un citoplasma acidófilo en el que se encuentran las mismas enzimas que en los PMN neutrófilos, excepto fagocitina y lisozima. Son células con capacidad fagocítica cuando se activan por la presencia de factores bacterianos, complemento e inmunocomplejos.⁽²⁾

Basófilos y Células Cebadas (CC). Los basófilos son células sanguíneas en cuyo citoplasma se encuentran gránulos metacromáticos, ricos en mucopolisacáridos sulfatados. Las células cebadas son residentes en los tejidos, derivadas de la médula ósea, de tamaño ligeramente mayor. Contienen histamina, heparina, 5-hidroxitriptófano y otras enzimas. Las células cebadas son más abundantes en las inflamaciones de la piel y el mesenterio. La presencia de éstas células en la inflamación estimula la proliferación de fibroblastos, la síntesis de colágena y la angiogénesis.⁽²⁾

Monocitos y Sistema Fagocítico Mononuclear. Los monocitos son células sanguíneas de gran tamaño de 17-20 micrómetros (μm), el citoplasma contiene numerosas vesículas de pinocitosis y gran número de lisosomas. Tienen receptores membranales para el fragmento cristalizante de las inmunoglobulinas (fragmento Fc) y para la porción del sistema del complemento C3b. Las funciones principales de los monocitos son la liberación de productos esenciales en la inflamación, la pinocitosis y la fagocitosis.⁽²⁾ Los monocitos son el principal

componente del sistema retículoendotelial o sistema fagocítico mononuclear (SFM). Su función más importante es la fagocitosis. ⁽²⁾

Linfocitos. En el foco inflamatorio aparecen en fases tardías. Los linfocitos B son relativamente pequeños, tienen un núcleo redondo con cromatina en forma de grumos y un citoplasma un poco mayor y poco basófilo, pueden madurar hasta formar células plasmáticas. Los linfocitos T son ligeramente mayores, tienen citoplasma basófilo y su núcleo es relativamente grande. Linfocitos y monocitos se estimulan recíprocamente para su persistencia en el foco inflamatorio. ⁽²⁾

Células Plasmáticas. Son de mayor tamaño que los linfocitos, tienen un citoplasma basófilo, y el núcleo en forma de grumos densos cercanos a la membrana nuclear; liberan inmunoglobulinas (Igs). En el foco inflamatorio, estas células presentan multinucleación, acumulación intracitoplasmática de Igs cristalizadas. Aparecen en la fase tardía de la inflamación. ⁽²⁾

Las células mencionadas hasta ahora se originan en médula ósea, compartiendo un antecesor común como se muestra en la Fig. 2

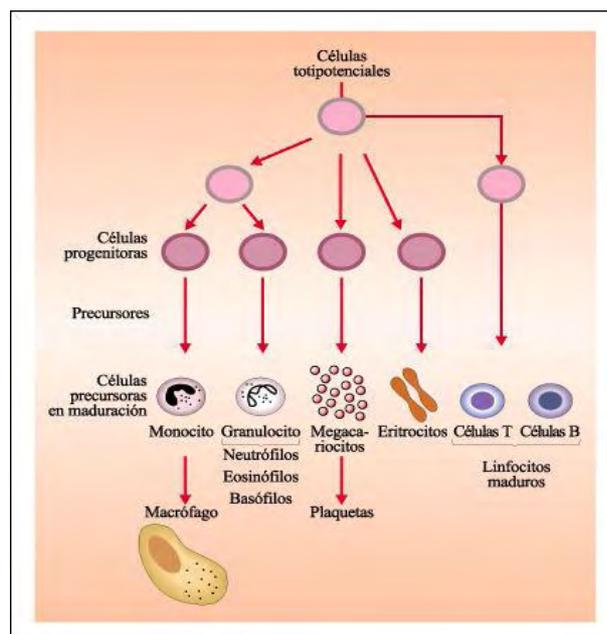


Figura 2. En esta imagen se representa las líneas celulares hematopoyéticas, participantes en el proceso de la inflamación. ⁽⁵⁶⁾

Fibroblastos. Son células mesenquimales de los tejidos. En el foco inflamatorio se transforman en fibroblastos, proliferando en la fase tardía o crónica y formando el tejido de granulación. Los fibroblastos sintetizan colágena, que es esencial para la cicatrización y curación de las heridas. Algunos fibroblastos tienen capacidad de fagocitar.⁽²⁾

Células Endoteliales. En el estadio inicial de la inflamación, las células endoteliales tienen un papel activo en la adherencia y paso de células por los espacios interendoteliales y de diversas moléculas por los poros intracelulares. El papel primordial del endotelio en la inflamación se relaciona con la adherencia de los leucocitos y el paso de células y solutos fuera del vaso. El endotelio sintetiza la interleucina-1 (IL-1), expresando antígenos en la superficie de clase I (HLA) y II (MHC); posee en su superficie propiedades procoagulantes y anticoagulantes que cuando se alteran pueden causar una coagulación intravascular.^(2,37,42,45)

1.3 ACONTECIMIENTOS CELULARES

Una de las características más importantes de la inflamación es el aporte de leucocitos a la zona de la lesión. La secuencia de acontecimientos que ocurren después de la aparición del estímulo inflamatorio se puede numerar de la siguiente manera:^(1,2)

1.3.1 Marginación, rodamiento y adhesión (en la luz vascular). La marginación es el proceso de acumulación de leucocitos en la periferia, a lo largo de la superficie endotelial. Posteriormente, los leucocitos se colocan en fila e individualmente sobre el endotelio, adhiriéndose en forma temporal (rodamiento), para finalmente adherirse firmemente en algún punto al endotelio. La adhesión al endotelio se posibilita por los receptores de adhesión pertenecientes a cuatro familias de moléculas: las selectinas (E, P y L), las inmunoglobulinas (intercelular tipo 1 y vascular tipo 1), las integrinas (glucoproteínas heterodiméricas constituidas por cadenas α y β) y las diriginas vasculares (son ligandos endoteliales de las selectinas leucocitarias). Al revestimiento de leucocitos que ocurre al pasar el tiempo se le denomina pavimentación.^(1,2,10)

Transmigración a través del endotelio. La transmigración se produce a través de las uniones intercelulares, en donde la diapédesis se produce principalmente en las vénulas. En la inflamación aguda predominan los neutrófilos, y posteriormente son sustituidos por monocitos.^(1,2,10)

Migración en los tejidos intersticiales hacia un estímulo quimiotáctico. La quimiotaxis es la emigración de leucocitos a la zona de lesión. Sustancias exógenas (p. ej. productos bacterianos) y endógenas (p. ej. componentes del sistema de complemento) actúan como factores quimiotácticos. El quimiotactismo se produce a través de receptores específicos en la membrana leucocitaria, poniendo en marcha el aumento de Ca^{+2} intracelular, aunado al efecto del fosfoinositol, logrando contraer los filamentos del citoesqueleto.^(1,2,10)

1.3.2 La Activación Leucocitaria. Se le denomina activación leucocitaria a un grupo de respuestas originadas en los leucocitos frente a factores quimiotácticos, fagocitosis y los complejos antígeno-anticuerpo, tales respuestas son: producción de metabolitos del ácido araquidónico, desgranulación y secreción de enzimas lisosomales, activación del estallido oxidativo, la modulación de las moléculas de adhesión leucocitaria y el cebado.^(1,2)

1.3.3 La Fagocitosis. Denominada así a la capacidad de neutrófilos y monocitos de absorber e introducir cuerpos extraños y material necrótico. Se plantean tres pasos para lograr tal acción, reconocimiento y fijación, englobamiento, y destrucción o degradación.

El reconocimiento a través de opsoninas que recubren a microorganismos (m. o).

Las opsoninas clave son:

- a) el fragmento Fc de la inmunoglobulina G,
- b) el C3b, generado por la activación del complemento, y
- c) las proteínas plasmáticas denominadas colectinas, que se unen a las paredes celulares de los m. o. ^(1,2,10)

El Englobamiento. El citoplasma leucocitario emite pseudópodos (extensiones) que rodean a la partícula a fagocitar, la cual queda incluida en un fagosoma; posteriormente un gránulo lisosomal se fusiona para formar el fagolisosoma, liberando su contenido.^(1,2,10)

La Destrucción. Se consigue mediante mecanismos dependientes e independientes de oxígeno. Entre los dependientes del oxígeno se encuentran los que generan radicales libres de $O_2\bullet$, $OH\bullet$, y $H_2O_2\bullet$. Los neutrófilos contienen mieloperoxidasa, que en presencia de Cl^- , convierte el H_2O_2 en $OCl\bullet$, que es un agente antimicrobiano.^(1,2,10)

Los enzimas y proteínas que actúan independientemente del oxígeno son:

- a) Las proteínas catiónicas, como la BPI (Bactericidal Permeability Increasing Protein) presente en neutrófilos, o la MBP (Major Basic Protein) presente en eosinófilos,
- b) Las hidrolasas lisosomales, presentes en neutrófilos y monocitos, como catepsina-G, lipasas, sulfatasas e hidrolasas anti-ADN, y
- c) Otras enzimas, como la lisozima, presente en diversas secreciones; la lactoferrina presente en neutrófilos y las defensinas, presentes en neutrófilos y monocitos, con amplio espectro antibacteriano.

Tras la fagocitosis, los neutrófilos sufren apoptosis, y son ingeridos por los macrófagos o eliminados a través de los vasos linfáticos.⁽¹⁾

1.4 LOS MEDIADORES QUÍMICOS DE LA INFLAMACIÓN

Están presentes en el plasma en formas precursoras, que pueden activarse. En las células se encuentran dentro de gránulos intracelulares, que en respuesta al estímulo, son secretados o sintetizados *de novo*.⁽¹⁾

1.4.1 Las Aminas Vasoactivas. La histamina se encuentra almacenada en basófilos, células cebadas y plaquetas, aunque esta presente en los tejidos en menor concentración. A través de receptores H₁, ocasiona la contracción del músculo intestinal y tráqueo-bronquial y el aumento de la permeabilidad vascular, dilatación de las arteriolas y constricción de las arterias de mayor calibre. Es liberada desde gránulos intracitoplasmáticos en respuesta a una variedad de estímulos. La serotonina se encuentra en las plaquetas y en el tejido enterocromafín del tubo digestivo. Sus efectos son similares a los de la histamina, pero de menor potencia.^(10,11)

1.4.2 Las Proteasas Plasmáticas. Son proteínas plasmáticas, entre las cuales se encuentran: el sistema del complemento, las cininas, y los factores de la coagulación.^(10,11)

El sistema del complemento esta formado por 20 proteínas (incluidos los productos de fragmentación), cuyo objetivo final es la lisis de microorganismos a través del denominado complejo de ataque de membrana. Los componentes presentes en forma inactiva en el plasma se numeran desde el C1 hasta el C9. Son tres las vías en las que se puede activar éste sistema. En respuesta a complejos antígeno-anticuerpo, la vía clásica se activa. La vía alternativa se activa por el reconocimiento de ciertas estructuras de la superficie de los m. o. La vía de la lectina se activa por una proteína plasmática denominada lectina fijadora de manosa, que reconoce los residuos de manosa terminales situados en las glucoproteínas y glucolípidos microbianos.^(10,11)

C5a. Es una fracción del complemento con actividad de anafilotoxina (estimula la liberación de histamina) más potente derivada del complemento, aumentando la permeabilidad vascular y favoreciendo la contracción del músculo liso, tiene actividad quimiotáctica para neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos, es capaz de activar el metabolismo del ácido araquidónico por la vía de la lipooxigenasa en los neutrófilos y los monocitos e incrementa la adhesión de los leucocitos al endotelio. C3a produce los mismos efectos biológicos que C5a, pero con menor potencia y casi sin actividad quimiotáctica.^(10,11,36)

C3b y C3bi. Son opsoninas, favorecen la fagocitosis por parte de neutrófilos y macrófagos. Con actividad quimiotáctica sobre neutrófilos, eosinófilos y monocitos.^(10,11)

El Sistema de las Cininas. Son polipéptidos formados a partir del cininógeno por la acción enzimática de proteasas llamadas calicreínas. La bradicinina es la cinina mejor conocida, es un potente agente que incrementa la permeabilidad vascular, causa contracción del músculo liso y dilatación de los vasos sanguíneos. Su formación se inicia por la activación del Factor XII (de Hageman) de la coagulación, por contacto con superficies que presentan carga negativa, como el colágeno y las membranas basales. Se produce un fragmento del factor XII (factor XIIa), que convierte a la precalicreína plasmática en una forma proteolítica activa, la enzima calicreína. Esta última fragmenta una glucoproteína plasmática precursora, el cininógeno de elevado peso molecular, para producir bradicinina. La calicreína presenta actividad quimiotáctica y también convierte C5 en C5a.^(2,10,11,39)

El Sistema de la Coagulación. Se divide en dos vías que confluyen, activando la trombina y formando fibrina. La vía intrínseca de la coagulación comprende una serie de proteínas plasmáticas que pueden ser activadas por el factor XII (de Hageman), posteriormente se modifica su configuración (convirtiéndose en XIIa), pudiendo fragmentar sustratos proteicos y activar

diversos sistemas mediadores. Dos componentes del sistema de coagulación actúan como enlaces entre la coagulación y la inflamación:

- a) La activación del sistema de la coagulación da lugar a la activación de la trombina (factor IIa) a partir de la protrombina precursora (factor II), que a su vez, fragmenta el fibrinógeno soluble circulante para generar un coágulo insoluble de fibrina. Durante esta conversión se forman fibrinopéptidos, que inducen un incremento de la permeabilidad vascular y estimulan la actividad quimiotáctica de los leucocitos. ^(2,10,11)
- b) Factor Xa. Esta proteasa, al unirse al receptor efector de la proteasa celular-1, causa un aumento de la permeabilidad vascular y de la exudación leucocitaria.

