



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación de la Actividad Antiinflamatoria del Extracto  
Acuoso de *Sanvitalia procumbens* (Ojo de Gallo) en un  
Modelo de Ratones CD1

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA :

ILSE ROCIO GUERRERO RIOS



Director de Tesis : M.C. Maurilio Flores Pimentel

Asesor de Tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura

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.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Universidad Nacional Autónoma de México por darme esa gran oportunidad de pertenecer a ella y llenarme de fuerzas para construir un mejor futuro.

A mi Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la cual me siento orgullosa de pertenecer y haber logrado una de mis más grandes metas, el haber concluido mi Licenciatura.

A mi Director de Tesis, el M.C Maurilio Flores Pimentel por haberme apoyado en cada una de las cosas que se realizaron dentro del Laboratorio, por brindarme la confianza de llevar a cabo este proyecto y hacerme saber que puedo contar con usted. Muchas gracias por todo.

A mi Asesor de Tesis, el Dr. Rubén Marroquín Segura por haber confiado en mí, por apoyarme todos los días para poder concluir este proyecto, gracias por ser un amigo, una persona con muchas cualidades de la cual he aprendido mucho. Le agradezco por todas las risas y todo ese apoyo que me brindó.

A mi revisora de Tesis la Dra. Juana Rosado Pérez por haberse tomado ese tiempo en revisarla, por todas sus observaciones y por haberme ayudado a desarrollar un mejor trabajo.

A mis sinodales, el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara y la Mtra. Evangelina López Nieto, gracias por su valioso tiempo y por ayudarme a mejorar mi trabajo.

A todos los profesores que se encuentran dentro del Laboratorio el Dr. Rubén Marroquín Segura, el M.C Maurilio Flores Pimentel, el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara, la Mtra. Yolanda Flores Cabrera, el M.C Ricardo Calvillo Esparza y el QFB. Armando Ramírez González de cada uno me llevo una sonrisa y apoyo de su parte, les agradezco haber hecho que mi estancia en el Laboratorio fuera tan agradable, gracias por las anécdotas, las risas y la confianza brindada en todo éste tiempo.

Al QFB Ramón Rodríguez Hernández por haberme enseñado que todo se puede, que tenemos la capacidad de aprender y hacer mejores cosas, por haber compartido su gran conocimiento y por haberme dejado esa huella al final de mi carrera.

## **DEDICATORIAS**

A mis papás por ser los mejores de todo el mundo, gracias por enseñarme tantas cosas, por inculcarme tantos valores, me siento muy orgullosa de ser su hija, les agradezco su esfuerzo por ayudarme a ser una gran persona, su gran fortaleza, su apoyo en cualquier situación y todo su tiempo dedicado a mí, gracias por hacer que mi vida esté llena de felicidad por tenerlos a ustedes a mi lado. Sin ustedes no hubiera podido. LOS AMO DEMASIADO.

A mis hermanos por estar siempre a mi lado, por sus ocurrencias, por su gran apoyo, por todas las risas que hemos compartido, mis papás y ustedes son lo mejor que tengo en la vida, les agradezco formar parte de este logro y estar siempre conmigo. LOS AMO MARIANA Y DIEGO.

A mi abuelito Enrique por ser un ejemplo de gran fortaleza y a mi abuelita Vicky por cuidarme siempre desde donde está. Gracias por todo.

A ti Javier, por todo tu apoyo a lo largo de estos años, por esas sonrisas infinitas que me has regalado, por tu confianza, por acompañarme y apoyarme de la forma más sincera en este logro y en cualquier momento. Gracias infinitas por inyectarle a cada momento de mi vida tu toque de felicidad, magia, apoyo, comprensión y locura. Gracias por las alas y por tomar mi mano, seguimos volando... TE AMO TOTO.

A mis amigos con los cuales he compartido muchos momentos, a cada uno les agradezco por todas esas cosas que me brindaron al estar conmigo. A Miguel por ser un gran amigo, por compartir momentos de estrés y de aprendizaje juntos, por tus consejos, por las pláticas y todo tu apoyo. A Gabriel por ser tan ocurrente y siempre hacer sonreír, por siempre estar ahí cuando lo necesito. A mi amigo Arturo por su apoyo y sus pláticas tan divertidas. A Venus por ser mi amiga y por las risas durante todo este tiempo de conocernos. A Rodas por todas las risas y los momentos dentro y fuera de la escuela. A Pedro y a Paco por todo lo compartido y por tener su apoyo. A Ariadna por formar parte de este logro. A mi amigo Roberto por tu apoyo en esos momentos de estrés y por hacerme saber que siempre puedo contar contigo. Se les quiere y espero nuestra amistad siga siendo de esas sinceras y duraderas. Gracias por todo y por compartir esto conmigo.

*La vida no es fácil para ninguno de nosotros, pero... ¡Qué importa!  
Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo.  
Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa  
hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.*

*Marie Curie*

*La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte, es  
iluminar con ella el mundo entero.*

*Isaac Asimov*

*Cada vez que se encuentre usted del lado de la mayoría, es tiempo de  
hacer una pausa y reflexionar.*

*Mark Twain*

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>2</b>
<b>3. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>4</b>
3.1 Medicina Tradicional .....	4
3.2 Plantas medicinales .....	5
3.2.1 Historia .....	5
3.2.2 Definición.....	6
<b>3.3 <i>Sanvitalia procumbens</i> (Ojo de Gallo) .....</b>	<b>7</b>
<b>3.4 Inflamación .....</b>	<b>9</b>
3.4.1 Tipos de respuesta inflamatoria.....	10
3.4.1.1 Inflamación aguda.....	11
3.4.1.2 Inflamación crónica .....	12
3.4.2 Células inflamatorias .....	13
3.4.3 Mediadores químicos de la inflamación.....	16
3.4.3.1 Sistema del complemento.....	16
3.4.3.2 Quininas.....	17
3.4.3.3 Factores activadores de plaquetas .....	17
3.4.3.4 Aminas vasoactivas .....	17
3.4.3.5 Citocinas .....	18
3.4.3.6 Óxido nítrico.....	19
3.4.4 Proteínas de fase aguda .....	20
3.4.4.1 Ceruloplasmina .....	21
<b>3.5 Corticoides .....</b>	<b>22</b>
<b>3.6 Modelo experimental .....</b>	<b>24</b>
3.6.1 Modelo animal .....	24
3.6.2 Diseño de Experimentación animal .....	24
3.6.3 Animal biológico .....	25
3.6.3.1 Ratón .....	26
<b>4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>29</b>
<b>5. HIPÓTESIS .....</b>	<b>30</b>
<b>6. OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
6.1 General .....	31
6.2 Específicos.....	31
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>

---

<b>7.1 Tipo de estudio .....</b>	<b>32</b>
<b>7.2 Población de estudio .....</b>	<b>32</b>
<b>7.3 Variables .....</b>	<b>32</b>
<b>7.4 Técnicas.....</b>	<b>33</b>
7.4.1 Preparación de extracto acuoso .....	33
7.4.2 Ensayo de inflamación aguda: Modelo de edema en cojinete plantar de ratón con carragenina.....	35
7.4.3 Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón pellet .....	37
7.4.4 Determinación de Ceruloplasmina.....	39
7.4.5 Determinación de Nitritos .....	41
7.4.5.1 Plateado de Cadmio .....	41
7.4.5.2 Ensayo.....	43
<b>7.5 Diagrama de Flujo.....</b>	<b>44</b>
<b>7.6 Análisis estadístico.....</b>	<b>51</b>
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>52</b>
8.1 Ensayo de inflamación aguda: Modelo de edema en cojinete plantar de ratón con carragenina. ....	54
8.2 Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón pellet.....	55
8.3 Prueba de Ceruloplasmina y Nitritos.....	56
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>11. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>61</b>
<b>12. ANEXOS .....</b>	<b>63</b>
ANEXO 1. Preparación de soluciones .....	63
<b>13. REFERENCIAS.....</b>	<b>68</b>

---

## 1. RESUMEN

**Antecedentes.** La utilización de plantas con actividad medicinal no es propia de una zona específica, sino que se extiende a cada una de las regiones del planeta, debido a su gran diversidad biológica, climática y territorial, acompañada de costumbres y creencias. El conocimiento, al principio empírico, de las propiedades de las plantas se empezó a transmitir de unos hombres a otros, de familia en familia, de tribu a tribu y de generación en generación, hasta llegar a nuestros días.

**Objetivo.** Evaluar la actividad antiinflamatoria de *Sanvitalia procumbens* (Ojo de Gallo) en un modelo de ratones CD1 con el fin de determinar si esta planta tiene propiedades antiinflamatorias.

**Material y métodos.** La planta fue autenticada en el herbario de la FES Zaragoza (FEZA)-UNAM se le asignó el número FEZA 13626. Se realizó una extracción con agua, en un rotavapor. En el ensayo de inflamación aguda se utilizaron 5 grupos de 6 ratones con un peso promedio de 35 g. Se siguió un esquema de inducción de inflamación con la aplicación de carragenina en el cojinete plantar de la pata izquierda del ratón, posteriormente recibieron por sonda gástrica: solución salina para el grupo control negativo, dosis del extracto de 25, 50 y 100 mg/Kg para los grupos experimentales e Indometacina para el grupo positivo. Se midió el grosor de la pata en intervalos de 60 minutos por 5 horas. En el ensayo de inflamación crónica se utilizaron 5 grupos de 6 ratones con un peso promedio de 35 g. Se implantó subcutáneamente en el dorso del ratón el algodón pellet, posteriormente recibieron por sonda gástrica durante 10 días: solución salina para el grupo control negativo, dosis del extracto de 25, 50 y 100 mg/Kg para los grupos experimentales e hidrocortisona para el grupo positivo. Al final del ensayo se obtuvieron los sueros y se extrajeron los riñones, hígado, bazo y corazón y se calculó el peso relativo. En los sueros se determinó ceruloplasmina y nitritos.