El sistema fibrinolítico contribuye a los fenómenos vasculares de la inflamación.

La plasmina, que es una proteasa multifuncional, es importante para la degradación de los coágulos de fibrina, pero también es capaz de fragmentar el C3, puede también activar el factor de Hageman, que a su vez puede desencadenar múltiples cascadas, amplificando la respuesta.

1.4.3 Los Metabolitos del Ácido Araquidónico (AA). El ácido araquidónico es un ácido graso poliinsaturado de 20 átomos de carbono, que procede de la dieta o de la conversión a partir del ácido graso esencial ácido linoleico, se encuentra esterificado en los fosfolípidos de la membrana, se libera de ésta por la activación de las fosfolipasas celulares a través de estímulos mecánicos, químicos y físicos, o por otros mediadores. Los metabolitos del AA son sintetizados mediante dos clases de enzimas: ciclooxigenasas (prostaglandina y tromboxano) y lipooxigenasas (leucotrienos y lipoxinas).^(2,10,11,12)

La vía de la ciclooxigenasa, mediada principalmente por dos enzimas diferentes, la ciclooxigenasa 1 y la ciclooxigenasa 2 (COX1 y COX2, respectivamente), aunadas a la ciclooxigenasa 3 (COX3) isoforma de la COX1, que se presenta a nivel vascular del sistema nervioso central y que mantiene la producción de fiebre y dolor, genera las prostaglandinas (PG). Las PG se clasifican según sus características estructurales, asignándoles letra y subíndice numérico (PGD₂, PGE₂, PGF₂, PGG y PGH) producen vasoconstricción, quimiotactismo y aumento de la permeabilidad vascular.^(1,10,11)

Los monocitos sintetizan PGD₂, los neutrófilos producen PGE₂ (la cual induce la maduración de los timocitos, linfocitos B y precursores hematopoyéticos e inhibe la proliferación de linfocitos T y B maduros, la quimiotaxis de los leucocitos y la liberación de linfocinas, además de ser un vasodilatador importante) y menos PGD₂, las células cebadas sintetizan PGD₂ y menor cantidad de PGE₂ y PGF₂. La prostaciclina PGI₂ se degrada espontáneamente a PGF_{1α}, formándose en el endotelio vascular y posiblemente en monocitos y macrófagos, es un potente vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria, aumenta la permeabilidad vascular e incrementa el edema.^(2,10,11)

La enzima tromboxano sintetasa cataliza la síntesis de tromboxano A₂ (TxA₂) a partir de precursores de las PG, se originan en las plaquetas, monocitos y macrófagos, y en menor cantidad en las células cebadas, neutrófilos y linfocitos. El TxA₂ es un potente vasoconstrictor, con actividad sobre músculo liso bronquial y traqueal, su efecto más conocido es la agregación plaquetaria. La PGI₂ y el TxA₂ tienen efectos contrarios, por lo que el balance entre ambos resulta en un mecanismo de control.^(1,2)

El metabolismo del AA utilizando la vía de la lipooxigenasa (LO) produce ácidos eicosatetranoicos (HETE) denominados leucotrienos.^(1,2,10,11)

El leucotrieno LTB₄ es un potente agente quimiotáctico, sintetizado en células cebadas, neutrófilos y, posiblemente, en linfocitos; activa la agregación y adhesión de los leucocitos al endotelio venular, la generación de radicales libres del oxígeno y la liberación de enzimas lisosomales. El leucotrieno LTC₄ se forma en monocitos, neutrófilos y células cebadas, su acción es vasoconstrictora y espasmogénica sobre el músculo liso.^(1,10,11)

Las lipoxinas A₄ y B₄ (LXA₄ y LXB₄, respectivamente) se generan por la acción de la 12-lipooxigenasa plaquetaria sobre la LTA₄ de los neutrófilos. Las lipoxinas inhiben la quimiotaxis y adhesión de los neutrófilos, pero estimulan la adhesión de los monocitos. La LXA₄ estimula la vasodilatación y atenúa las acciones vasoconstrictoras estimuladas por el LTC₄.^(1,10,11)

1.4.4 El Factor Activador de Plaquetas (FAP). Es un fosfolípido con un esqueleto de glicerol, además de un ácido graso de cadena larga en la posición A, un sustituto de cadena corta en la posición B y una parte de fosfatidilcolina. Las plaquetas, basófilos, células cebadas, neutrófilos, monocitos, macrófagos y células endoteliales elaboran FAP. El FAP produce vaso y broncoconstricción, induce la adhesión leucocitaria al endotelio, la quimiotaxis, la desgranulación y el estallido oxidativo.^(1,10,11)

1.4.5 Las Citocinas y las Quimiocinas. Las citocinas son proteínas producidas por diversos tipos celulares, actúan regulando la función de otros tipos de células. Las quimiocinas son citocinas que estimulan la quimioquinesis (movimiento leucocitario) y la quimiotaxis.^(1,2,10,11)

Los macrófagos activados producen interleucina-1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α), el FNT- β es producido por linfocitos T activados; la IL-1 es producida por otros tipos celulares. Inducen la síntesis de moléculas de adhesión endotelial y de otras citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento, eicosanoides y el óxido nítrico (NO). El FNT favorece la agregación y cebado de neutrófilos. La IL-1, el FNT y la IL-6 inducen las respuestas de fase aguda que acompañan a la infección o a los traumatismos.^(1,2,10,11)

Las quimiocinas son una superfamilia de proteínas cuya acción principal es activar e inducir la quimiotaxis de tipos específicos de leucocitos. Actúan sobre fibroblastos y células musculares lisas y sobre las células progenitoras hematopoyéticas. Se clasifican en cuatro clases principales.⁽¹⁾

- a) las quimiocinas C-X-C o α , que actúan sobre los neutrófilos, con la IL-8 como prototipo.
- b) Las quimiocinas C-C o β , donde se incluyen la proteína de quimioatracción de monocitos (MCP-1), la eotaxina, la proteína inflamatoria de macrófagos de tipo 1 α (MIP-1 α) y la RANTES.
- c) Las quimiocinas C o γ , son relativamente específicas de los linfocitos, p. ej., la linfotactina.
- d) Las quimiocinas CX3C, donde la fractalcina es un ejemplo de éstas. Representa una molécula de adhesión y un agente quimiotáctico.

1.4.6 El Óxido Nítrico (NO). Es un gas soluble sintetizado por CE, macrófagos activados, linfocitos, neutrófilos y por grupos neuronales específicos. Se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular, NADPH y otros cofactores, por acción enzimática de la óxido nítrico sintasa (NOS). El NO es un potente vasodilatador, además de reducir la agregación y adhesión plaquetaria, inhibe ciertos efectos inflamatorios provenientes de las CC y regula el reclutamiento de leucocitos. Puede contribuir al daño tisular asociado con la inflamación a través de sus propiedades citostáticas y citotóxicas.^(1,2,10,11,38,43)

1.4.7 Los Constituyentes Lisosomales de Leucocitos. Los neutrófilos contienen gránulos específicos (secundarios) con lisozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador de plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina. Los gránulos azurófilos (primarios) contienen mieloperoxidasa, lisozima, defensinas, hidrolasas ácidas y proteasas neutras. Éstas últimas pueden degradar colágeno, membranas basales, fibrina, elastina y cartílago, provocando destrucción tisular existente en procesos inflamatorios purulentos y deformantes, también pueden liberar anafilotoxinas, desdoblado C3 y C5 directamente. Los monocitos y los macrófagos contienen hidrolasas ácidas, colagenasa, elastasa, fosfolipasa y activador de plasminógeno.^(1,2)

1.4.8 Los Radicales Libres Derivados del Oxígeno. El anión superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^-), son las principales especies que se producen en el interior celular, además de poder combinarse con el NO para formar productos intermedios reactivos del nitrógeno. En concentraciones mayores, la liberación de estos mediadores, puede producir lesión endotelial, inactivación de las antiproteasas, y lesión de otros tipos celulares. El suero, los líquidos tisulares y las células diana poseen antioxidantes, que protegen de los efectos potencialmente perjudiciales.^(1,2)

1.4.9 Los Neuropeptidos. Son péptidos de tamaño pequeño, como la sustancia P y la neurocinina A, que se encuentran en los sistemas nervioso central y periférico. La sustancia P hace posible la transmisión de señales dolorosas, regula la tensión arterial y la estimulación de la secreción por parte de células inmunitarias y endocrinas, además de ser un potente mediador del incremento de la permeabilidad vascular.^(1,2,10,11)

1.5 FÁRMACOS ANTIINFLAMATORIOS

Las actividades antiinflamatoria, analgésica y antipirética tienen mecanismos subyacentes similares. Los corticoesteroides poseen actividad antiinflamatoria potente sin ser analgésicos; el paracetamol y los analgésicos narcóticos tienen efecto analgésico con escasa actividad antiinflamatoria; la aspirina y demás AINE poseen ambas actividades. Los fármacos antiinflamatorios se utilizan para tratar desórdenes que originan inflamación, pirexia y dolor de cualquier origen, sea condiciones reumáticas, gota, dismenorrea, enfermedades neoplásicas y cefaleas.⁽³⁾

Estudios epidemiológicos implican a diversos AINE de tener un riesgo relativo alto de producir sangrado gastrointestinal. También se han implicado en elevación de la presión sanguínea. Los AINE son irritantes de la mucosa gástrica, son nefrotóxicos en grado variable y pueden originar hepatotoxicidad^(29,30,31,33). El diclofenaco, metotrexato y paracetamol en combinación con alcohol producen hepatotoxicidad. Se presenta perforación intestinal debido al diclofenaco, indometacina y otros AINE. Los AINE disminuyen la sensibilidad de los vasos a la bradicinina e histamina, afectan la producción de linfocina en los linfocitos T y revierten la vasodilatación.^(3,13)

Los AINE tienden a diferenciarse con base a su toxicidad y relación costo-eficacia. Se han desarrollado AINE COX2-selectivos y AINE ligados a donadores de NO con tolerancia gástrica mayor. Diferentes AINE muestran potencias variables contra la COX1 comparadas con la COX2 (radios inhibitorios COX2/COX1), y esto explica las variaciones en sus efectos secundarios y sus dosis terapéuticas (fig. 3). Los fármacos con alta potencia para COX2, tendrán actividad antiinflamatoria con menos efectos secundarios en estómago y riñón.^(3,13,32)

La indometacina es un derivado del indol, inhibidor potente no selectivo de la COX, pudiendo inhibir la fosfolipasa A y C, reduce la migración de neutrófilos y disminuye la proliferación de linfocitos T y B.⁽³⁾