**Resultados.** Se observó actividad antiinflamatoria en fase aguda del extracto a las 3 y 4 horas. No se presentó una diferencia estadísticamente significativa de ceruloplasmina ni de nitritos en comparación con nuestro grupo control negativo. No se observó actividad antiinflamatoria del extracto en fase crónica y tampoco se observaron muertes ni signos de intoxicación visibles en los animales tratados.

**Conclusiones.** Dado que se observó una menor inflamación medida a través del grosor del cojinete plantar en los animales tratados con el extracto y una tendencia a menores niveles de ceruloplasmina y nitritos respecto al grupo control negativo, los resultados sugieren que la planta *Sanvitalia procumbens* si presenta actividad antiinflamatoria en fase aguda pero no la presenta en fase crónica.



## **2. INTRODUCCIÓN**

El origen que se conoce de las plantas medicinales que han formado parte importante de la historia y de la cultura de los pueblos indígenas, se refiere a su uso y aplicación como remedio de varias enfermedades.

Hace 3000 años a.C. en China se escribió el libro más antiguo de plantas medicinales, los Sumerios hace 2500 años a.C. usaban las plantas con fines curativos; los Asirios conocían poco más de 250 hierbas medicinales, también culturas como la Griega y la propia cultura Indígena Mexicana ocupaban las flores, tallos, hojas y cortezas de las plantas en forma de infusiones, maceraciones y zumos como remedios curativos.

México es uno de los países de América con mayor tradición ancestral y riqueza en el uso de la herbolaria medicinal, tanto en el medio rural como suburbano donde los servicios de atención médica muchas veces son escasos, se registran poco más de 3000 especies que se emplean como remedios naturales, sin embargo, a pesar de la riqueza y la variedad de la flora medicinal, el porcentaje de especies que poseen estudios fitoquímicos y farmacológicos es muy pequeño.

Entre las enfermedades que aquejan a la población mundial, las que involucran procesos inflamatorios representan un importante grupo; enfermedades como artritis reumatoide, gota, asma o trastornos neurodegenerativos que en algunos casos implican reacciones inflamatorias.

Como consecuencia de estos padecimientos existe una gran necesidad de desarrollar nuevos agentes antiinflamatorios más seguros y eficaces. El uso de las plantas medicinales o de sus componentes activos representa una alternativa cada vez más explorada y promisoría para el tratamiento de numerosos desórdenes inflamatorios.

Por ello se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens* (Ojo de Gallo) en ratones, ya que uno de los principales usos empíricos de esta planta es como antiinflamatorio, sin embargo, no existen antecedentes que demuestren su uso medicinal, ni estudios que corroboren su efectividad.

### **3. MARCO TEÓRICO**

#### **3.1 Medicina Tradicional**

La medicina tradicional es la suma completa de conocimientos, técnicas, y prácticas fundamentadas en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas y que se utilizan para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar trastornos físicos o mentales.<sup>1</sup>

Las medicinas herbarias se sirven de productos herbarios cuyos ingredientes activos son partes de plantas u otros materiales vegetales; en muchos países desarrollados, del 70 al 80% de la población ha recurrido alguna vez a una u otra forma de medicina alternativa o complementaria.<sup>1</sup>

La fitoquímica probablemente ha estudiado entre un 5 y un 15% de la diversidad vegetal existente en el mundo con relación a su composición química y su actividad biológica, cada año se reportan en la literatura aproximadamente 1500 nuevos productos naturales provenientes de plantas, los cuales constituyen hasta un 25% del total de los que se utilizan en la industria farmacéutica.<sup>2</sup>

Hoy en día aunque la medicina tradicional ya es más conocida y los productos naturales ya son utilizados con más frecuencia, los estudios que se han realizado sobre aquellas plantas son escasos, de ahí surge la importancia de realizarlos y con ello ampliar el conocimiento sobre la flora medicinal en nuestro país.

## **3.2 Plantas medicinales**

### **3.2.1 Historia**

Los datos sobre las características vegetales, formas de uso, propiedades terapéuticas, recolección y comercio de numerosas plantas medicinales se encuentran en las fuentes más antiguas tales como los códices precolombinos.<sup>3</sup>

Uno de los primeros escritos fue el llamado Papiro egipcio de Ebers, con más de 3.500 años de antigüedad, fue hallado en la localidad de Luxor, se trata del más importante escrito sobre medicina egipcia, en el que se han podido identificar unas 150 plantas de utilidad terapéutica.<sup>4</sup>

Desde las más primitivas civilizaciones, el ser humano se ha ocupado no solo de ir perfeccionando y extendiendo el cultivo de las plantas para su alimentación; al mismo tiempo, ha tratado de buscar las propiedades medicinales de cada una de ellas.<sup>4</sup>

En el año de 1982 el esfuerzo de Lozoya y Lozoya se dio con el fin de iniciar la Flora Medicinal en México, esto comenzó con una primera parte sobre 14 plantas indígenas, los subsiguientes han sido estudios valiosos pero dedicados a aspectos regionales, por lo que desde ese tiempo podemos darnos cuenta que los estudios que se requieren de cada una de las plantas deben ser más completos, abarcando su función, sus efectos y sus propiedades, por lo cual hoy en día esto se tiene que tomar en cuenta para que la información sea más completa y se siga transmitiendo de generación en generación.<sup>3</sup>

---

### **3.2.2 Definición**

Las plantas medicinales son todas aquellas que contienen en alguno de sus órganos, principios activos, los cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de las personas y animales en general, se calcula que de las 260 000 especies de las plantas que se conocen en la actualidad el 10% se pueden considerar medicinales.<sup>5</sup>

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS) una planta medicinal es cualquier especie vegetal que contiene sustancias con gran importancia para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no sólo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos, sino también, como materiales de base para la síntesis de los medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos.<sup>6, 7</sup>

Muchas personas creen que las plantas medicinales son relativamente seguras porque son de origen natural, sin embargo, muchos estudios recientes han manifestado las graves consecuencias de los efectos secundarios de ciertos productos a base de plantas, los cuales ocurren por varios contaminantes tales como plomo, mercurio o arsénico y también por la interacción que pueda ocurrir con algún producto farmacéutico; el conocimiento sobre las interacciones es limitado y existen factores responsables de ello: los problemas de la correcta identificación y caracterización de los agentes responsables, la falta de estandarización de los principios activos, la ausencia

de estudios formales de interacciones, falta de incorporación de las plantas medicinales a los programas de Farmacovigilancia y falta de atención por parte de los médicos sobre el consumo de estos productos.<sup>8,9</sup>

La estandarización de principios activos en los preparados de plantas medicinales, incluso cuando se intenta asegurar un contenido mínimo o máximo de determinada sustancia activa, es un gran riesgo, debido a que no se sabe en qué proporción esa sustancia u otras contenidas en la planta son las responsables de los efectos que provoca.<sup>9,10</sup>

El creciente consumo de plantas medicinales, los riesgos e incertidumbres acerca de sus efectos farmacológicos y el riesgo de interacciones conocidas o desconocidas con los medicamentos habituales deben hacer cambiar nuestra mentalidad sobre el modo de registrar el consumo de estos productos en la historia clínica y la consideración de estos productos como posibles causas de efectos indeseables.

### **3.3 *Sanvitalia procumbens* (Ojo de Gallo)**

Es una planta originaria de México, habita en áreas de clima cálido, semicálido, semiseco y templado, en el Estado de Morelos ésta familia tiene una dominancia cultural de 48 especies (7.9%) aproximadamente, presenta ramas de 4 a 30 cm de altura, toda la planta está cubierta con pelillos cortos, hojas alargadas parecidas a puntas de lanza y se ven como rehiletes. Las flores son del tipo de la margarita, las de

---

adentro son pequeñas, moradas u oscuras y las de afuera son amarillas en forma de lengua, se le conoce principalmente como ojo de chanate, ojo de gallina, ojo de gato, ojo de perico y coyoixtli (Morelos).<sup>11, 12</sup>

Se emplea para tratar padecimientos digestivos como diarrea, vómito, para luxaciones y principalmente es utilizada como un antiinflamatorio.<sup>12, 13</sup>



**Figura 1. *Sanvitalia procumbens* Lam<sup>12</sup>**

### 3.4 Inflamación

La actividad antiinflamatoria ha despertado en los últimos años un gran interés científico en el área farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial de ciertos compuestos de interferir en la evolución de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios.<sup>14</sup>

Históricamente, la inflamación fue una de las primeras observaciones médicas, los signos clásicos: enrojecimiento e hinchazón con calor y dolor (*rubor et tumor cum calore et dolore*) fueron descritos por Celsus en el año 10 a.C. Hasta pasada la edad media, la inflamación era considerada una enfermedad y solo en el siglo XVIII John Hunter reconoció que se trataba de una reacción adaptativa ante una agresión.<sup>15-18</sup>

La inflamación es una respuesta biológica y bioquímica a los estímulos nocivos como los patógenos, células dañadas o cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica que involucra al sistema nervioso, vascular e inmunológico, su misión protectora la cumple diluyendo, destruyendo o neutralizando los agentes perjudiciales, implica mecanismos inmunitarios innatos y adaptativos, así como un enorme gasto de energía metabólica.<sup>19-22</sup>

Los elementos que interfieren en la inflamación son mediadores químicos, células de la sangre, los tejidos y otros elementos de plasma y de los espacios extracelulares, sería



imposible que las reacciones inflamatorias se regularan sin la migración controlada de diversas poblaciones de leucocitos.<sup>23, 24</sup>

Las vías y eventos particulares que se suscitan en una respuesta inflamatoria dependen de muchos factores incluyendo la naturaleza del estímulo iniciador, su puerta de entrada al organismo y las características del huésped.<sup>25</sup>

Durante la inflamación ocurren 3 hechos fundamentales los cuales son:

1. Aumento del aporte sanguíneo a la zona afectada.
2. Incremento de la permeabilidad capilar por retracción de las células capilares. Esto permite que atraviesen el endotelio moléculas de mayor tamaño y que los anticuerpos y el complemento lleguen al lugar de la inflamación.
3. Los leucocitos (neutrófilos y macrófagos) y un poco más tarde los linfocitos salen de los capilares a los tejidos circundantes; una vez en éstos, migran hacia el lugar de la lesión, bajo la dirección de los estímulos quimiotácticos.<sup>26</sup>

### **3.4.1 Tipos de respuesta inflamatoria**

Se divide en dos tipos: aguda y crónica. La división de la inflamación se basa en la evolución temporal y en los elementos celulares implicados. Estas categorías no se excluyen entre ellas y existe cierto solapamiento.<sup>27</sup>

### **3.4.1.1 Inflamación aguda**

Es la respuesta inicial del cuerpo a estímulos nocivos, permite la llegada rápida de leucocitos y proteínas al lugar de la lesión, es de duración relativamente corta; se mantiene pocos minutos, varias horas, o uno o dos días.<sup>28-30</sup>

La inflamación aguda tiene dos componentes fundamentales:

- Cambios vasculares: alteraciones en el calibre de los vasos que incrementan el flujo de sangre (vasodilatación) y cambios en la pared vascular que permiten la salida de la circulación de las proteínas plasmáticas (aumento de la permeabilidad vascular). Además, las células endoteliales se activan, lo que aumenta la adhesión de los leucocitos y permite su migración a través de la pared vascular.
- Acontecimientos celulares: migración de los leucocitos desde la circulación y su acumulación en el foco de la lesión (reclutamiento celular), seguida de la activación de leucocitos, que les permite eliminar el agente lesivo. Los principales leucocitos en la inflamación aguda son los neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares).<sup>31</sup>

Las causas de la inflamación aguda son:

- Agentes físicos: traumatismos, heridas, lesiones por frío o calor, luz UV, radiación, etc.

- Agentes químicos: Sustancias irritantes y corrosivas, por ejemplo: ácidos, álcalis.
- Infecciones: víricas, bacterianas o parasitarias.
- Reacciones de hipersensibilidad de mecanismo inmunitario, por ejemplo: reacciones alérgicas.
- Necrosis tisular, por ejemplo: isquemia que induce un infarto de miocardio.<sup>27, 32</sup>

### **3.4.1.2 Inflamación crónica**

Es el resultado de un equilibrio entre destrucción tisular progresiva por una parte y, por otra, erradicación del estímulo lesivo, seguida de reparación y formación de cicatriz, se caracteriza por la presencia de un número anormalmente grande de linfocitos dentro del tejido y tiene una duración prolongada (semanas o meses).<sup>33, 34</sup>

La inflamación crónica se caracteriza principalmente por:

- Inflamación con células mononucleares, que incluyen macrófagos, linfocitos y células plasmáticas.
- Destrucción tisular inducida por el agente lesivo persistente o por las células inflamatorias.
- Intentos de curación mediante sustitución por tejido conjuntivo de los tejidos lesionados, que se consiguen mediante la proliferación de vasos pequeños y, en concreto, mediante fibrosis.<sup>34</sup>

La inflamación crónica se observa en las siguientes circunstancias:

- Infecciones persistentes por gérmenes difíciles de erradicar, como micobacterias, y algunos virus, hongos y parásitos.
- Enfermedades inflamatorias de mecanismo inmunitario. La inflamación crónica desempeña un importante papel en un grupo de enfermedades que se deben a una activación excesiva e inapropiada del sistema inmunitario tales como: asma bronquial, artritis reumatoide y esclerosis múltiple.
- Exposición prolongada a agentes con capacidad tóxica, exógenos o endógenos. Un ejemplo de agente exógeno son las partículas de sílice, un material inmunitario no degradable que, cuando se inhala durante periodos de tiempo prolongados, produce una enfermedad pulmonar inflamatoria llamada silicosis.<sup>34</sup>

### **3.4.2 Células inflamatorias**

Existen 2 tipos de células implicadas en la inflamación, unas que se encuentran en forma permanente en los tejidos, como son los mastocitos y las células endoteliales, y otras que pueden migrar y acceden al sitio afectado desde la sangre, como son los neutrófilos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y linfocitos. Estas células producen una gran cantidad de moléculas activas que, de manera directa o indirecta, son mediadores del proceso inflamatorio.<sup>14</sup>

### Neutrófilos

El neutrófilo es el tipo de célula infiltrativa de los tejidos que predomina durante las etapas iniciales de la reacción inflamatoria. La infiltración tisular por este leucocito llega a su máximo dentro de las primeras 6 h de la reacción inflamatoria, con producción creciente de neutrófilos en la médula ósea para satisfacer esa necesidad. Participan en la fagocitosis, liberación de enzimas y formación de los factores quimiotácticos.<sup>24</sup>

### Monocitos

En el mismo sitio de la lesión se transforman en macrófagos que fagocitan detritos celulares e hísticos, fibrina, bacterias residuales y neutrófilos muertos. La curación normal de las heridas depende de la participación de los macrófagos en la respuesta inflamatoria; se convierten en el tipo celular principal en el sitio de la inflamación después de que los neutrófilos se consumen.<sup>35</sup>

### Eosinófilos

Tiene el mismo tamaño, o quizá sean apenas más grandes, que los neutrófilos, su núcleo es típicamente bilobulado. En muchas inflamaciones la aparición de éstos es signo de regresión y resolución de la inflamación, pueden fagocitar complejos antígeno-anticuerpo, así como proteínas extrañas y degradar estas sustancias mediante las enzimas que contienen en sus gránulos.<sup>35, 36</sup>

### Basófilos

Constituyen el tipo de leucocitos menos abundante en el torrente circulatorio, presentando una proporción menos al 1%. Su principal función es intervenir en las reacciones de hipersensibilidad evitando la coagulación en el foco inflamatorio y controlan la exudación.<sup>37</sup>

### Linfocitos

Migran hacia los focos de inflamación empleando moléculas de adhesión y quimiocinas que reclutan a otros leucocitos. En los tejidos, los linfocitos B pueden dar lugar a las células plasmáticas secretoras de anticuerpos, y los linfocitos T son activados para secretar citocinas, por lo tanto inducen la inflamación y condicionan la naturaleza de la reacción inflamatoria.<sup>29</sup>

### Células plasmáticas

Son el resultado de la estimulación y la diferenciación de los linfocitos B, después que éstos reconocen los determinantes de algún antígeno. Su función principal es sintetizar y liberar al exterior moléculas de anticuerpos, los cuales están dirigidos específicamente contra el antígeno que estimuló el linfocito B del cual ellas derivan.<sup>38</sup>

### **3.4.3 Mediadores químicos de la inflamación**

Distintos sistemas de mediadores inflamatorios interaccionan para generar inflamación. Ningún mediador químico puede ser responsable de forma aislada de ninguna característica de la respuesta inflamatoria.

#### **3.4.3.1 Sistema del complemento**

Forma parte del sistema inmune y constituye una defensa inespecífica contra los microorganismos. Consta de aproximadamente 30 proteínas diferentes que se encuentran en el plasma sanguíneo y representan alrededor del 4% de todas las proteínas plasmáticas. En caso de reacciones se dirigen a los tejidos infectados y allí ejercen su acción.

Funciona de 3 maneras:

- Quimiotaxis. Los distintos factores del complemento atraen a las células inmunes para que los agentes patógenos puedan ser atacados y fagocitados.
- Oponización. Ciertos factores (“opsoninas”) se depositan sobre las bacterias y las marcan para que sean el blanco de las células fagocitarias.
- Ataque a la membrana. Otros factores del complemento se depositan sobre la membrana bacteriana y provocan la formación de poros que llevan a la lisis del agente patógeno.<sup>39</sup>

### **3.4.3.2 Quininas**

Son péptidos vasoactivos pequeños (10 aminoácidos), el más conocido es la bradiquinina. Las quininas no solo incrementan la permeabilidad vascular, también estimulan a los neutrófilos, y a los receptores del dolor, y presentan una actividad antimicrobiana similar a las defensinas. El sistema de las quininas se encuentra íntimamente relacionado con la cascada de la coagulación, puesto que la activación del factor XII es el episodio inicial en ambos sistemas.

La fibrina, producto final de la cascada de la coagulación, participa en la mayor parte de los procesos inflamatorios.<sup>27, 40-41</sup>

### **3.4.3.3 Factores activadores de plaquetas**

Los factores activadores de las plaquetas son liberados por los mastocitos y neutrófilos durante la degranulación. Tienen los siguientes efectos:

- Inducen la agregación y degranulación plaquetaria.
- Aumentan la permeabilidad vascular.
- Inducen la adhesión de los leucocitos al endotelio.
- Estimulan la síntesis de los derivados del ácido araquidónico.<sup>27</sup>

### **3.4.3.4 Aminas vasoactivas**

Se trata de mediadores de la inflamación que pueden ser liberados con rapidez por las células inflamatorias. Las dos aminas vasoactivas, histamina y serotonina, se

---



almacenan como moléculas preformadas en las células cebadas y otras células y se encuentran entre los primeros mediadores que se liberan en las reacciones inflamatorias agudas. La histamina la producen muchos tipos de células, sobre todo las células cebadas adyacentes a los vasos, así como los basófilos y las plaquetas circulantes.

La histamina preformada se libera de los gránulos de las células cebadas en respuesta a varios estímulos:

- Lesión física, como traumatismo o calor.
- Reacciones inmunitarias que afectan a la unión de anticuerpos.
- Proteínas liberadoras de histamina derivadas de los leucocitos.
- Neuropeptidos

La serotonina es también un mediador vasoactivo preformado, con efectos similares a los de la histamina. Se encuentra, principalmente, en el interior de los gránulos de cuerpos densos plaquetarios (junto con histamina y calcio) y es liberada durante la agregación plaquetaria.<sup>20</sup>

#### **3.4.3.5 Citocinas**

Son secretadas como una respuesta al estímulo que representan diferentes factores, externos o internos. Entre ellos, los principales son los antígenos de los agentes infecciosos, de sus productos de secreción (toxinas) o de los residuos metabólicos que

---

derivan de sus estructuras anatómicas. Las señales transmitidas originan una serie de eventos que son necesarios para limitar, rechazar o reparar, inmunológicamente, cualquier clase de daño tisular. La producción y la liberación al exterior de las citocinas es una parte importante de las respuestas inflamatoria e inmunitaria. En este último caso, destacan sus efectos reguladores sobre la proliferación y la activación de las células fagocíticas y de los linfocitos T y B.

En éstas se incluyen:

- Linfocinas: citocinas producidas por los linfocitos.
- Monocinas: citocinas producidas por monocitos/macrófagos.
- Interleucinas: citocinas que actúan entre los leucocitos (más de 15 tipos).
- Interferones: inhiben la replicación de los virus dentro de las células y activan a los macrófagos y las células citolíticas naturales.
- Factores de crecimiento.
- Factores de necrosis tumoral<sup>27,38</sup>

#### **3.4.3.6 Óxido nítrico**

Es sintetizado por la oxidación de la arginina, por unas enzimas denominadas sintetasas del óxido nítrico, de las cuales existen 3 formas diferentes, todas ellas son flavoproteínas y requieren NADPH como cofactor. Dos de ellas se expresan en el endotelio vascular y en el cerebro, son dependientes del calcio y se denominan

constitutivas. La otra enzima es inducible y se expresa en los tejidos tras diversos estímulos.

La función del óxido nítrico es diferente de qué sintetasa lo haya originado. El producido por las enzimas constitutivas posee acciones antiinflamatorias y actúa relajando el músculo liso vascular. Por el contrario, el producido por la enzima inducible produce vasodilatación, edema y participa como mediador de los procesos de las citocinas.

Se comporta como radical libre de vida media corta, 15 segundos, y en presencia de oxígeno es rápidamente metabolizado a nitritos o a nitratos. Las principales reacciones biológicas se producen con el oxígeno y los metales iónicos.<sup>27, 41</sup>

#### **3.4.4 Proteínas de fase aguda**

Las proteínas cuyas concentraciones séricas aumentan durante la inflamación se llaman proteínas de fase aguda, son sintetizadas mayormente por el hepatocito. Su producción se incrementa en forma rápida (entre 6 y 48 horas después de la infección) y notable (hasta 10000 veces) a consecuencia de la acción estimuladora mediada por las citocinas IL-6, IL-1 y TNF- $\alpha$ , producidas por el macrófago del tejido inflamado.

Los reactantes de fase aguda median mecanismos antimicrobianos poderosos y, por otra parte, protegen al huésped de las posibles acciones perjudiciales asociadas con el desarrollo de las reacciones inflamatorias, un ejemplo de ellas es la proteína C reactiva

(PCR), la cual, se puede determinar en el suero como marcador inflamatorio inespecífico y también se pueden realizar determinaciones seriadas para monitorizar la evolución de una enfermedad inflamatoria, como la enfermedad de Crohn.<sup>27, 42-43</sup>

#### **3.4.4.1 Ceruloplasmina**

Es una proteína de fase aguda que contiene siete átomos de cobre por molécula y transporta hasta el 95% del total del cobre circulante, se caracteriza desde el punto de vista estructural por presentar 3 tipos de sitios de unión para el cobre y, desde el punto de vista funcional, por catalizar la reducción de una molécula de oxígeno con formación de una de agua, sin la liberación de intermediarios potencialmente tóxicos.

Se sintetiza principalmente en hígado como una cadena polipeptídica simple y se secreta como una glicoproteína a nivel plasmático. Participa en la coagulación, la angiogénesis, la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), en el manejo de radicales superóxido y en el secuestro de iones libres de cobre.

Otra función importante es su actividad ferroxidasa que le permite regular la homeostasia del hierro (catalizando la conversión de  $\text{Fe}^{2+}$  a  $\text{Fe}^{3+}$ ), lo que facilita la transferencia de hierro a las proteínas de transporte y almacenamiento: transferrina y ferritina. Existe evidencia que señala que la capacidad ferroxidasa de la ceruloplasmina contribuye a evitar la formación de radicales libres mediante el bloqueo de la reacción de Fenton, (la cual requiere iones de Fe reducido), lo que hace suponer que posee

cierta capacidad antioxidante, es una proteína multifuncional, la función que la misma cumpla dependerá de los cambios en las condiciones fisiológicas y patológicas presentes en el organismo frente a una situación determinada.

En trastornos hereditarios del metabolismo del cobre, se observan niveles particularmente bajos de ceruloplasmina, por otra parte, niveles elevados de ceruloplasmina sérica son asociados con la presencia de enfermedades cardiovasculares e inflamatorias, esta proteína es fácilmente determinada mediante las técnicas de inmunodifusión radial y nefelometría.<sup>44-47</sup>

### **3.5 Corticoides**

Los corticoides (o glucocorticoides) son derivados sintéticos del cortisol o hidrocortisona, hormona producida en la región cortical de las glándulas suprarrenales. Tienen una gran importancia terapéutica hoy en día al ser potentes antiinflamatorios y con actividad analgésica en determinados síndromes dolorosos. Actúan a través de la unión a receptores celulares formando un complejo que se interioriza en el núcleo, tienen acciones reguladoras sobre los procesos celulares en áreas de inflamación aguda disminuyendo la llegada de leucocitos y de su actividad, y en áreas de inflamación crónica, disminuye la proliferación de vasos sanguíneos y fibrosis.

En las áreas linfoides ocasiona disminución de la expansión colonial de linfocitos T y B y de la acción de los linfocitos T secretores de citoquinas. Sobre mediadores inflamatorios e inmunitarios disminuye la síntesis y acción de citoquinas, incluyendo

muchas interleucinas, factor de necrosis tumoral gamma y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos.

La administración terapéutica de glucocorticoides produce un potente efecto antiinflamatorio e inmunosupresor. Inhiben las manifestaciones agudas y tardías de la inflamación, como el eritema, el dolor y la tumefacción iniciales y también las fases más tardías de cicatrización, reparación y reacciones proliferativas que se observan en la inflamación crónica.

Producen efectos sobre los mediadores de las respuestas inflamatorias e inmunitarias que comprenden lo siguiente:

- Disminución de la síntesis de prostanoides, debido a una menor expresión de la ciclooxigenasa 2.
- Disminución de la generación de citoquinas de IL-1 a IL-8 y factores de adherencia celular.
- Disminución de la generación de óxido nítrico inducido.
- Disminución de la liberación de histamina por los basófilos y reducción de la síntesis de IgG. <sup>48-49</sup>

El estudio de la inflamación puede llevarse a cabo a través de diversos marcadores y en modelos de experimentación animal como lo es el ratón.

## **3.6 Modelo experimental**

### **3.6.1 Modelo animal**

Un modelo animal puede definirse como el uso de un animal de experimentación que reproduce una enfermedad (o procesos de una enfermedad) de manera parecida al humano para permitir su conocimiento o abordaje mediante diferentes técnicas terapéuticas.<sup>50</sup>

Los modelos animales de enfermedades humanas han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de la investigación, siendo uno de los pasos fundamentales en la biomedicina, constituyen una herramienta esencial en todas las áreas de investigación biomédica desde el estudio de las enfermedades y el envejecimiento, hasta la validación de nuevas dianas terapéuticas con el descubrimiento y ensayo de nuevos fármacos.<sup>51-52</sup>

### **3.6.2 Diseño de Experimentación animal**

El diseño del experimento es solo una parte del desarrollo de la investigación, su éxito depende de las condiciones de vida del animal y de la calidad de los recursos humanos (especialización y acreditación), para ello se han especificado una serie de pautas y recomendaciones a seguir, como:

1. Seleccionar el modelo animal adecuado, el cual depende de la especie, cepa y de la calidad del animal.
2. Justificar el número de animales seleccionados el cual depende del protocolo de experimentación, la selección del inóculo: dosis, vía, frecuencia de inoculación y la determinación del punto final del experimento.
3. Realizar los procedimientos experimentales de acuerdo a los conocimientos sobre al adecuado manejo de animales.
4. Especificar el método de Eutanasia y definir el punto final humanitario del experimento.<sup>53</sup>

Al utilizar un modelo animal debemos tomar en cuenta que son sistemas biológicos complejos los cuales tendrán variación entre cada uno de ellos, además que en el diseño del experimento se requiere también la definición detallada de las características genéticas y ambientales, solo así, utilizando animales definidos y estandarizados, se obtendrán resultados reproducibles.<sup>54-55</sup>

### **3.6.3 Animal biológico**

Es una de las piezas fundamentales en las ciencias biomédicas que se define como cualquier especie animal (mamíferos, aves, reptiles, anfibios y peces) cuya calidad genética y ambiental ha sido controlada y asegurada, por lo cual son usados como modelos para investigar y comprender las causas, diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan al humano y a los animales, además de sus importantes

---



aportes en la docencia biológica, en el desarrollo, producción y control de medicamentos, alimentos y otros insumos, donde en muchos casos hasta la fecha son insustituibles.<sup>53, 56-57</sup>

### **3.6.3.1 Ratón**

Los ratones de laboratorio constituyen entre el 60 y 80% de los mamíferos usados en la investigación, esto debido a su capacidad de adaptación, a los conocimientos que se tienen sobre su fisiología, anatomía y a su fácil manejo.