La indometacina se indica comúnmente para tratar la gota y la espondilitis anquilosante, y como preparado oftálmico se utiliza para la inflamación conjuntival. A dosis altas, se suspende en dos tercios de los pacientes, debido a los efectos secundarios/reacciones adversas. Los efectos a nivel gastrointestinal son el dolor abdominal, diarrea, hemorragia gastrointestinal y pancreatitis. La cefalea, mareos, confusión y depresión se presentan hasta en la cuarta parte de pacientes medicados. Cuadros psicóticos y trastornos hepáticos son raros. Se han reportado trombocitopenia, y anemia aplásica, además de hiperpotasemia. Se ha observado necrosis papilar renal. Su uso debe evitarse en pacientes con pólipos nasales o angioedema, y en pacientes asmáticos se puede desencadenar crisis.⁽³⁾

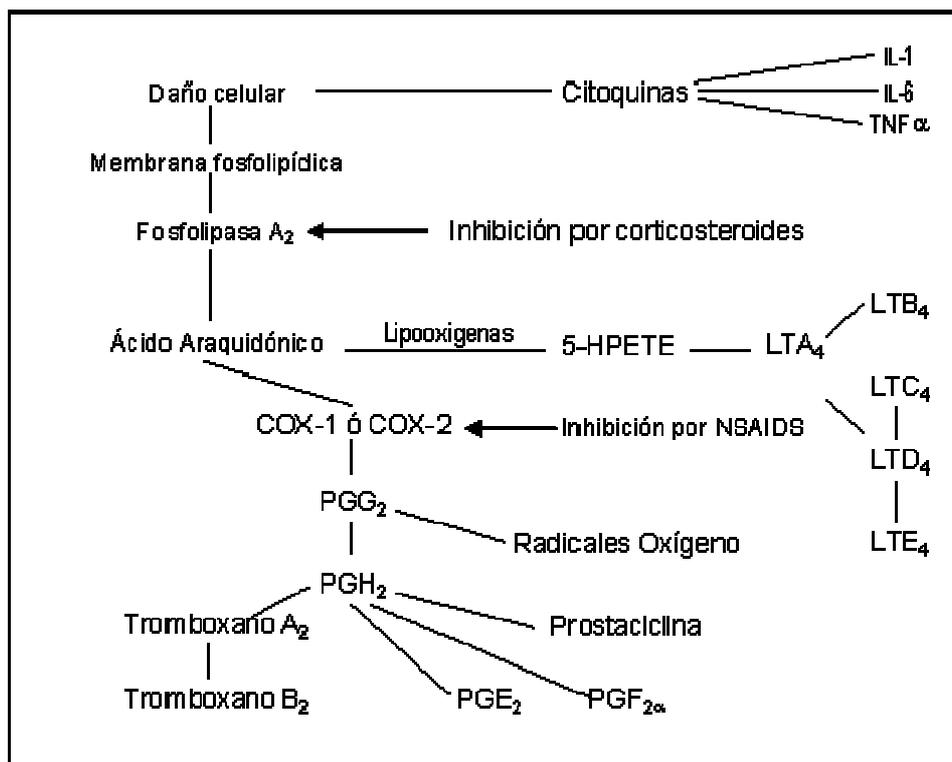


Figura 3. Representación esquemática de los diversos componentes que intervienen en la reacción inflamatoria.(54)

1.6 LA FARMACOGNOSIA

La palabra farmacognosia aparece en los inicios del siglo XIX, para designar a la disciplina relacionada con las plantas medicinales. El término griego “pharmakon” (fármaco) y “gignosco” (tener conocimiento de) son sus raíces etimológicas.^(4,14)

El papel universal de las plantas en el tratamiento de las enfermedades está ejemplificado en su empleo en los sistemas principales de medicina. El conocimiento de los efectos medicinales, narcóticos y demás propiedades de las plantas se ha pasado de generación en generación, principalmente en las regiones del África tropical, Norte y Sudamérica, y países del Pacífico.^(4,14)

Gran parte de la medicina tradicional mexicana es el resultado de la reconciliación de los conocimientos médicos aztecas y las teorías médicas europeas.

En los inicios del siglo XX, el estudio de las plantas se concentró en la descripción e identificación de fármacos, tanto en especímenes completos, como en polvos; y en otro aspecto, en su historia, comercio, recolección, preparación y almacenamiento. Esto sigue siendo base fundamental para la identificación farmacopeica y los propósitos de control de calidad.⁽⁴⁾

Sin lugar a dudas, el reino vegetal posee muchas especies que contienen sustancias con valor medicinal que esperan a ser descubiertas. Un gran número de plantas son constantemente analizadas en búsqueda de algún valor farmacológico (particularmente por sus actividades antiinflamatorias, hipotensivas, hipoglucemiantes, amebicidas, anticonceptivas, citotóxicas, antibióticas y anti-Parkinsonianas).^(4,44)

A principios del siglo XIX se aisló el alcaloide narcotina, le siguieron la morfina, estricnina, emetina y posteriormente, muchos más. Entre 1813 y 1823 se elucidó la naturaleza química de los ácidos grasos y ácidos grasos mixtos.⁽⁴⁾ Hasta hace poco los llamados “principios activos” como los alcaloides o glicósidos específicos, eran los que llamaban la atención de los farmacólogos; ahora a muchos otros constituyentes de plantas asociadas con la medicina herbolaria se les realiza una investigación más detallada.

La investigación fitoquímica de una planta puede involucrar la autenticación de la misma y extracción del material, separación y aislamiento de los constituyentes de interés, caracterización de los compuestos aislados, investigación de las vías biosintéticas de un compuesto en particular, y evaluaciones cuantitativas de sus posibles actividades farmacológicas.^(4,17,18,44)

Todas las plantas deberán autenticarse. La elección del procedimiento de extracción dependerá de la naturaleza del material y de los componentes ha aislar. La extracción puede desarrollarse por maceración repetida con agitación, precolación o extracción continua (p. ej. en un extractor Soxhlet).⁽⁷⁾

La maceración implica el sumergir la planta triturada ó molida en un disolvente apropiado, filtrar y concentrar el extracto. En la precolación se utiliza un disolvente caliente que pasa a través de la muestra. La extracción en Soxhlet es una forma de precolación continua. La destilación a vapor se utiliza para aceites volátiles. La decocción se hace ebulviendo el material que contenga sustancias solubles en agua y estables al calor. Se usa comúnmente con ramas, raíces, cortezas, etc. Las infusiones se realizan si hay componentes solubles en agua, se deja humedecer el material y después se le agrega agua ebulviendo, después de colarse, se refrigera o se congela.^(7,16)

La separación de la fracción del extracto donde se encuentre la actividad biológica se realiza comúnmente con el método de cromatografía, utilizando columnas de silica gel o shepadex, con cromatografía en capa fina o en papel. La cromatografía es la separación de solutos en una mezcla de acuerdo a su afinidad con la fase estacionaria, a través de la cual cruza una fase móvil. Los mecanismos por los cuales puede ocurrir tal separación, pueden ser la adsorción, partición, difusión molecular o electroforesis, o una combinación entre éstas.⁽⁷⁾

La capacidad para utilizar el tamizado automático de alto rendimiento para las actividades biológicas alienta a la industria farmacéutica para renovar su interés en las plantas como fuente de fármacos nuevos. El uso de la robótica y formatos miniaturizados de tamizaje permite el análisis de más de 150,000 muestras en 2-3 semanas.⁽¹⁵⁾

1.7 LA FITOQUÍMICA

Dentro de los 25 medicamentos más vendidos en el mundo en 1991, más de la mitad tuvieron su origen en productos naturales.⁽¹⁵⁾

La *Helietta parvifolia* (Barreta) fue estudiada como parte de la búsqueda de agentes anticancerosos, en un primer momento^(34,35); posteriormente ha sido objeto de estudio en México, como agente antimicótico de uso agrícola, sin esclarecer la presencia o ausencia de tal actividad, ni los métodos que se utilizaron para determinar la actividad antimicótica.

Las jerarquías taxonómicas son: reino, división, subdivisión, clase, orden, suborden, familia, subfamilia, tribu y por último género-especie. El género y especie son vocablos latinizados, citados juntos, escritos en cursiva o subrayados, el género con mayúscula inicial y la especie minúscula inicial, en seguida se menciona el botánico que clasificó a la planta.⁽⁶⁾

Dentro de la amplia terminología en la descripción de una planta se encuentran los términos que nos ayudan a caracterizar al espécimen: raíces, tallos, hojas, inflorescencia, flores y frutos, si existieren.

Al recolectar ejemplares, conviene sacar fotografías en donde se observe al espécimen en su ambiente; se harán anotaciones sobre la localidad, señalando latitud, longitud y altitud, el nombre común de la planta, usos y propiedades conocidas en el lugar, indicando si es árbol, arbusto o hierba, aspecto de las hojas y distribución de las flores.⁽⁶⁾

Después de la colecta del material, se le asigna un número, se coloca entre dos hojas de papel periódico, cartones, y dos rejillas de madera que deberán apretarse con correas; para lograr el secado del material se debe cambiar las hojas de papel periódico de 2 a 5 veces, dependiendo de la cantidad de agua que haya contenido el material. Se deberá recolectar tallo, hojas, flores y semillas; recolectar ejemplares no destruidos por insectos.⁽⁶⁾

1.8 EL MATORRAL SUBMONTANO

Es una comunidad arbustiva a veces muy densa, formada por especies inermes o a veces espinosas, caducifolias por un breve período del año, se desarrolla entre los matorrales áridos y los bosques de encino y la selva baja caducifolia a altitudes de 1,500 a 1,700 metros sobre el nivel del mar, principalmente en las laderas bajas de ambas vertientes de la Sierra Madre Oriental, desde Querétaro e Hidalgo hacia el norte, penetrando más allá de la frontera política con los Estados Unidos de Norteamérica. Esta comunidad crece dentro de una zona donde la precipitación es inferior a 700 milímetros (mm) anuales, con una temperatura media anual superior a los 23° C. Se encuentra en laderas y planicies con suelos de texturas finas y ocupa pequeñas extensiones de tierra. Fisonómicamente, corresponde al matorral parvifolio propuesto por Miranda y Hernández X; y según Rzedowski, es lo que él denomina matorral xerófilo.

La fisonomía de esta comunidad la proporciona el estrato arbustivo superior, cuya altura varía entre 2.5 a 5 m . Lo caracteriza *H. parvifolia* (Barreta), rutácea inerme, que es la única dominante (fotografía 1).^(20,21,22,23,24,25,28)

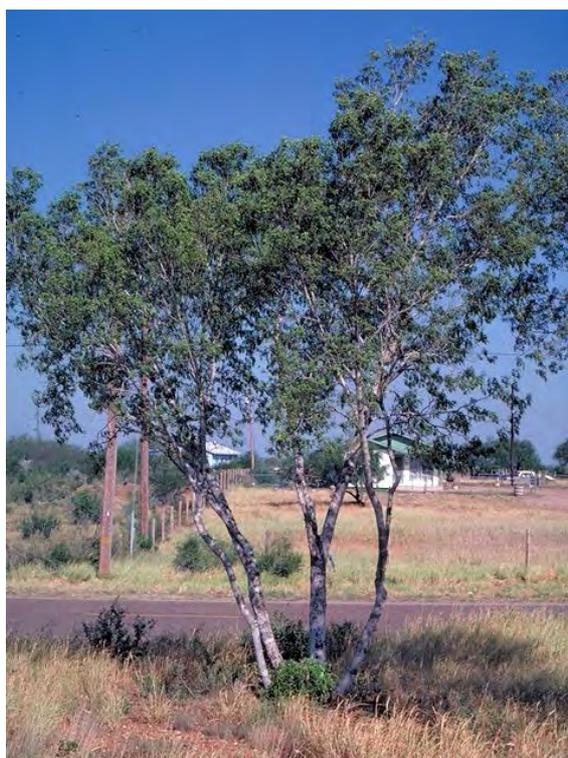
Entre las plantas de uso tradicional se encuentra la *H. parvifolia* (Barreta), la cual tiene tanto referencias de uso empírico para uso antiinflamatorio en animales de granja, como de uso en la conservación de semillas en el ámbito agrícola. La *H. parvifolia* (Barreta) se ha incluido en estudios para determinar actividad antimicótica en la preservación de granos de maíz y su acción en contra de la mosca de la fruta.^(49,50)

Con base a la información anterior, es importante determinar la actividad antimicótica de la *H. parvifolia* (Barreta), ya que de mostrar tal actividad, su utilización impactaría de forma positiva en el medio agrícola, puesto que se estima que en México se pierde de 25 al 30% de los granos a causa de insectos, roedores y hongos.⁽¹⁹⁾ La pérdida puede deberse a la presencia de micotoxinas. Entre las micotoxinas más conocidas se encuentran las aflatoxinas producidas por *Aspergillus flavus*; aflatoxinas que son carcinogénicas, con afectación al hígado y pulmón, principalmente.