Otro atributo del ratón es su ciclo corto de vida lo que permite el estudio de muchas generaciones en un lapso de muy pocos años, por lo tanto, el ratón es uno de los animales más importantes y utilizados para la investigación.<sup>58</sup>

Los roedores de laboratorio son las especies más utilizadas no sólo en el área oncológica sino en el estudio de infinidad de patologías.<sup>58</sup>

A principios del siglo XVIII el ratón fue utilizado en estudios de anatomía comparada, pero la aceleración de la investigación biológica en el siglo XIX, el renovado interés en la genética y las necesidades de un mamífero pequeño, económico, de fácil alojamiento y alimentación fueron los instrumentos para desarrollar el moderno ratón de laboratorio.<sup>58</sup>

Hoy en día es el modelo animal más usado para el análisis de enfermedades humanas ya que permite un control adecuado de la base genética del organismo, su estudio es

clave para decidir si una determinada estrategia terapéutica es efectiva o supone riesgos secundarios en la salud de los pacientes, se puede manipular en línea germinal y es posible inactivar genes de modo dirigido para lograr modelos de enfermedades humanas, sobre todo las que afectan al sistema inmune y al desarrollo embrionario, también para el estudio del cáncer y enfermedades tan frecuentes como la diabetes.<sup>51</sup>

Sus ventajas:

- Al tratarse de un mamífero, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre.
- Tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios.
- Comparte con el hombre el privilegio de ser las especies de mamífero mejor estudiadas desde el punto de vista genético.
- Existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, además de cientos de mutaciones y un gran número de arreglos cromosómicos disponibles.
- Es relativamente barato en comparación con otros animales experimentales.<sup>59</sup>

Sus desventajas:

- Dificultad en la recolección de material biológico
- Dificultad en la administración del fármaco
- Dificultad en las técnicas quirúrgicas.<sup>60</sup>

Finalmente, en este estudio se plantea evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens* en un modelo de ratones CD1 para respaldar las propiedades curativas de esta planta medicinal o en su defecto desmentirlas.

#### **4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

De acuerdo con datos de la OMS, 80 por ciento de la población de los países en desarrollo recurre al uso de distintos tipos de plantas medicinales para satisfacer o complementar sus necesidades médicas, esto es una práctica que ha llevado a cabo la población desde hace mucho tiempo y ha ido en aumento de generación en generación. De todas las especies de plantas que existen en México (aproximadamente 4 mil especies) la mayoría no han sido validadas de forma química ni farmacológica.

Por esto es necesario asegurar que las plantas utilizadas ejerzan el efecto deseado y no provoquen ningún efecto adverso, por lo cual se requiere llevar a cabo una investigación completa de cada una de las especies para determinar su utilidad médica.

*Sanvitalia procumbens* es una planta que la población utiliza principalmente en el Estado de Morelos para tratar procesos inflamatorios, sin embargo, no se tiene la información que compruebe dicho efecto, por lo que nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿El extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens* presentará actividad antiinflamatoria?

## **5. HIPÓTESIS**

Considerando el amplio uso empírico que en ciertas poblaciones mexicanas se da a *Sanvitalia procumbens* como antiinflamatorio, se espera observar esta actividad en un modelo de ratones CD1.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 General**

Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens* (Ojo de Gallo) en un modelo de ratones CD1.

### **6.2 Específicos**

- Obtener el extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens*.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso en un proceso de inflamación aguda usando el modelo de edema en cojinete plantar.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio del extracto acuoso en un proceso de inflamación crónica siguiendo el modelo de formación de granuloma con pellet de algodón.
- Determinar la presencia de ceruloplasmina como marcador de fase aguda.
- Determinar la presencia de nitritos como producto estable del óxido nítrico.

## **7. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Tipo de estudio**

Experimental, prospectivo, longitudinal y comparativo

### **7.2 Población de estudio**

Ratones CD1

### **7.3 Variables**

Independiente:

Tratamiento

- Solución salina (control negativo)
- Extracto acuoso ( 25, 50 y 100 mg/Kg)
- Indometacina (10 mg/Kg)
- Hidrocortisona (15 mg/Kg)

Dependiente:

- Grosor de la pata por el efecto
- Peso del granuloma (pellet de algodón)
- Marcadores ( nitritos y ceruloplasmina)

## 7.4 Técnicas

### 7.4.1 Preparación de extracto acuoso

#### Material

- Matraz Erlenmeyer 1L
- Embudo de vidrio
- Embudo Büchner
- Vaso de precipitado 500 mL
- Matraz volumétrico 1000 mL
- Caja de Petri
- Espátula
- Mortero con pistilo
- Licuadora
- Gasas
- Papel filtro
- *Sanvitalia procumbens* (Ojo de Gallo)

#### Equipo

- Rotavapor (Yamato – Modelo: BM500)
- Bomba de vacío (Koblenz)
- Estufa (Shel Lab)
- Balanza granataria (OHAUS)



## Procedimiento

La planta conocida como Ojo de Gallo se recolectó en el Estado de Morelos municipio de San Juan Texcalpan y se autentificó en el herbario FEZA-UNAM de la FES Zaragoza.

1. Pesar 150 g de la planta recolectada.
2. Licuar con 1 litro de agua.
3. Dejar dos noches la planta en agua a temperatura ambiente en un matraz Erlenmeyer de 1L.
4. Posteriormente filtrar utilizando un embudo de vidrio y gasas.
5. Filtrar al vacío utilizando papel filtro.
6. Una vez filtrado, eliminar el agua a una temperatura de 60 °C y bajo vacío con la ayuda del rotavapor. Una vez obtenido el concentrado colocarlo en la estufa a 37 °C en una caja de Petri durante 2 semanas.
7. Retirar el extracto seco con ayuda de una espátula y colocarlo en un mortero para pulverizarlo.
8. Colocar el extracto en una caja de Petri y posteriormente dejarlo en refrigeración.

## 7.4.2 Ensayo de inflamación aguda: Modelo de edema en cojinete

### plantar de ratón con carragenina<sup>61, 62</sup>

#### Material

- Sonda gástrica (Animal feeding needles, 20GX 1-1/2" Poper and Sons, Inc. Newhyde Park, NJ, USA).
- Vasos de precipitados de 20, 100 y 250 mL
- Tubos de ensayo 13x100
- Pipetas Pasteur
- Jeringas 1 mL

#### Reactivos

- Extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens*
- Carragenina tipo IV (Sigma)
- Indometacina (Indocid cápsulas de 25 mg- Aspen Port Elizabeth (Pty) Ltd, Sudafrica).
- goma Ghatti
- Solución salina (solución inyectable 0.9%)

#### Equipo

- Balanza granataria (OHAUS)
- Balanza analítica (ae ADAM)
- Vortex (Scientific Industries, Inc. Modelo K-550G)
- Sonicador (SONICS)

### Instrumentos

- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL
- Micrómetro (Scala)

### Material biológico

- Ratones CD1

### Procedimiento

1. Trabajar con 5 grupos de ratones, de 6 ratones cada uno y marcarlos de acuerdo al orden correspondiente.
2. Dejar en ayuno de 16 horas a todos los ratones, con acceso libre de agua.
3. Medir el grosor de la pata izquierda de cada uno de los grupos antes de la inyección de carragenina
4. Inyectar 50  $\mu$ L de carragenina al 1% en el cojinete plantar de la pata izquierda trasera.
5. Administrar oralmente mediante una sonda gástrica: 25, 50 y 100 mg/ Kg del extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens*.
6. Al grupo de referencia administrar mediante una sonda gástrica Indometacina (10 mg/Kg) disuelta en goma Ghatti al 1% en agua destilada, al grupo control negativo administrar solución salina fisiológica (10 mg/Kg).
7. Medir el grosor de la pata a los tiempos 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la inyección utilizando un micrómetro.
8. Calcular el porcentaje de inhibición de la inflamación con la siguiente ecuación:

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

Donde:

Ct = Tamaño de la pata (mm) 3 horas después de la inyección de Carragenina.

Co= Tamaño de la pata (mm) antes de la inyección de Carragenina.

### **7.4.3 Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón pellet:**

Material

- Sonda gástrica (Animal feeding needles, 20GX 1-1/2" Poper and Sons, Inc. Newhyde Park, NJ, USA).
- Algodones pellet
- Microtubos
- Jeringas 1 mL
- Vasos de precipitados de 20, 100 y 250 mL
- Placa de 96 pozos para ensayos de microtitulación (Cooke)
- cámara de éter

Reactivos

- Extracto acuoso de *Sanvitalia procumbens*
- Solución salina (solución inyectable 0.9%)
- Hidrocortisona (Flebocortid solución inyectable de 100 mg- Janssen-Cilac)

### Equipo

- Balanza analítica (a-e ADAM)
- Vortex (Scientific Industries, Inc. Modelo K-550G)
- Sonicador (SONICS)
- Estufa
- Microcentrífuga (Hermle – Modelo: Z233M-2)

### Instrumentos

- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL

### Material Biológico

- Ratones CD1

### Procedimiento

1. Pesar con exactitud 50 algodones pellet de 10 mg y esterilizarlos en la autoclave.
2. Utilizar 5 grupos de ratones, 6 ratones por cada grupo, marcarlos de acuerdo a las dosis utilizadas.
3. Implantar subcutáneamente en el dorso el algodón pellet y sanitizar.
4. A cada grupo administrar por sonda gástrica el extracto de *Sanvitalia procumbens* a diferente concentración (20, 50 y 100 mg/Kg), al control positivo administrar Hidrocortisona (15 mg/Kg) y al control negativo 0.2 mL de Solución Salina Fisiológica (10 mL/Kg) durante 10 días.

5. Al onceavo día anestesiarse a cada uno de los ratones en cámara de éter y por medio de una incisión del plexo axilar colectar muestras de sangre en micro tubos.
6. Sacrificar los animales y extraer el algodón-pellet, colocarlos en una placa de microtitulación y pesarlos para obtener el peso húmedo, posteriormente colocarlos en la estufa a 37 °C durante una semana, transcurrido ese lapso pesarlos para obtener el peso seco.
7. Extraer el bazo, el corazón, el hígado y el riñón de todos los ratones y colocarlos en cajas de Petri, pesar cada uno de ellos para obtener el coeficiente de relación órgano/animal:

$$\text{Peso del órgano/ Peso del ratón} \times 100$$

8. Centrifugar las muestras de sangre obtenidas a 5000 rpm durante 5 minutos para obtener el suero, alicuotar y colocarlos en el congelador.