1.8.1 Descripción botánica de *Helietta parvifolia* (Barreta).

Helietta parvifolia es un matorral o árbol de 1.5-12 m; con ramas de color gris o café pálido, frecuentemente pubescente a glabro, estriado, con muchas lenticelas color crema. Las hojas son blancas-pubescentes cuando son jóvenes, al principio glabrescentes o libres y pubérola sobre el ápex del peciolo; el peciolo mide 0.5-1.5 centímetros (cm), las hojas poseen puntos negros en ambas superficies o sólo abaxialmente, de color verde-verde olivo, con el anverso lustroso, el reverso más pálido, sésiles, con margen completo. Inflorescencias: un monotirso de 1-3.5 cm de largo, brácteas triangulares agudas, abaxialmente pubescentes. Flores: 4-meros; pedicelo pubescente a subglabro, de 1.5-2 mm de largo.

Sépalos: ovalados, agudos, pubescentes, ciliados de 1 mm de largo, verdosos. Pétalos: color cremoso, oblongos, de 3.2-3.5 cm de largo, glabros, obtusos, de margen completo. Frutos: de 3-4 mericarpos, glabros; semilla elipsoide, de 5-10 mm de largo; alas ovaladas a oblongas o redondeadas, de 6-15 x 8-10 mm, cartáceo, con venas ligeramente prominentes. ^(26,27)



Fotografía 1. *Helietta parvifolia* denominada Barreta, en una imagen captada en la comunidad en donde se recolectó el espécimen.(55)

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los principales problemas de salud en el mundo son las enfermedades inflamatorias crónicas, varios medicamentos se han desarrollado para tratar estos desórdenes en donde se busca disminuir y/o eliminar los efectos secundarios graves. La necesidad de encontrar nuevos fármacos antiinflamatorios enfoca los esfuerzos a la síntesis orgánica tanto como a la investigación dirigida a la búsqueda y aislamiento de sustancias que contengan una posible actividad antiinflamatoria.

El uso de plantas medicinales en el medio rural en México debe originar un interés dentro de los profesionales de la salud, para que realicen más estudios que permitan determinar su efectividad y seguridad; así como promover la búsqueda de posibles principios activos, y difundir los resultados de éstas investigaciones a la población, con la finalidad que conozcan si tales remedios realmente tienen el efecto que se le ha atribuido y que su uso no les genere un daño a la salud.

La *Helietta parvifolia* (Barreta) empíricamente, se ha usado principalmente en el tratamiento de las heridas en caballos, como antiinflamatorio; además de usarse en forma de polvo para proteger semillas del ataque de hongos. No obstante, a la fecha no se tienen referencias de estudios que prueben su efecto antiinflamatorio ni antifúngico en ensayos *in vitro* o *in vivo*.

3. HIPÓTESIS

La administración de un extracto acuoso de corteza de *H. parvifolia* (Barreta) disminuirá la respuesta inflamatoria inducida, en un modelo de edema en cojinete plantar de ratón.

En un ensayo in vitro, en pozo en agar, se inhibirá el crecimiento de una cepa de *Aspergillus flavus*, al utilizar varios extractos acuosos de corteza de Barreta.

4. OBJETIVO GENERAL

Comprobar el efecto antiinflamatorio de un extracto acuoso de corteza de *H. parvifolia* (Barreta) en un modelo in vivo, y el efecto antimicótico in vitro.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar la actividad antiinflamatoria de un extracto acuoso de corteza *H. parvifolia* (Barreta), usando el modelo de carragenina.
- 2.- Verificar si el extracto acuoso de corteza de *H. parvifolia* (Barreta) posee actividad antimicótica, utilizando la técnica de pozos de agar.

6. DISEÑO DEL ESTUDIO

Tipo de estudio. El estudio realizado fue longitudinal y prospectivo.

Población de estudio. Ratones CD1, Cepa de *Aspergillus flavus*.

Criterios de inclusión. Ratones hembras. Peso de ratones de 25-30 g. Sin lesiones.

Criterios de exclusión. Ratones macho y/o con lesiones.

Criterios de eliminación. Ratones a los cuales se les inocule de manera inadecuada.

Variables independientes.

- Dosis del extracto.
- Dosis del control positivo (Indometacina).
- Concentración del hongo en la placa de inoculación.

Variables dependientes.

- Grosor de la lesión inflamatoria.
- Milímetros de inhibición fúngica.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

Material vegetal. La *H. parvifolia* (Barreta) se colectó en el mes de junio de 2007, en la comunidad de “El Tanque”, Xicoténcatl, Tamaulipas. Una muestra de la planta fue depositada en el herbario IMSSM*, al cual se le asignó el número de registro 15235 y fue autenticada por la M. en C. Abigail Aguilar Contreras, jefa del herbario. Los extractos utilizados fueron obtenidos y proporcionados por el M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez en el L-312 de la FES Zaragoza, UNAM.

*Abreviatura reconocida por la Asociación Internacional de Taxonomía Vegetal.

Material biológico. Ratones hembra CD1 (25-30g).

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

Sangre obtenida de voluntarios, por venopunción; para obtener eritrocitos de los grupos sanguíneos A, B, O y Rh(+).

Reactivos.

- a) Carragenina tipo IV.
- b) Goma Gathi.
- c) Control positivo. Indometacina (SOLTACINA, Solara)
- a) Control positivo. Terbinafina (LAMISIL, Novartis Farmacéutica).
- b) Agar Sabouraud-Dextrosa (DIBICO).

Equipos.

- c) Cánula oral.
- d) Tubos de 12x75mm (Falcon, Becton-Dickinson Co.)
- e) Jeringa 1mL.
- f) Gradilla.
- g) Vasos de precipitados (50mL).
- h) Cajas Petri desechables chicas.
- i) Placa de ELISA (96 pocillos).

- j) Vórtex (Scientific Industries, Inc., modelo K-550G)
- k) Pipeta automática (Finnpipette, de 20-400 microlitros)
- l) Centrífuga.
- m) Tubos para centrífuga.

Instrumentos.

- n) Micrómetro (Scala, de 0-25 mm, con divisiones de 0.01 mm)
- o) Balanza analítica (OHAUS, modelo EP214C)

Método.

Obtención del extracto acuoso de corteza de *H. parvifolia* (Barreta).

Un primer extracto acuoso se obtuvo a partir de 750 g de corteza de la planta y se extrajo a reflujo durante 3 horas, se filtró y se eliminó el disolvente con bomba de alto vacío; un segundo extracto acuoso se obtuvo a partir de 250 g de la misma corteza, a temperatura ambiente, se filtró y se eliminó el disolvente con bomba de alto vacío.

Ensayo antiinflamatorio utilizando el modelo de carragenina.

A los seis grupos de ratones (con n=6) en ayuno de 16h, con acceso libre de agua, se les administró oralmente, mediante cánula: 20, 40, 80 y 160 mg/kg del extracto de *H. parvifolia* (Barreta). El grupo de referencia recibió Indometacina (10 mg/kg, vía oral) disuelta en goma Gathi al 1%, el grupo control negativo recibió solución salina fisiológica (10mL/kg, vía oral) de la manera como se muestra en la fotografía 2. Una hora después se inyectaron 50 microlitros (μL) de carragenina al 1% en el cojinete plantar de la pata derecha trasera, como se indica en la fotografía 3. El grosor de la pata se midió a los tiempos 0, 1, 2 y 3 horas después de la inyección de la carragenina, utilizando un micrómetro, en la forma como se muestra en la fotografía 4. Después se sacrificaron a los ratones en cámara de éter.⁽⁴⁶⁾ Se utilizó la siguiente ecuación para el cálculo del porcentaje de inhibición de la inflamación:

$$\% \text{Inhibición} = \frac{[(Ct - Co)_{\text{control}} - (Ct - Co)_{\text{tratado}}]}{(Ct - Co)_{\text{control}}} \times 100$$

en donde Ct es el tamaño del cojinete plantar 3 horas después de la inyección y Co es el tamaño del cojinete plantar antes de la inyección.



Fotografía 2. Técnica de inoculación vía oral mediante cánula, del extracto acuoso de Barreta.



Fotografía 3. Técnica de inyección de carragenina en el cojinete plantar.



Fotografía 4. Utilización del micrómetro para medir el grosor del edema.

Determinación de la actividad antifúngica.

Se preparó el medio (Sabouraud-Dextrosa) para el crecimiento del hongo (*A. flavus*), en cajas de Petri. Se hizo un pocillo al centro de la caja, en la forma en que se muestra en la fotografía 5. Se inoculó en cada medio la cepa del hongo, preparándose una disolución del hongo en fase de esporulación, ajustando en Cámara de Neubauer a una concentración de 2×10^6 propágulos/mL.⁽¹⁹⁾ Se inocularon los pocillos con 50 μ L de: fármaco (20 μ g/50 μ L), extractos acuosos (5 mg/10 mL o 5 mL/10 mL) y solución salina fisiológica (SS), que anteriormente fueron filtrados mediante filtros de 0.22 μ m estériles. Se incubaron a TA durante 96 horas. Se les midió el halo de inhibición de crecimiento al finalizar la incubación.



Fotografía 5. Caja de Petri con el medio de crecimiento para hongos (Sabouraud-Dextrosa) con pocillo central de inoculación de las muestras.

8. RESULTADOS Y SU INTERPRETACIÓN

Para mostrar los resultados de esta investigación se hará con base en los objetivos específicos.

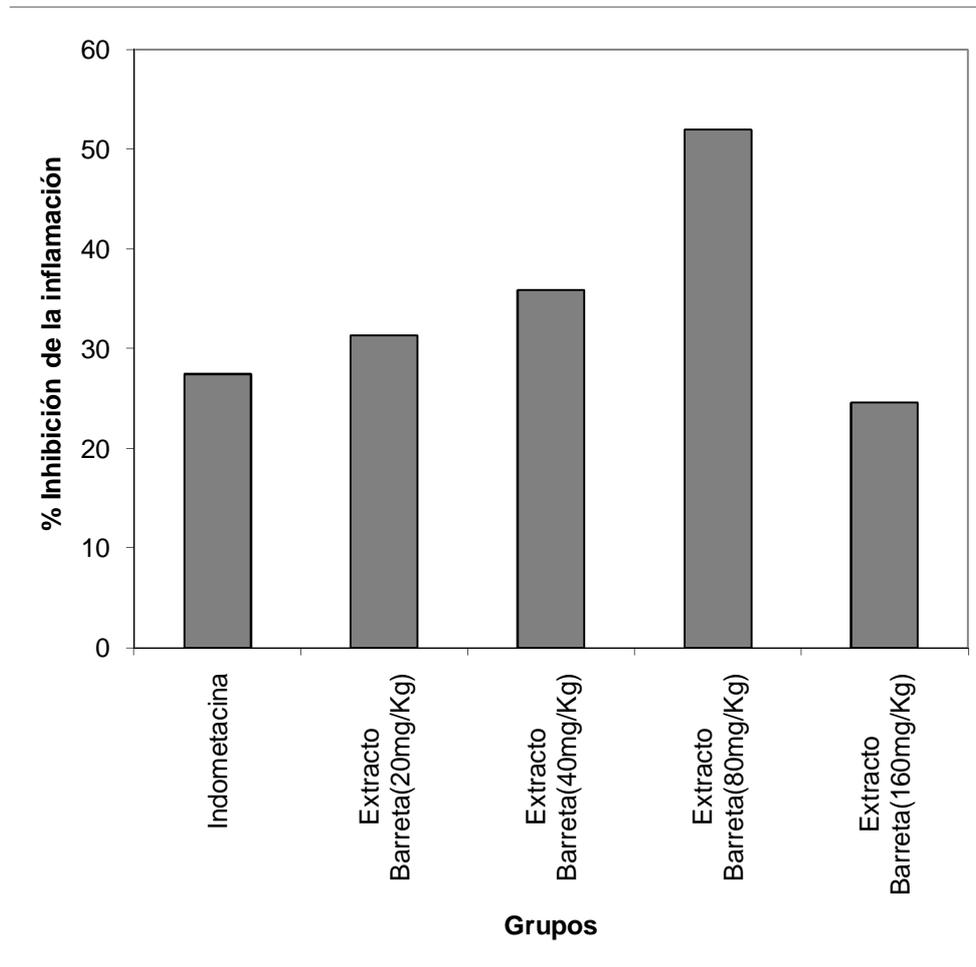
8.1 El primer objetivo específico nos pide “Determinar la actividad antiinflamatoria de un extracto acuoso de *H. parvifolia* (Barreta), usando el modelo de carragenina.” Los resultados y su interpretación son los siguientes:

En primer lugar se presenta el resultado de inhibición porcentual de las diferentes concentraciones del extracto acuoso de *H. parvifolia* (Barreta) y de la Indometacina, utilizando la ecuación del porcentaje de inhibición para hacer el cálculo.

GRUPOS	% INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN
SS	----
INDOMETACINA (10mg/kg)	27.4
EXTRACTO BARRETA (20mg/kg)	31.4
EXTRACTO BARRETA (40mg/kg)	35.9
EXTRACTO BARRETA (80mg/kg)	52
EXTRACTO BARRETA (160mg/kg)	24.6

Tabla 1. Porcentaje de inhibición calculado para los diferentes grupos

Como se puede observar en la tabla 1, el extracto acuoso de *H. parvifolia* (Barreta), presenta un efecto antiinflamatorio, en el modelo utilizado aquí. Se observa una relación dosis-respuesta, exceptuando la dosis de 160 mg/kg, en la cual su efecto decrece de manera importante, llegando a ser menor, en comparación con la dosis mínima de trabajo (20 mg/kg).



Gráfica 1. Porcentaje de inhibición de la inflamación de los diferentes grupos.

En la gráfica 1, se puede apreciar con facilidad el efecto antiinflamatorio del extracto a diferentes concentraciones, medido como porcentaje de inhibición de la inflamación. No debe compararse contra el efecto obtenido con la Indometacina, puesto que este fármaco no está a prueba, sino que funciona como un testigo positivo, además de que la dosis empleada en el ensayo puede variar según las necesidades de éste.

Debido a la inesperada caída del efecto antiinflamatorio en la dosis de 160 mg/kg, se muestran en la siguiente tabla los datos que generó el ajuste de las dosis por el método de Reed-Muench^(47,48) (Tabla 2) que sirve para calcular una dosis efectiva media:

Dosis (mg/kg)	Log Dos.	% Inhib.	Respuesta	No Resp.	Respuesta Acum.	No Resp. Acum	Total Acum	% Corregido	U/Pro-bit
20	1.3	31.4	3.14	6.86	3.14	18.06	21.2	14.8	3.95
40	1.6	35.9	3.6	6.4	6.74	11.2	17.94	37.5	4.68
80	1.9	52	5.2	4.8	11.94	4.8	16.74	71.3	5.56

Tabla 2. Resultados de la técnica de Reed-Muench.

Se presenta la fórmula y el cálculo para determinar la Dosis Efectiva media (DE_{50}) utilizando los datos de la tabla anterior:

$$LogDE_{50} = LogDosis \downarrow 50\% + \frac{(50\% - \% \downarrow 50\%)}{(\% \uparrow 50\% - \% \downarrow 50\%)} \times factordosis$$

$$LogDE_{50} = 1.6 + \left[\frac{50 - 37.5}{71.3 - 37.5} \times 0.3 \right]$$

$$DE_{50} = 51.4 \text{ mg/kg}$$

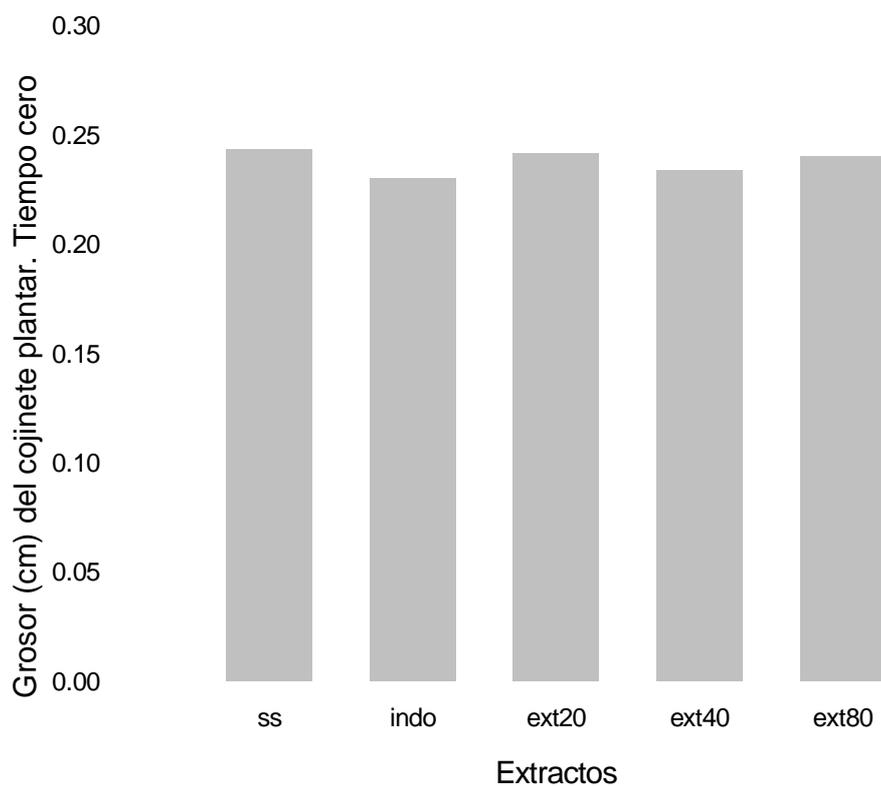
De estos resultados se puede inferir que existe una relación Dosis-Respuesta en la administración vía oral del extracto acuoso de Barreta, en el modelo de edema en ratón utilizado aquí; además se encontró que a dosis mayores a 80 mg/kg, el porcentaje de inhibición de la inflamación, decrece en comparación con los valores obtenidos a concentraciones de 20 y 40 mg/kg.

A continuación se muestran las tablas y gráficas con sus valores de media y desviación estándar con un $\alpha = 0.05$; con el logaritmo base 10 (Log^{10}) de las mediciones desde el tiempo cero hasta la tercera hora, contra los extractos de *H. parvifolia* (Barreta) a 20, 40 y 80 mg/kg, Indometacina y SS.

GRUPOS	Media	Error estándar
SS	0.2436	4.9143e-3
Indometacina	0.2302	3.6370e-3
Extracto Barreta(20 mg/kg)	0.2419	4.1373e-3
Extracto Barreta(40 mg/kg)	0.2339	4.9146e-3
Extracto Barreta(80 mg/kg)	0.2404	4.4646e-3

Tabla 3. Datos obtenidos en hora cero. No existe diferencia de las medias con un nivel de significancia $\alpha = 0.05$.

En la gráfica 2 se muestran los grosores de las patas de todos los grupos utilizados. En el inicio del experimento no se encontraron diferencias significativas entre las mediciones de los grosores de los cojinetes plantares.



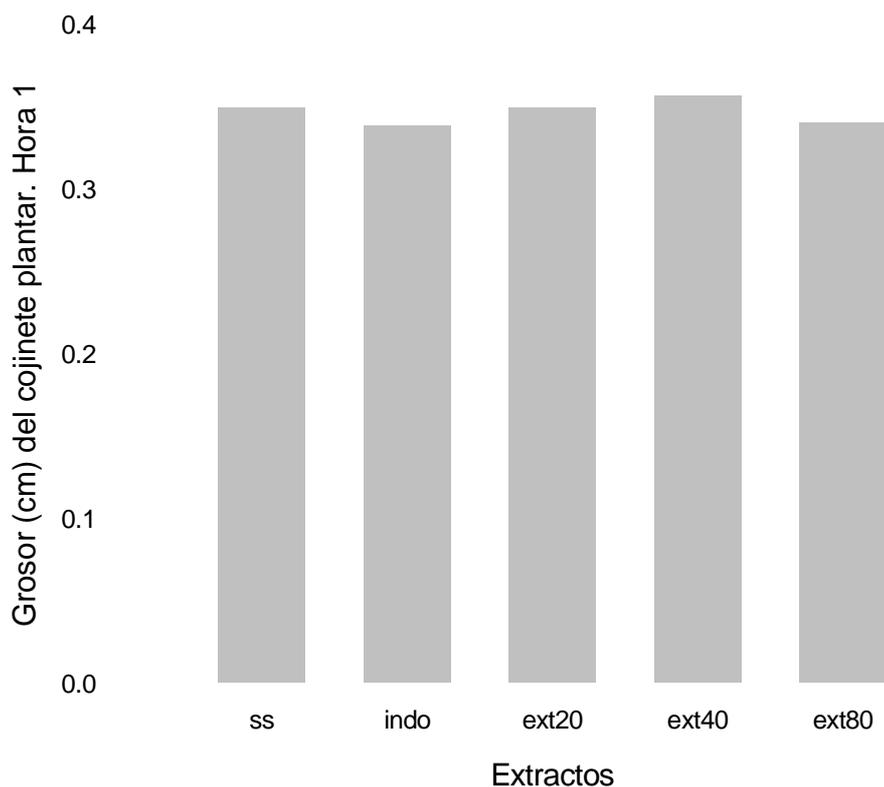
Gráfica 2. Grosor del edema en cojinetes plantares, medido en cm, al tiempo cero.

Se muestra en la tabla 4, a la hora 1, que el efecto antiinflamatorio del extracto aun no presentaba actividad, en sus 3 concentraciones, ni en el testigo positivo.

GRUPOS	Media	Error estándar
SS	0.3496	0.0104
Indometacina	0.3385	0.0101
Extracto Barreta(20 mg/kg)	0.3498	7.4392e-3
Extracto Barreta(40 mg/kg)	0.3566	0.0145
Extracto Barreta(80 mg/kg)	0.3403	8.1493e-3

Tabla 4. Datos obtenidos en la hora 1. No existe diferencia de las medias con un nivel de significancia de un $\alpha=0.05$

A la hora de iniciado el proceso inflamatorio, las medidas de los grosores de los cojinetes plantares no muestran una diferencia significativa.



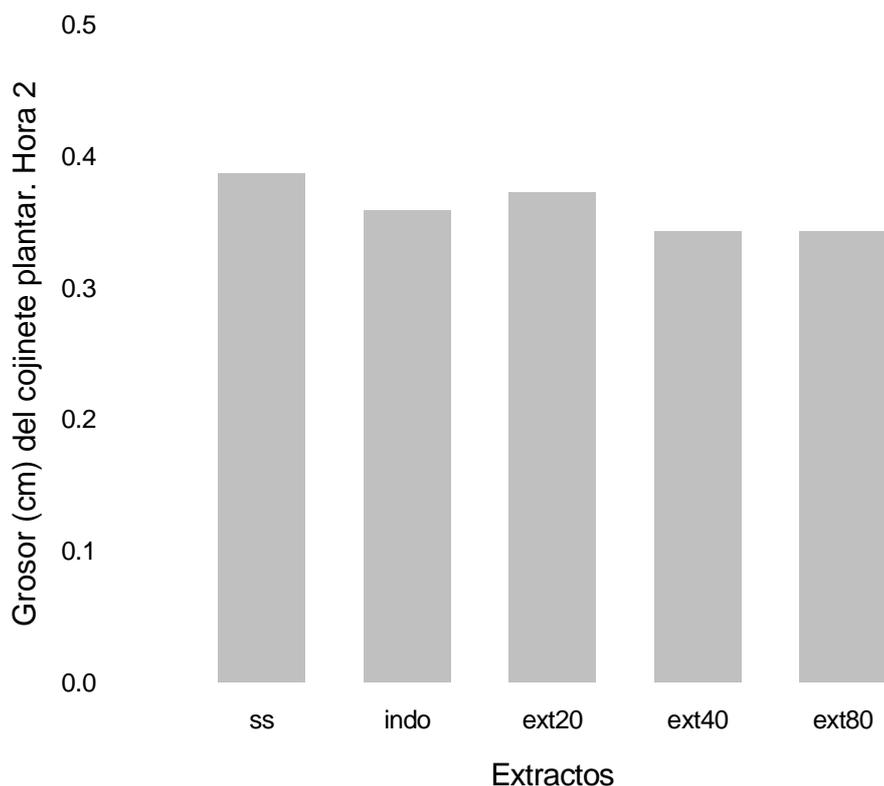
Gráfica 3. Grosor del edema en los cojinetes plantares, medido en cm, a la hora uno.