#### **7.4.4 Determinación de Ceruloplasmina**

##### Material

- Vasos de precipitado de 50 mL
- Tubos de ensayo de 13x100
- Placas de 35 mm (Falcon)

#### Reactivos

- Agarosa al 1%
- PBS
- Azida de sodio

#### Equipo

- Balanza analítica (ae ADAM)
- Baño metabólico (PRECISION)

#### Instrumentos

- Pipetas de 2 y 5 mL
- Micropipeta de 40-200  $\mu$ L (Marca: Labsystems- Modelo:046908)
- Micropipeta de 5-50  $\mu$ L ( Socorex Swiss)

#### Material Biológico

- Suero de conejo anti-ceruloplasmina

#### Procedimiento

1. Colocar 6 tubos de ensaye en un baño metabólico a 45 °C.
2. Pesar 0.2 g de Agarosa y colocarla en 20 mL de PBS, disolver en el horno de microondas en 3 ciclos de 10 segundos.
3. Colocar 2 mL de Agarosa en cada uno de los tubos de ensaye.
4. Agregar posteriormente a cada tubo 150  $\mu$ L de suero anti-ceruloplasmina de ratón obtenido de un conejo, agitar en el Vortex y depositar el contenido de cada tubo en una placa de 35 mm antes de que solidifique.

5. Tapar y dejar a que gelifique por 5 min. a temperatura ambiente
6. Hacer a cada pozo de la caja Falcon cuatro orificios pequeños con una distancia de 1 cm cada uno y en sentido de las manecillas del reloj.
7. Colocar en cada orificio 5  $\mu$ L de cada una de las muestras, mantener la placa en refrigeración durante 48 horas.
8. Realizar las mediciones de los halos de precipitación en mm de cada uno de los orificios y obtener la concentración de éstos tomando en cuenta como referencia una concentración de 21.6 mg/dL de Ceruloplasmina con un halo de precipitación de 4mm de diámetro.

#### **7.4.5 Determinación de Nitritos**

##### **7.4.5.1 Plateado de Cadmio**

###### Material

- Tubos de Ensaye 13x100
- Matraz volumétrico

###### Reactivos

- Cadmio granular
- Ácido clorhídrico
- Sulfato de cobre al 5%
- Cloruro de amonio al 5% pH=9
- Sulfato de zinc



- Nitrito de sodio
- Agua destilada

#### Equipo

- Rocker Platform (Bellco Glass. Inc.)
- Centrífuga (Hamilton Bell)
- Balanza analítica (ae ADAM)
- Vortex (Scientific Industries, Inc. Modelo K-550G)
- Espectrofotómetro UV/Visible (JENWAY- Modelo: 6305)

#### Instrumentos

- Micropipeta de 40-200  $\mu\text{L}$  (Marca: Labsystems- Modelo:046908)
- Micropipeta de 100-1000  $\mu\text{L}$  (Labsystems)
- Pipetas de 2 y 5 mL

#### Procedimiento

1. A 30 tubos de ensaye de 13 x 100 se les colocan 0.5 g de cadmio metálico y se lavan con ácido clorhídrico 0.1 N.
2. Agregar 2 mL de sulfato de cobre al 5%, agitar por 10 minutos con un agitador de placa horizontal y lavar 3 veces con agua destilada, para eliminar el cobre.
3. Lavar nuevamente con ácido clorhídrico 0.1 N centrifugando a 3500 rpm durante 5 minutos.
4. Lavar con cloruro de amonio al 5% pH= 9 y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.
5. A 100  $\mu\text{L}$  de suero agregar 300  $\mu\text{L}$  de agua destilada y agitar.

6. Adicionar 20  $\mu\text{L}$  de sulfato de zinc, mezclar y posteriormente centrifugar a 10 000 rpm durante 5 minutos.
7. Eliminar el cloruro de amonio de los tubos con cadmio activado y adicionar el sobrenadante del centrifugado anterior.
8. Agitar en un agitador (rocker) durante 15 minutos y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos.
9. Tomar 200  $\mu\text{L}$  del sobrenadante

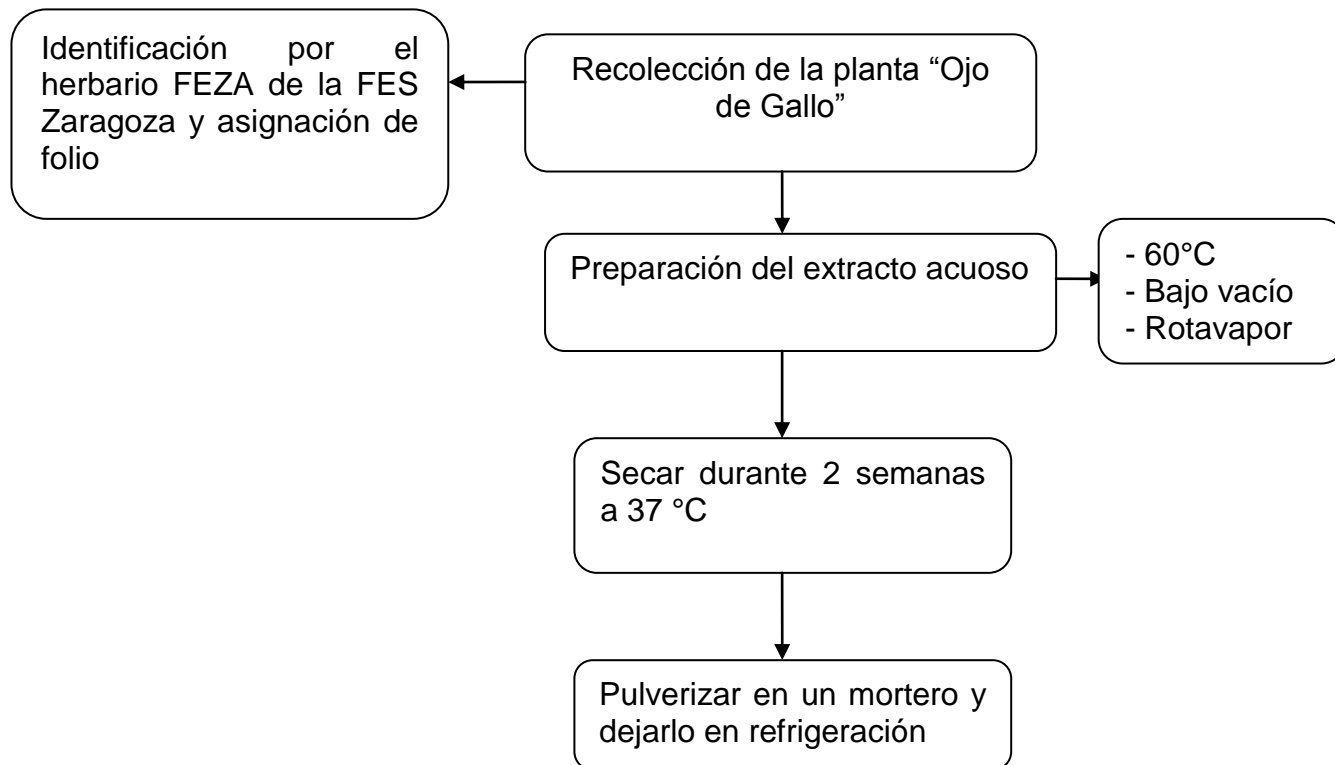
#### 7.4.5.2 Ensayo

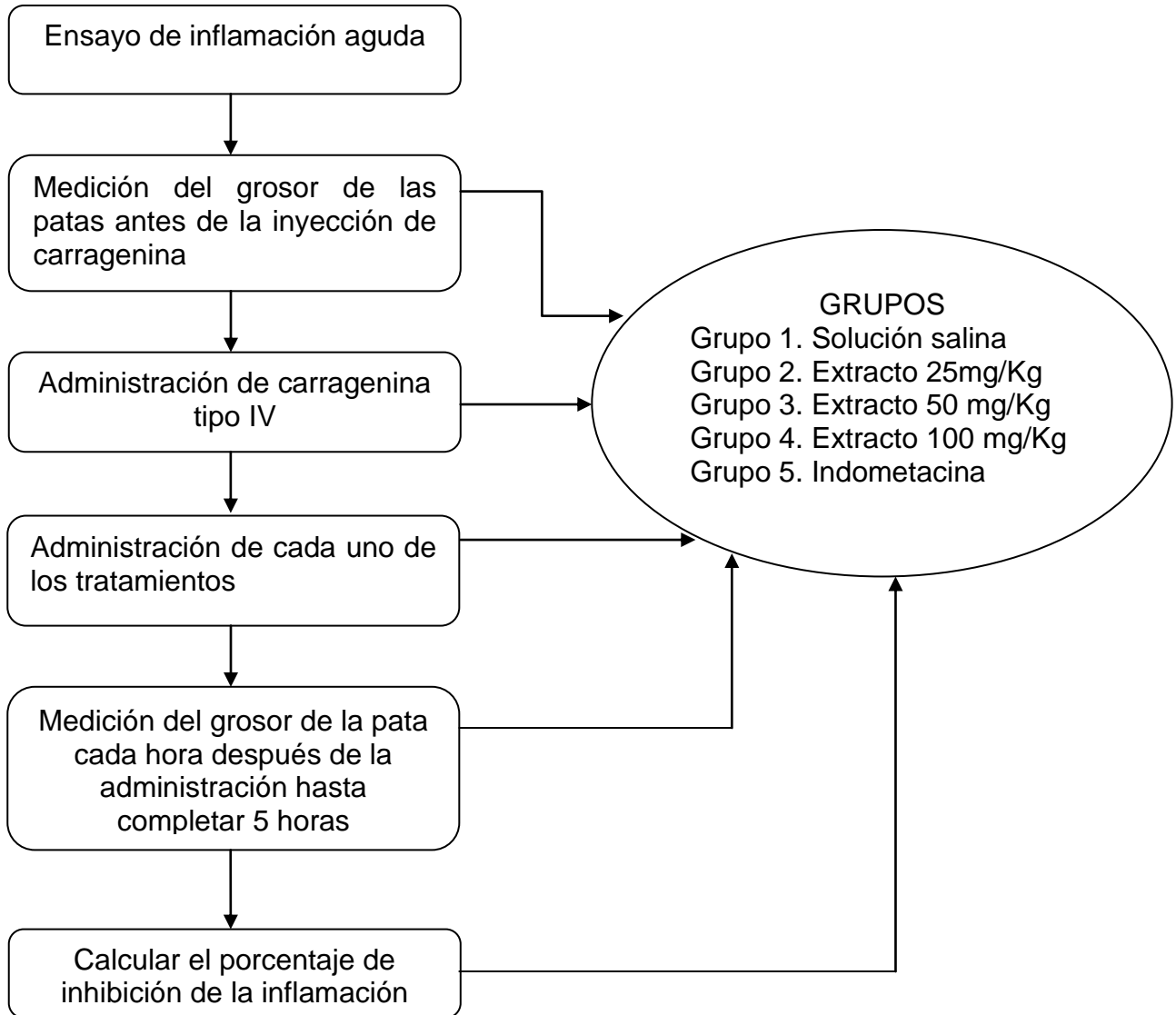
1. Preparar al momento una solución de 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de Nitrito de Sodio.
2. Realizar la siguiente curva de calibración:

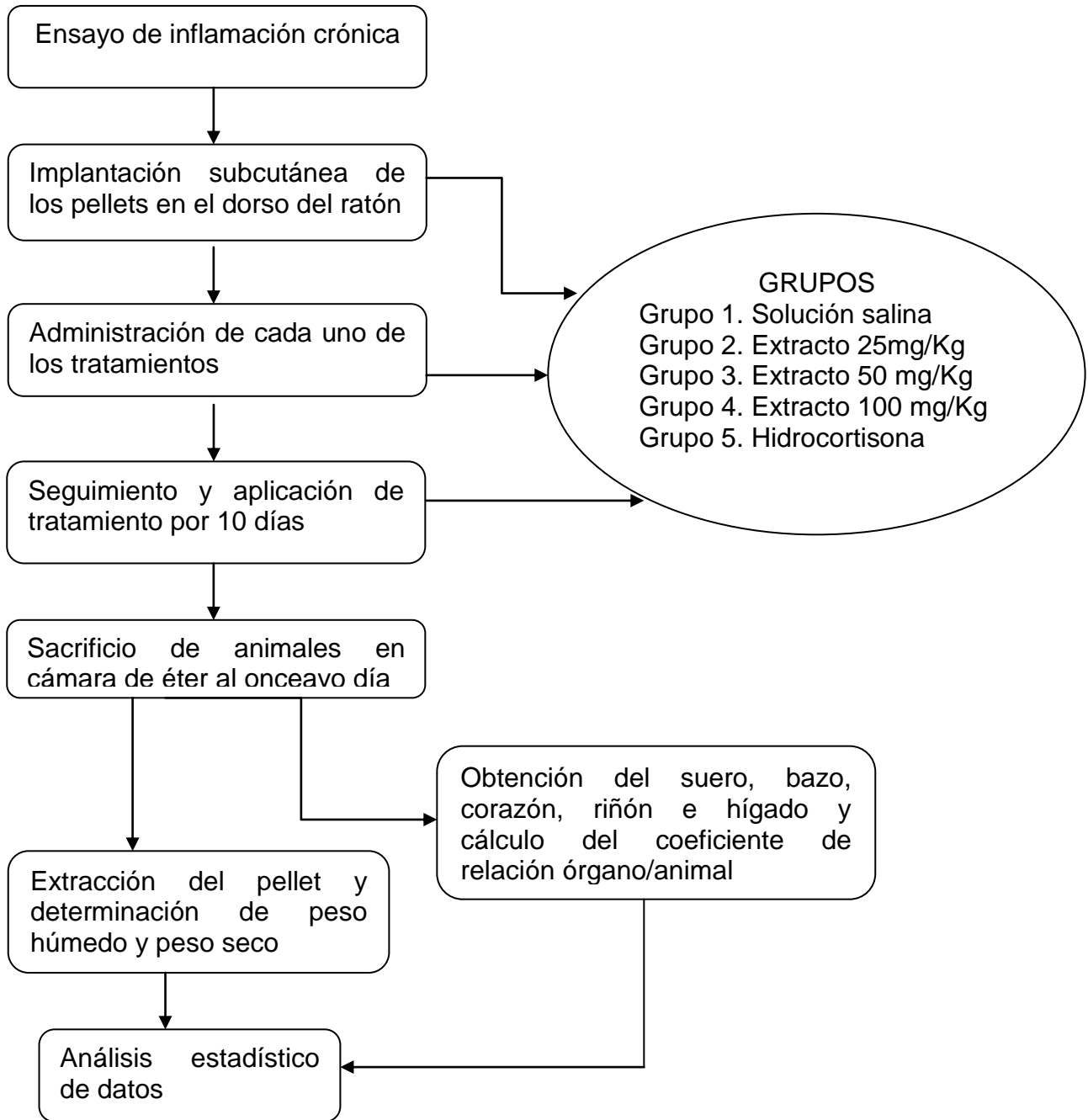
Tubo	Estándar ( $\mu\text{L}$ )	Agua destilada ( $\mu\text{L}$ )	Concentración [ $\mu\text{g}/\text{mL}$ ]
1	0	900	0
2	100	800	0.20
3	200	700	0.40
4	300	600	0.60
5	400	500	0.80
6	500	400	1
muestra	200 del sobrenadante	700	_____

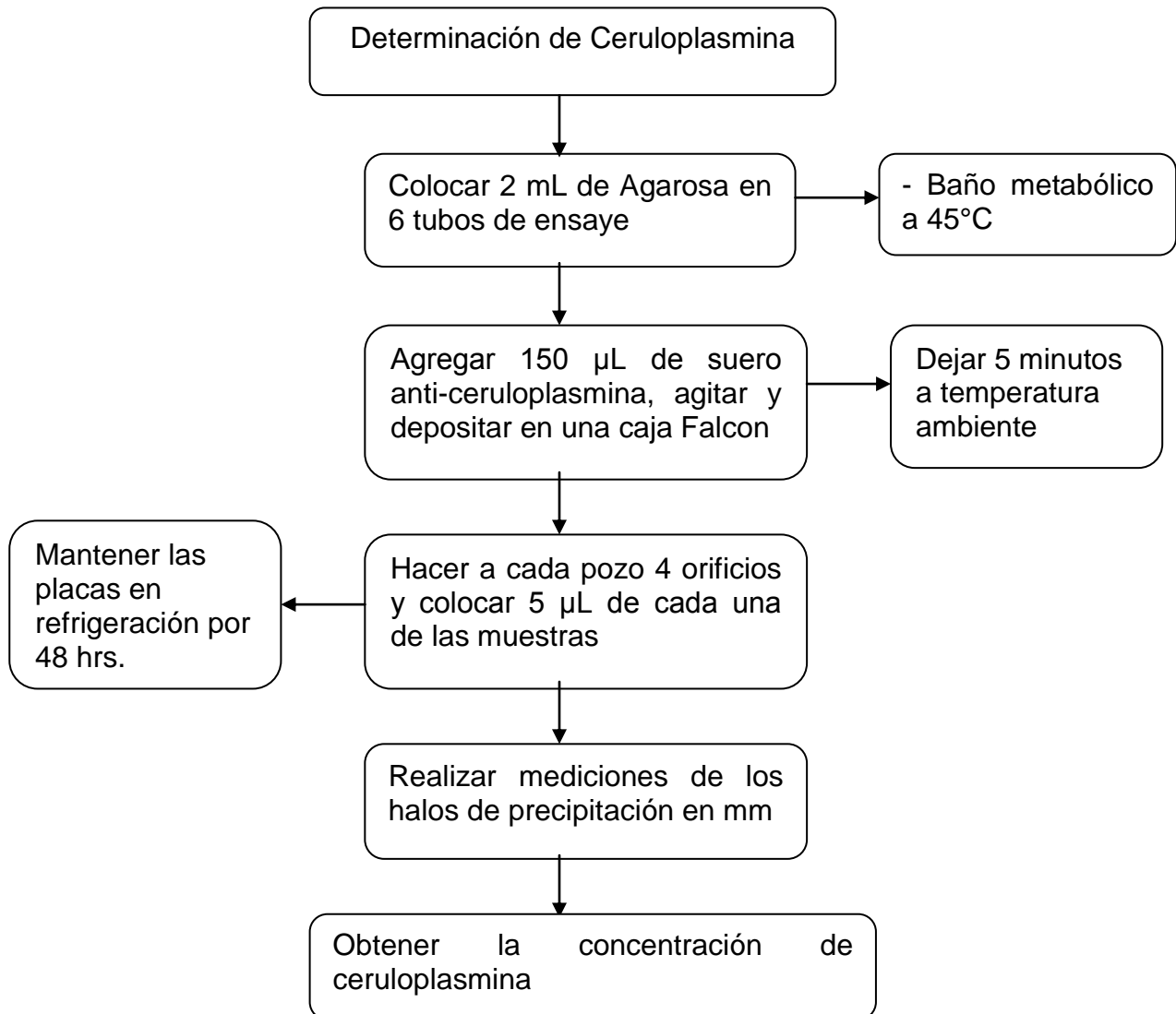
3. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de sulfanilamida e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente
4. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  del reactivo de NED, mezclar e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
5. Leer a 540 nm en el espectrofotómetro.