A continuación se muestra la tabla 5, de los resultados a la hora 2, en donde se observa que existe una diferencia significativa entre las medidas de los grosores de los cojinetes plantares, en las concentraciones de 40 y 80 mg/kg.

GRUPOS	Media	Error estándar
SS	0.3869	0.0109
Indometacina	0.3587	9.8714e-3
Extracto Barreta(20 mg/kg)	0.3722	6.8548e-3
Extracto Barreta(40 mg/kg)*	0.3430	0.0110
Extracto Barreta(80 mg/kg)*	0.3431	6.5525e-3

Tabla 5. Datos obtenidos en la hora 2. *La diferencia de las medias es significativa a $\alpha=0.05$

En la gráfica 4 es observable una disminución en los grosores en los grupos de 40 y 80 mg/kg, en comparación con el testigo negativo.



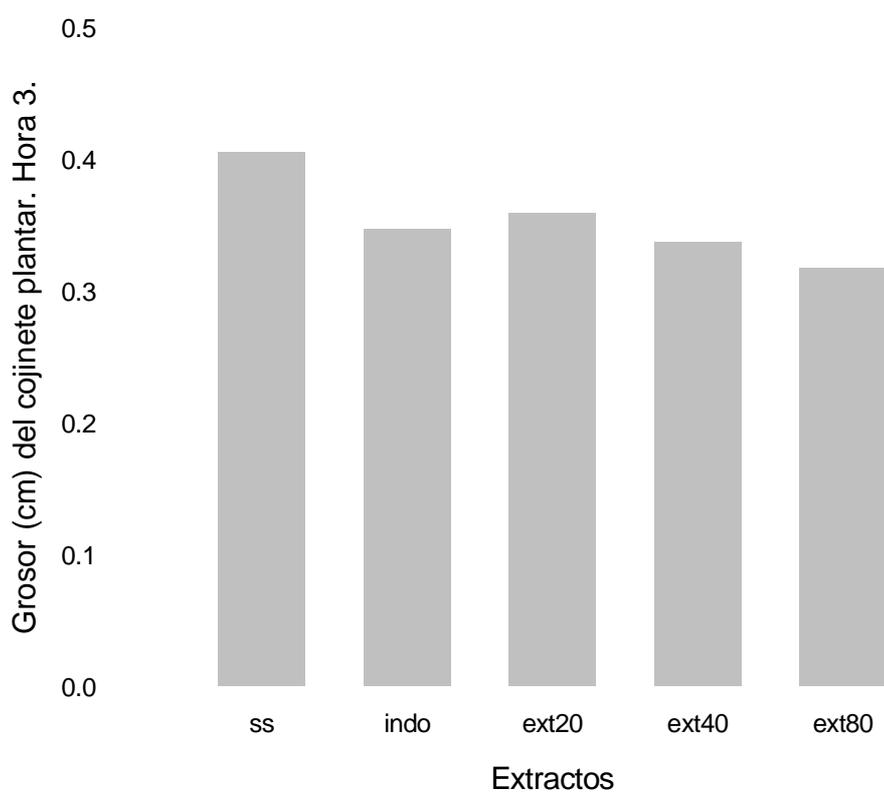
Gráfica 4. Grosor del edema en los cojinetes plantares, medido en cm, a la hora dos.

Se muestra a continuación la tabla 6, para la hora 3, en donde las medidas de los grosores nos indican que se mantienen las diferencias significativas del extracto de *H. parvifolia* (Barreta) a 40 y 80 mg/kg.

GRUPOS	Media	Error estándar
SS	0.4055	0.0103
Indometacina	0.3473	0.0120
Extracto Barreta(20 mg/kg)	0.3595	0.0111
Extracto Barreta(40 mg/kg)*	0.3376	0.0168
Extracto Barreta(80 mg/kg)*	0.3180	0.0145

Tabla 6. Datos obtenidos en la hora 3. *La diferencia de las medias es significativa a $\alpha=0.05$

En la gráfica 5 se observa la disminución de los edemas; en este tiempo, se alcanzó el máximo efecto antiinflamatorio del extracto de *H. parvifolia* (Barreta) a sus diferentes concentraciones.



Gráfica 5. Grosor del edema en los cojinetes plantares, medido en cm, a la hora tres.

Los resultados fueron tratados estadísticamente mediante el paquete estadístico SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versión 12 para Windows.

Se realizaron varias pruebas de Análisis de Varianza (ANOVA), la primera con un $\alpha = 0.1$; con el logaritmo base 10 (Log^{10}) de las mediciones desde el tiempo cero hasta la tercera hora, contra los extractos con **20, 40 y 80 mg/kg**, Indometacina y SS, dando lo siguiente:

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LG10TI0	Between Groups	.004	4	.001	1.562	.215
	Within Groups	.017	25	.001		
	Total	.021	29			
LG10TI1	Between Groups	.008	4	.002	1.704	.181
	Within Groups	.028	25	.001		
	Total	.036	29			
LG10TI2	Between Groups	.007	4	.002	2.771	.049
	Within Groups	.015	25	.001		
	Total	.021	29			
LG10TI3	Between Groups	.008	4	.002	1.990	.127
	Within Groups	.024	25	.001		
	Total	.032	29			

Tabla 7. ANOVA con el logaritmo base 10 de los tres tiempos, contra los extractos con 20, 40 y 80 mg/kg, Indometacina y SS.

En los valores de significancia de la tabla 7 de ANOVA, LG10TI0, LG10TI1, LG10TI3, dando los siguientes valores $0.215, 0.181$ y $0.127 \geq 0.05$; no existiendo, por lo tanto, diferencias estadísticamente significativas. Para el LG10TI2 el valor es de $0.049 \leq 0.05$; existiendo diferencias estadísticamente significativas, por lo que se realizaron las pruebas Post Hoc por las técnicas de Tukey HSD y de Duncan^(51,52) como se muestran en las siguientes tablas 8 y 9.

INI2

droga	N	Subset for alpha = .1		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}				
ext40	11	-.4669		
ext80	11	-.4654		
indometacina	6	-.4462	-.4462	
ext20	11	-.4299	-.4299	
ss	11		-.4142	
Sig.		.183	.314	
Duncan ^{a,b}				
ext40	11	-.4669		
ext80	11	-.4654		
indometacina	6	-.4462	-.4462	
ext20	11		-.4299	-.4299
ss	11			-.4142
Sig.		.242	.331	.346

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.429.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla 8. Comparación entre los análisis Post Hoc de Tukey y Duncan con $\alpha = 0.1$; para el tiempo 2, con valores del logaritmo en base 10 de los datos originales.

Como se puede observar en la tabla anterior, mediante la prueba Post Hoc de Tukey HSD, con un $\alpha = 0.1$, para la hora 2; en el grupo 1, existe un comportamiento similar en los extractos del 20 al 80 mg/kg, incluyendo a la Indometacina, en el grupo 2, están agrupados la Indometacina, el extracto 20 mg/kg y SS. De lo anterior se puede aseverar que los extractos 40 y 80 mg/kg, y la Indometacina se separan del comportamiento mostrado por el testigo negativo.

Por la prueba Post Hoc de Duncan con $\alpha = 0.1$, se organizaron los datos en tres grupos; el primero incluye a los extractos 40 y 80 mg/kg e Indometacina, interpretándose que tienen un comportamiento antiinflamatorio similar; el segundo grupo incluye a la Indometacina y al extracto 20 mg/kg, interpretándose que tienen similar comportamiento; para el tercer grupo se tiene sólo al extracto 20 mg/kg y a SS, observándose que se comportan de manera similar.

INI3

droga	N	Subset for alpha = .1		
		1	2	3
Tukey HSD ^{a,b}				
ext80	11	-.5020		
ext40	11	-.4770		
indometacina	6	-.4605		
ext20	11	-.4464	-.4464	
ss	11		-.3934	
Sig.		.195	.233	
Duncan ^{a,b}				
ext80	11	-.5020		
ext40	11	-.4770	-.4770	
indometacina	6	-.4605	-.4605	
ext20	11		-.4464	
ss	11			-.3934
Sig.		.126	.259	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.429.

b. The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

Tabla 9. Comparación entre los análisis Post Hoc de Tukey y Duncan con $\alpha = 0.1$; para el tiempo 3, con valores del logaritmo en base 10 de los datos originales.

Como se muestra en la tabla 9, en el análisis Post Hoc de Tukey HSD con $\alpha = 0.1$, para la hora 3; en el primer grupo se observa igualdad entre los extractos 20, 40, 80 mg/kg e Indometacina; en el segundo grupo, el extracto 20 mg/kg y la SS se comportan de manera similar. De lo anterior se puede aseverar que los extractos 40 y 80 mg/kg, y la Indometacina se separan del comportamiento mostrado por el testigo negativo.

El análisis Post Hoc de Duncan con $\alpha = 0.1$, para la hora 3, dio por resultado tres grupos; un primer grupo de comportamiento similar, con los extractos 40 y 80 mg/kg, además de la Indometacina; el segundo grupo, en donde los extractos 20 y 40 mg/kg, junto con la Indometacina, presentan un comportamiento similar; y un tercer grupo, en donde sólo se encuentra la SS. En

este caso, el extracto 20 mg/kg se acerca más al comportamiento que tiene la Indometacina y el extracto 40 mg/kg; y la SS difiere de todos los demás grupos.

De estos análisis estadísticos se infiere que el efecto antiinflamatorio de los extractos a 40 y 80 mg/kg se presenta a las tres horas de su administración.

Hasta este punto, sólo se consideraron tres dosis (20, 40 y 80 mg/kg) del extracto de *H. parvifolia* (Barreta) pero a continuación se muestra la prueba de ANOVA con un $\alpha = 0.1$; con el logaritmo base 10 de las mediciones desde el tiempo cero hasta la tercera hora, contra los extractos con **40, 80 y 160 mg/kg**, Indometacina y SS, dando lo siguiente:

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LG10TI0	Between Groups	.004	4	.001	1.562	.215
	Within Groups	.017	25	.001		
	Total	.021	29			
LG10TI1	Between Groups	.008	4	.002	1.704	.181
	Within Groups	.028	25	.001		
	Total	.036	29			
LG10TI2	Between Groups	.007	4	.002	2.771	.049
	Within Groups	.015	25	.001		
	Total	.021	29			
LG10TI3	Between Groups	.008	4	.002	1.990	.127
	Within Groups	.024	25	.001		
	Total	.032	29			

Tabla 10. ANOVA con el logaritmo base 10 de los tres tiempos, contra los extractos con 40, 80 y 160 mg/Kg, Indometacina y SS.

En los valores de significancia de la tabla 10 de ANOVA, LG10TI0, LG10TI1, LG10TI3, con los siguientes valores $0.215, 0.181$ y $0.127 \geq 0.05$; no existiendo, por lo tanto, diferencias estadísticamente significativas. Para el LG10TI2 el valor es de $0.049 \leq 0.05$; existiendo diferencias estadísticamente significativas, por lo que se realizó las pruebas Post Hoc por las técnicas de Tukey HSD y de Duncan como se muestran en las siguientes tablas 11 y 12.

LG10TI2

grupos	N	Subset for alpha = .1	
		1	2
Tukey HSD ^a			
Extracto 160 mg	6	2.6091	
Indometacina	6	2.6106	
Extracto 40 mg	6	2.6303	
Extracto 80 mg	6	2.6422	
Solución salina	6	2.6430	
Sig.		.144	
Duncan ^a			
Extracto 160 mg	6	2.6091	
Indometacina	6	2.6106	
Extracto 40 mg	6	2.6303	2.6303
Extracto 80 mg	6		2.6422
Solución salina	6		2.6430
Sig.		.164	.403

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Tabla 11. Comparación entre los análisis Post Hoc de Tukey y Duncan con $\alpha = 0.1$; para el tiempo 2, con valores del logaritmo en base 10 de los datos originales.

Como se muestra en la tabla 11, en el análisis Post Hoc de Tukey HSD con $\alpha = 0.1$, para la hora 2, se observa igual comportamiento entre los extractos 40, 80 y 160 mg/kg, Indometacina y SS.

El análisis Post Hoc de Duncan con $\alpha = 0.1$, para la misma hora; dio por resultado un primer grupo de comportamiento similar, en los extractos 160, 40 mg/kg e Indometacina; y un segundo grupo, en donde los extractos 40 y 80 mg/kg, junto con la SS, presentan un comportamiento similar.

LG10TI3

		Subset for alpha = .1			
	grupos	N	1	2	3
Tukey HSD ^a	Indometacina	6	2.6142		
	Extracto 160 mg	6	2.6215		
	Extracto 80 mg	6	2.6335		
	Extracto 40 mg	6	2.6504		
	Solución salina	6	2.6554		
	Sig.			.176	
Duncan ^a	Indometacina	6	2.6142		
	Extracto 160 mg	6	2.6215	2.6215	
	Extracto 80 mg	6	2.6335	2.6335	2.6335
	Extracto 40 mg	6		2.6504	2.6504
	Solución salina	6			2.6554
	Sig.			.318	.139

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Tabla 12. Comparación entre los análisis Post Hoc de Tukey y Duncan con $\alpha = 0.1$; para el tiempo 3, con valores del logaritmo en base 10 de los datos originales.

En la tabla 12, el análisis Post Hoc de Tukey HSD con $\alpha = 0.1$, para la hora 3, dio por resultado un único grupo de comportamiento similar.

En el análisis Post Hoc de Duncan con $\alpha = 0.1$, para la misma hora; se observa un primer grupo de comportamiento similar, que incluye a la Indometacina, y los extractos 160 y 80 mg/kg; un segundo grupo con los extractos 160, 80 y 40 mg/kg; y un tercer grupo donde se encuentran los extractos 80, 40 mg/kg y la SS, con un comportamiento similar.

De estos análisis estadísticos se infiere que con la dosis de 160 mg/kg no se sigue la tendencia de dosis respuesta mostrada con los extractos 20, 40 y 80 mg/kg; confirmando que su actividad antiinflamatoria decayó por su comportamiento farmacológico.

Ahora se muestra la prueba de ANOVA con un $\alpha = 0.05$; con el logaritmo base 10 de las mediciones desde el tiempo cero a la tercera hora, contra los extractos con 40, 80 y 160 mg/kg, Indometacina y SS, dando lo siguiente:

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
LG10TI0	Between Groups	.004	4	.001	1.562	.215
	Within Groups	.017	25	.001		
	Total	.021	29			
LG10TI1	Between Groups	.008	4	.002	1.704	.181
	Within Groups	.028	25	.001		
	Total	.036	29			
LG10TI2	Between Groups	.007	4	.002	2.771	.049
	Within Groups	.015	25	.001		
	Total	.021	29			
LG10TI3	Between Groups	.008	4	.002	1.990	.127
	Within Groups	.024	25	.001		
	Total	.032	29			

Tabla 13. ANOVA con el logaritmo base 10 de los tres tiempos, contra los extractos con 40, 80 y 160 mg/kg, Indometacina y SS.

En los valores de significancia de la tabla 13 de ANOVA, LG10TI0, LG10TI1, LG10TI3, con los siguientes valores 0.215, 0.181 y $0.127 \geq 0.05$; no existiendo, por lo tanto, diferencias estadísticamente significativas. Para el LG10TI2 el valor es de $0.049 \leq 0.05$; existiendo diferencias estadísticamente significativas, por lo que se realizó las pruebas Post Hoc por las técnicas de Tukey HSD y de Duncan como se muestran en las siguientes tablas 14 y 15.

LG10TI2

grupos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey HSD ^a			
Extracto 160 mg	6	2.6091	
Indometacina	6	2.6106	
Extracto 40 mg	6	2.6303	
Extracto 80 mg	6	2.6422	
Solución salina	6	2.6430	
Sig.		.144	
Duncan ^a			
Extracto 160 mg	6	2.6091	
Indometacina	6	2.6106	
Extracto 40 mg	6	2.6303	2.6303
Extracto 80 mg	6		2.6422
Solución salina	6		2.6430
Sig.		.164	.403

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Tabla 14. Comparación entre los análisis Post Hoc de Tukey y Duncan con $\alpha = 0.05$; para el tiempo 2, con valores del logaritmo en base 10 de los datos originales.

Como se muestra en la tabla 14, el análisis Post Hoc de Tukey HSD con $\alpha = 0.05$, para la hora 2, muestra un único grupo de comportamiento similar.

En el análisis Post Hoc de Duncan con $\alpha = 0.05$, para la misma hora; se observa un primer grupo, con la Indometacina y los extractos 160 y 40 mg/kg, comportándose de manera similar; y un segundo grupo, con la SS y los extractos 40 y 80 mg/kg, con un similar comportamiento.

LG10TI3

grupos	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
Tukey HSD ^a			
Indometacina	6	2.6142	
Extracto 160 mg	6	2.6215	
Extracto 80 mg	6	2.6335	
Extracto 40 mg	6	2.6504	
Solución salina	6	2.6554	
Sig.		.176	
Duncan ^a			
Indometacina	6	2.6142	
Extracto 160 mg	6	2.6215	2.6215
Extracto 80 mg	6	2.6335	2.6335
Extracto 40 mg	6	2.6504	2.6504
Solución salina	6		2.6554
Sig.		.074	.094

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

Tabla 15. Comparación entre los análisis Post Hoc de Tukey y Duncan con $\alpha = 0.05$; para el tiempo 3, con valores del logaritmo en base 10 de los datos originales.

En la tabla 15 se muestran los análisis Post Hoc de Tukey HSD con $\alpha = 0.05$, para la hora 3, observándose un único grupo de comportamiento similar.

Para la misma hora, el análisis de Duncan con $\alpha = 0.05$; dio por resultado un primer grupo de comportamiento similar, con la Indometacina y los extractos 160, 80 y 40 mg/kg; y un segundo grupo, con los extractos 160, 80 y 40 mg/kg, y la SS, comportándose de manera similar. Aquí se observa una marcada diferencia entre la Indometacina y el testigo negativo.

De estos análisis se infiere que el extracto 160 mg/kg tiene un mismo comportamiento que las dosis anteriores pero con menor actividad antiinflamatoria.

Una vez realizadas los diferentes ANOVA's, se realiza una regresión lineal simple con los datos en Log^{10} a 20, 40, y 80 mg/kg del extracto, para observar si existe correlación entre las diferentes concentraciones y el cálculo en unidades Probit.

Model summary b

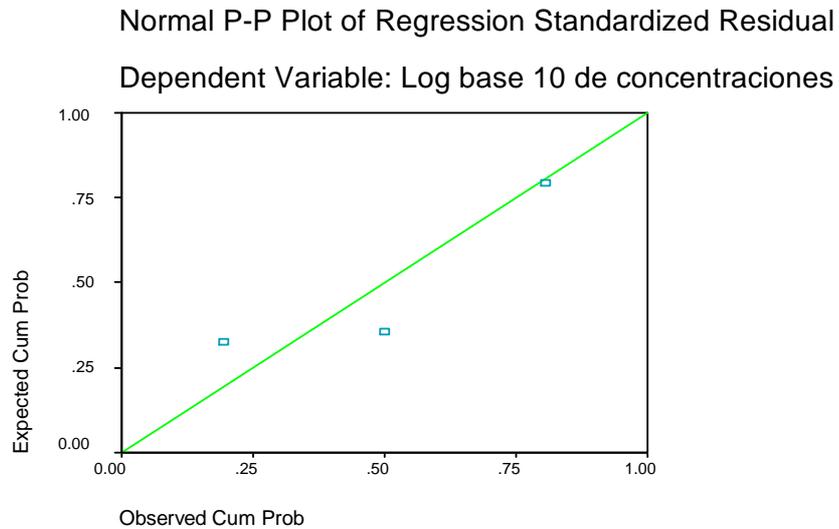
Model	R	R ²	R ² Adjusted	Std. error of the estimate	Change statistics				
					R ²	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	0.999a	0.997	0.994	0.02279	0.997	345.613	1	1	0.034

a. Predictors: (Constant), unidades probits de concentraciones

b. Dependent variable : Log base 10 de concentraciones

Tabla 16. Regresión lineal simple con tres datos en Log^{10} de 20, 40 y 80 mg/kg del extracto contra unidades Probits de concentración.

Al observar el coeficiente de correlación R y el coeficiente de correlación cuadrático R², se tienen los siguientes valores en forma consecutiva 0.999 y 0.994; interpretándose de que existe una asociación muy alta entre los logaritmos de las concentraciones (20, 40 y 80 mg/kg) contra las unidades Probits. Como se observa además, en la siguiente gráfica, donde los valores experimentales están muy cerca de la recta más probable.



Gráfica 6. Valores normalizados del Log base 10 de las concentraciones para la regresión lineal simple.

A continuación se muestra los resultados de la Correlación de Pearson no paramétrica, realizadas con los datos obtenidos con tres de las cuatro dosis del extracto de *H. parvifolia* (Barreta): 20, 40 y 80 mg/kg.

Symmetric Measures

	Value	Asymp. Std. Error	Approx. T	Approx. Sig.
Interval by Interval Pearson's R	.999	.001	18.591	.0340
Ordinal by Ordinal Spearman Correlation	1.000	.0000		
N of Valid Cases	3			

- a. Not assuming the null hypothesis.
- b. Using the asymptotic standard error assuming the null hypothesis.
- c. Based on normal approximation.

Tabla 17. Correlación de Pearson no paramétrica con tres datos de 20, 40 y 80 mg/kg.

Al realizar la Correlación de Pearson no paramétrica se observa que el coeficiente de correlación R, con un valor de 0.999, interpretándose que existe una asociación muy alta entre los logaritmos de las concentraciones contra las unidades Probits.

8.2 Para el segundo objetivo específico que es “Verificar si el extracto acuoso de corteza de *H. parvifolia* (Barreta) posee actividad antimicótica.” Se obtuvo lo siguiente:

Para la determinación de la actividad antimicótica de cuatro extractos acuosos de la *H. parvifolia* (Barreta), se fotografiaron las placas en donde se sembró el hongo (*A. flavus*) y en donde se inocularon los extractos. No se hizo necesaria la medición de halos de inhibición, puesto que el testigo positivo (LAMISIL®), inhibió en su totalidad al hongo; en cambio, los 4 extractos acuosos de la *H. parvifolia* (Barreta) no indujeron inhibición del hongo en grado alguno. A continuación se muestran las fotografías 6 y 7, que se realizaron de las placas, después de concluido el período de incubación.



Fotografía 6. Placa con extracto de Barreta en el pocillo central, con crecimiento de *A. flavus*.



Fotografía 7. Placa con el testigo positivo terbinafina (Lamisil®), con inhibición del crecimiento de *A. flavus*.

9. CONCLUSIONES

Para mostrar las conclusiones de esta investigación se hará con base en los objetivos específicos.

1. Para el primer objetivo específico que es “Determinar la actividad antiinflamatoria de un extracto acuoso de *H. parvifolia* (Barreta), usando el modelo de carragenina”, se concluye que:

- a) El extracto acuoso de la corteza la planta llamada *H. parvifolia*, comúnmente conocida como “Barreta” demostró un efecto antiinflamatorio a 20, 40 y 80 mg/kg., comparado contra el testigo positivo que es la Indometacina.
- b) El efecto máximo del extracto acuoso de la *H. parvifolia* (Barreta) se encontró que fue a la tercera hora, y a una concentración de 80 mg/kg.
- c) A concentraciones del extracto superiores a 80 mg/kg, el efecto antiinflamatorio disminuye comparado contra el testigo positivo que es la Indometacina.
- d) La dosis efectiva media calculada para el extracto fue de 51.4 mg/kg.
- e) El análisis estadístico confirma la relación dosis respuesta lineal que presentó el extracto acuoso de *H. parvifolia* (Barreta) desde la dosis a 20 hasta la dosis a 80 mg/kg.

2. Para el segundo objetivo específico que es “Verificar si el extracto acuoso de corteza de *H. parvifolia* (Barreta) posee actividad antimicótica”, se concluye lo siguiente:

- a) Al comparar los resultados plasmados en las fotografías, se puede diferenciar fácilmente y sin lugar a dudas, el nulo efecto antimicótico de los extractos acuosos de *H. parvifolia* (Barreta) sobre *Aspergillus flavus*,

comparado contra el testigo positivo que es la terbinafina (LAMISIL®); lo que contradice los supuestos beneficios de utilizar la *H. parvifolia* (Barreta) en forma de polvo para preservar las semillas del ataque de hongos.

- b) Se determinó experimentalmente si el extracto acuoso de la *H. parvifolia* (Barreta) poseía actividad de lectina, verificándose que tal actividad no se encontraba presente.

Además se puede concluir que:

- a) Es de relevancia la reproducibilidad del modelo utilizado para el ensayo antiinflamatorio con ratón, ya que el modelo de referencia y más utilizado para determinar el efecto antiinflamatorio es con rata.
- b) La técnica para determinar el efecto antimicótico es reproducible, fácil de realizar y de bajo costo.

10. PERSPECTIVAS

- a) Para el extracto acuoso de la planta *H. parvifolia* y conocida comúnmente como “Barreta”, se sugiere el uso de rangos más cortos entre las concentraciones, se propone probar las siguientes concentraciones 30, 50, 60 70, 90 y 100 mg/kg y grupos más numerosos de animales para conocer el comportamiento con mayor fineza del efecto antiinflamatorio.
- b) Para el extracto acuoso de la planta *H. parvifolia* (Barreta), que tiene efecto antiinflamatorio se sugiere continuar el estudio para aislar el o los componentes activos, para realizar las pruebas farmacológicas y toxicológicas.
- c) Se sugiere continuar el estudio del efecto antiinflamatorio de la *H. parvifolia* (Barreta) en el mismo modelo murino, utilizando las otras partes de la planta (p. ej. la raíz o las hojas), además de emplear extractos obtenidos con diferentes disolventes.
- d) Se sugiere la realización de más ensayos *in vitro* para demostrar el efecto antimicótico de las diferentes partes de la planta *H. parvifolia* (Barreta).

11. REFERENCIAS

1. Cotran R, Kumar V, Collins T. Robbins. Patología estructural y funcional. 6ª ed. Colombia: McGraw-Hill Interamericana; 2000: 53-89.
2. Pardo FJ. Anatomía patológica. Madrid: Harcourt; 1997: 53-54, 178-205.
3. Wagner W, Khanna P, Furst D. Antiinflamatorios no esteroideos, antirreumáticos modificadores de la enfermedad, analgésicos no opioides y medicamentos usados para tratamiento de la gota. En: Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 9ª ed. El Manual Moderno. 2005: 575-577, 584, 586
4. Evans WC. Farmacognosia. 15a ed. Edinburgo: W. B. Saunders; 2002: 3-4, 47, 137-139, 206.
5. Artuso A. Drugs of natural origin. Economic and policy aspects of discovery, development and marketing. New York: The Pharmaceutical Products Press; 1997: 1-2.
6. Domínguez XA. Métodos de investigación fitoquímica. México: Limusa; 1979: 23-31, 33, 81, 93, 111, 127, 139, 149, 161, 175, 195, 211.
7. Williamson E, Okpako D, Evans F. Pharmacological methods in phytotherapy research. Vol 1. Chichester: John Wiley & Sons; 1996: 16, 20, 131-133, 135.
8. Al-Haboubi H, Zeitlin I. Re-appraisal of the role of histamine in carrageenan-induced paw oedema. European Journal of Pharmacology 1983; 88:169-176.
9. Voguel HG, editor. Drug discovery and evaluation. 2nd edn. Berlín: Springer; 2002: 759-761.
10. Woolf N. Cell, tissue and disease. 3rd edn. Edinburgo: W.B. Saunders; 2000: 57-82.
11. Trowbridge H, Emling R. Inflammation: a review of the process. 5th edn. Chicago: Quintessence; 1997: 19-36.

12. Haeggström J, Serhan C. Update on arachidonic acid cascade. In: Serhan C, Ward P, editors. Molecular and cellular basis of inflammation. Humana Press. 1999: 51-53.
13. Rainsford KD. Current status of side-effects from anti-inflammatory drugs. In: Rainsford KD, editor. Side effects of anti-inflammatory drugs IV. Kluwer Academic Publishers. 1997: 3-6.
14. Grabley S, Thiericke R. The impact of natural products on drug discovery. In: Grabley S, Thiericke R, editors. Drug discovery from nature. Springer. 2000: 5, 20-21.
15. Phillipson JD. Phytochemistry and pharmacognosy. J Phytochem 2007; 68(22-24): 2960-72.
16. D' Amelio F. Botanicals. Boca Ratón: CRC Press; 1999: 39-42.
17. Bruneton J. Elementos de fitoquímica y farmacognosia. Zaragoza: Acribia; 1991: 120-121.
18. Ángeles AE, Martínez M, Córdoba F. Actividad del complejo molecular, lectina- β -glucosidasa en algunas semillas y germinados. Sociedad Mexicana de Bioquímica AC. Memorias del XIV Congreso de bioenergética y biomembranas. [consultado 25 Jun 2007]. <http://www.smb.org.mx/Memorias_Bioener2005/Posters/C27.pdf>
19. Cárdenas N, Pérez S, Zavala MA, Aguirre JR, Pérez C. Actividad antifúngica de seis plantas sobre *Aspergillus flavus* Link. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2005; 36: 21-26.
20. Rzedowski J. Vegetación de México. México: Limusa; 1983: 152-153, 256.
21. CONAFOR. Sistema Nacional de Información Forestal. [consultado 25 Jun 2007]. <http://www.snif_portal/index.php>
22. Comisión Nacional de Áreas Protegidas. Parque Nacional Cumbres de Monterrey. [consultado 26 de Jun 2007]. <http://www.conanp.gob.mx/consulta/index>

23. González H, Cantú I. Adaptación a la sequía de plantas arbustivas de matorral espinoso tamaulipeco. [consultado 25 Jun 2007]. <http://w3.dsi.uanl.mx/publicaciones/ciencia-uanl/vol4/4/pdfs/adaptacion_sequia.pdf>
24. Cervantes MC. Comunidades vegetales y recursos forestales de zonas áridas y semiáridas. [consultado 25 Jun 2007]. <<http://www.igeograf.unam.mx/instituto/publicaciones/temas-sel/plazorico/art2.pdf>>
25. CONAFOR. Bosque y desarrollo. [consultado 25 de Jun 2007]. <<http://www.conafor.gob.mx/portal/index.php>>
26. Pirani JR. A revisión of *Helietta* and *Balfourodendrum* (Rutaceae-Pteleinae). [consultado 22 Nov 2007]. <<http://links.jstor.org/sici?sici=007>>
27. ITIS. Integrated taxonomic information system-ITIS. North America. [consultado 4 Jul 2007]. <<http://www.cbif.gc.ca/itis/>>
28. Cano G, Marroquín J. Taxonomía de plantas superiores. México: Trillas; 1994: 271-273.
29. MacDonald TM. Side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: studies from the tayside medicines monitoring unit. In: Rainsford KD, editor. Side effects of anti-inflammatory drugs IV. Kluwer Academic Publishers. 1997: 25.
30. Walker FS, Rainsford KD. Do NSAIDs adversely affect joint pathology in osteoarthritis? In: Rainsford KD, editor. Side effects of anti-inflammatory drugs IV. Kluwer Academic Publishers. 1997: 43.
31. Østensen ME. Safety of non-steroidal anti-inflammatory drugs during pregnancy and lactation. In: Rainsford KD, editor. Side effects of anti-inflammatory drugs IV. Kluwer Academic Publishers. 1997: 55.

32. Vane JR, Botting RM. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs: an overview. In: Vane JR, Botting RM, editors. Selective COX-2 inhibitors. Kluwer Academic Publishers. 1998: 1-7.
33. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem* 2007; 42: 3.
34. Domínguez XA, Canales A, Garza J, Gómez E, Garza L. Constituents of leaves and branches of *Helietta parvifolia*. [consultado 22 Nov 2007]. <<http://www.sciencedirect.com/science/ob>>
35. Chang PT, Aynilian GH, Cordell GA, Tin-Wa M. Isolation of flindersiamine, isoflindersiamine and a new alkaloid, heliparvifoline, from *Helietta parvifolia* (Rutácea). *J Pharm Sci* 1976; 65(4): 561-3.
36. Haas PJ, van Strijp J. Anaphylatoxins: their role in bacterial infection and inflammation. *Immunol Res* 2007; 37(3): 161-75.
37. Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptative immunity, coagulation and inflammation. *J Immunol* 2007; 178(10): 6017-22.
38. Tripathi P, Tripathi P, Kashyap L, Singh V. The role of nitric oxide in inflammatory reactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51(3): 443-52.
39. Jungmann P, Wilhelmi M, Oberleithner H, Riethmüller C. Bradykinin does not induce gap formation between human endothelial cells. *Pflugers Arch* 2008; 455(6): 1007-16.
40. Nguemfo EL, Dimo T, Azebaze AG. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the stem bark extracts from *Allanblackia monticola* STANER L.C. (Guttiferae). *J Ethnopharmacol* 2007; 114(3): 417-24.
41. Flierl M, Rittirsch D, Nadeau B. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. *Nature* 2007; 449: 721-25.
42. Pober JS, Sessa WC. Evolving function of endothelial cells in inflammation. *Nature Rev Immunol* 2007; 7: 803-15.

43. Coleman JW. Nitric oxide in immunity and inflammation. *Int Immunopharmacol* 2001; 1(8): 1397-406.
44. De Melo G, Malvar D, Vanderlinde F. Phytochemical and pharmacological study of *Sedum dendroideum* leaf juice. *J Ethnopharmacol* 2005; 102(2): 217-20.
45. Winn RK, Harlan JM. The role of endothelial cells apoptosis in inflammatory and immune diseases. *J Thromb Haemost* 2005; 3: 1815-24.
46. Olajide OA, Makind JM, Awe SO. Effects of the aqueous extract of *Bridelia ferruginea* stem bark on carrageenan-induced oedema and granuloma tissue formation in rats and mice. *J Ethnopharmacol* 1999; 66(1): 113-17.
47. Bello R, Barrachina MD, Martínez MA, Esplugues J. Evaluation of the acute toxicity, analgesic and CNS activities of different species of *Teucrium* genus. *Phytotherapy Research* 1995; 9: 277-80.
48. Meléndez ME, Buendía M, Ramos D, Cardona P, Villareal ME. Study of the anti-inflammatory effect of *Sedum prealtum* (Siempreviva) in the rat: dose-dependent response. *Proc West Pharmacol* 2002; 45: 129-30.
49. Salazar MJ. Efectos del aceite esencial de la barreta *Helietta parvifolia* gray (benth), sobre la mosca mexicana de la fruta *Anasthepha ludens* (bew). Tesis Profesional. ITESM 1984. [consultado 22 Nov 2007]. <<http://www.orton.catie.ac.cr>>
50. Roque TJ. Protección de la semilla de maíz contra hongos del almacén, empleando hojas de la planta barreta (*H. parvifolia* gray, benth). Tesis Profesional (M. en C.) ITESM 1987. [consultado 22 Nov 2007]. <<http://www.orton.catie.ac.cr>>
51. García VJ, Castillo MA, Ramírez GM, Rendón SG, Larqué SM. Comparación de los procedimientos de Tukey, Duncan, Dunnett, Hsu y Bechhofer para selección de medias. *Agrociencia* 2001; 35: 79-86.

52. Marques MJ. Probabilidad y estadística para ciencias químico-biológicas. 2ª ed. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Universidad Nacional Autónoma de México; 2004: 354-59.
53. Kalipedia.com: La enciclopedia online. [consultado 23 May 2008]. <<http://www.kalipedia.com/ciencias-vida/tema/reacción-inflamatoria.html>>
54. Gamboa R. Antiinflamatorios no esteroideos bloqueadores de la ciclooxigenasa-2. [consultado 23 May 2008]. <http://www.mundoveterinario.net/nueva/referencias/farmacología/farm_octu10_antiinflamatorios>
55. NPIN: Native plant database. [consultado 23 May 2008]. <http://www.wildflower.org/plants/search.php?family=Rutacea&news_earch=true>
56. Ecociencia. [consultado 23 May 2008]. <<http://www.ecociencia.fateback.com/articulos/circulación.htm>>