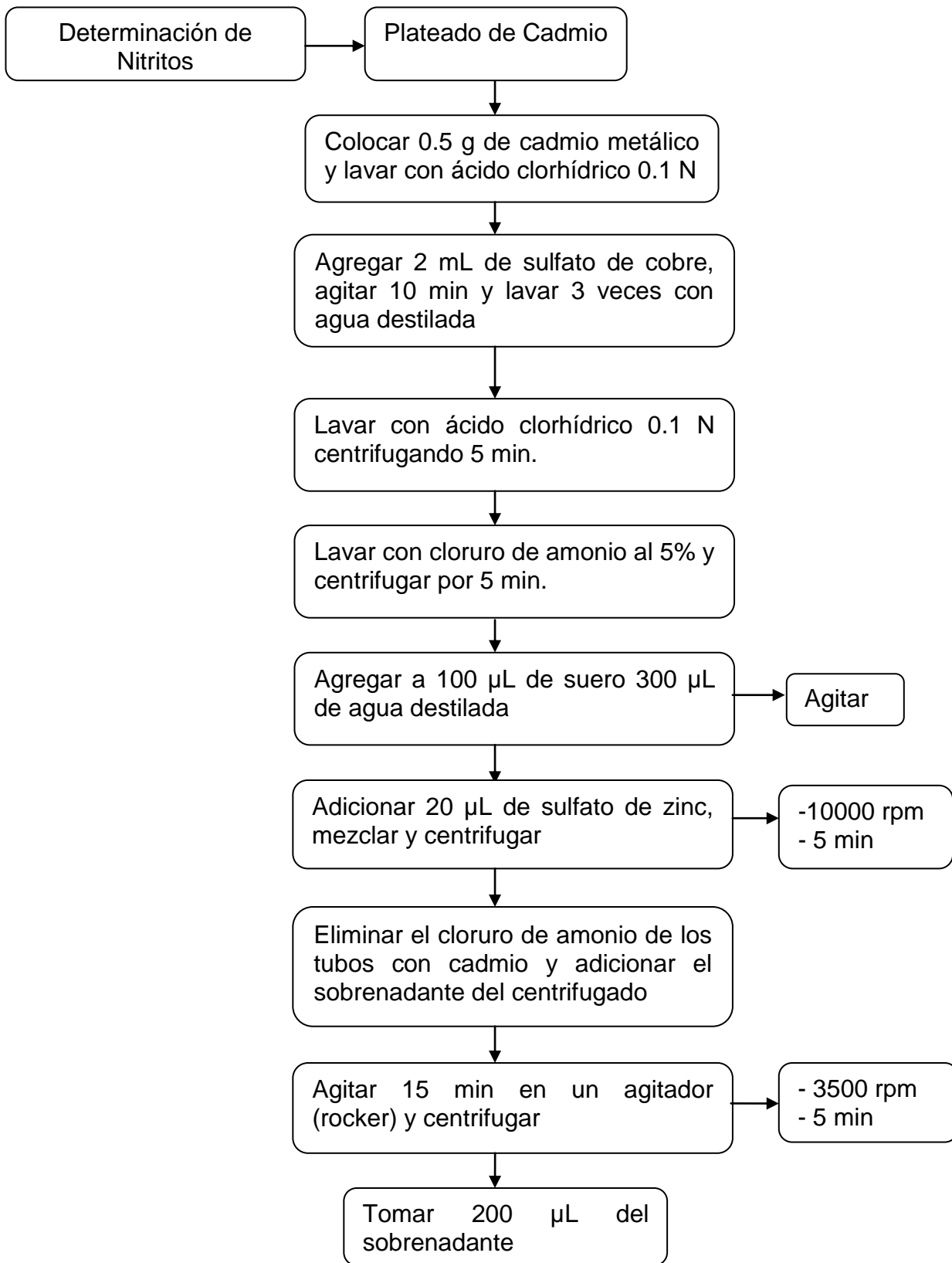
### 7.5 Diagrama de Flujo



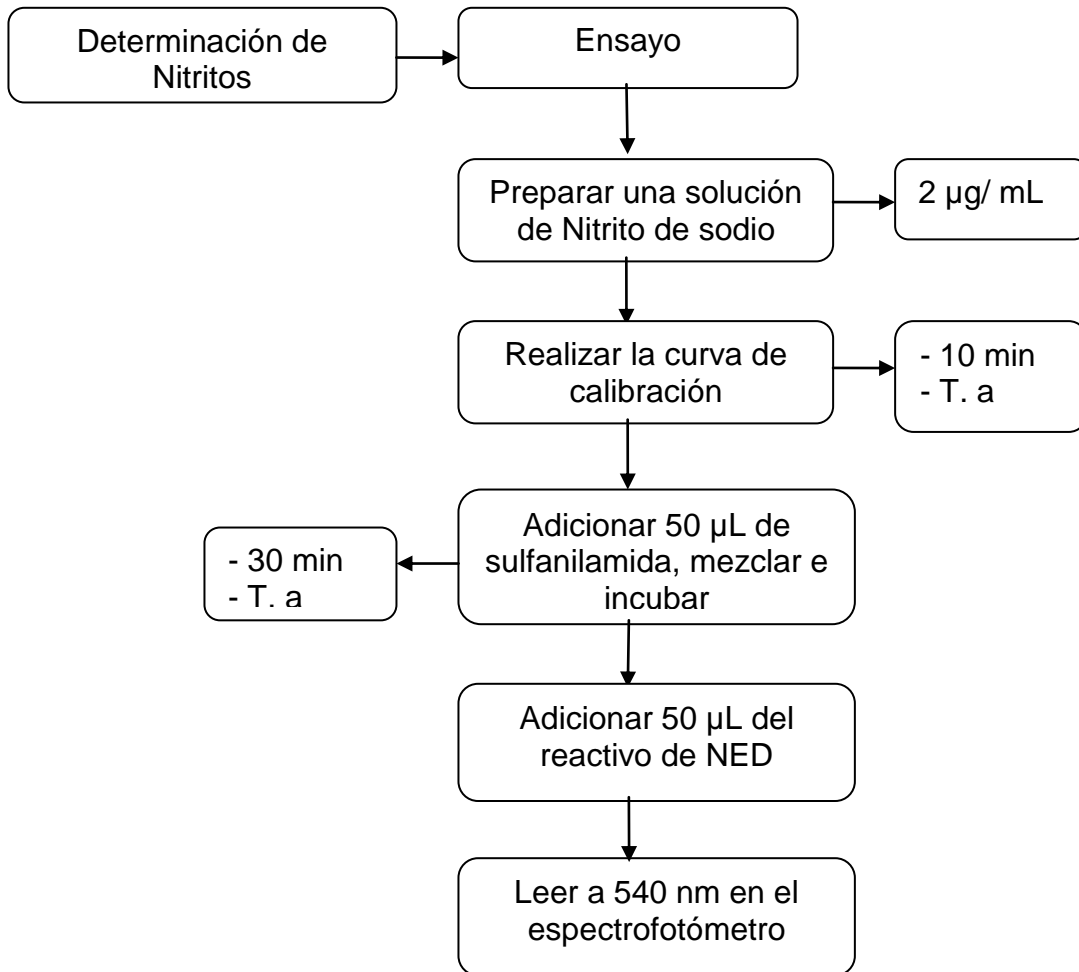












## **7.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico se realizó con el programa SPSS versión 21. Los resultados obtenidos se evaluaron con la prueba de ANOVA y prueba de Tukey como *Post Hoc* con un intervalo de confianza de 95%.

## 8. RESULTADOS

La planta fue autenticada en el herbario de la FES Zaragoza (FEZA)-UNAM y se le asignó el número FEZA 13626, 150 g de la planta se utilizaron para llevar a cabo la obtención del extracto acuoso el cual se obtuvo a una temperatura de 60°C y bajo vacío, con la ayuda de un rotavapor. Se obtuvo un rendimiento del 6.8%.

En la tabla 1 se muestran los porcentajes de inhibición de la inflamación de cada uno de los tratamientos. Se observa que el porcentaje de inhibición de la inflamación del grupo tratado con *Sanvitalia procumbens* fue mayor con respecto al grupo control negativo y menor comparado con el grupo tratado con Indometacina.

En la tabla 2 se muestra el grosor de las patas en cada uno de los tratamientos 3 y 4 horas después de iniciado el proceso inflamatorio. Se observa que el grosor de las patas en los ratones tratados con *Sanvitalia procumbens* fue menor con respecto al grupo control negativo, la diferencia fue estadísticamente significativa con una  $p \leq 0.05$  y fue mayor con respecto al grupo tratado con Indometacina la cual tuvo una diferencia estadísticamente significativa con una  $p \leq 0.05$ , las concentraciones del extracto no mostraron diferencia significativa entre ellas.

En la tabla 3 se muestra el peso húmedo y peso seco de los pellets utilizados en cada uno de los tratamientos, en los cuales no se observa una diferencia estadísticamente significativa.

En la tabla 4 se muestra el índice de los órganos diseccionados de cada uno de los tratamientos, en los cuales no se observa una diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado con el extracto comparado con el grupo control negativo.

En la tabla 5 se muestran las concentraciones de ceruloplasmina para cada uno de los tratamientos. Se observa que los grupos tratados con el extracto no presentan una diferencia estadísticamente significativa con el grupo control negativo, mientras que los grupos tratados con Hidrocortisona comparados con los demás tratamientos si presentan una diferencia estadísticamente significativa con una  $p \leq 0.05$ .

En la tabla 6 se muestran las concentraciones de nitritos. Se puede observar que las medias tanto del grupo control positivo, como del grupo tratado con el extracto, en comparación con el grupo control negativo son menores, sin embargo, aunque exista esta tendencia de las medias no se observa una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos.

## 8.1 Ensayo de inflamación aguda: Modelo de edema en cojinete plantar de ratón con carragenina.

Tabla 1. Porcentaje de inhibición de la inflamación de cada uno de los tratamientos.

	Solución salina (-)	Extracto (mg/Kg)			Indometacina (+)
	n= 6	25	50 n=6	100	n=6
% de inhibición	0	56.41	53.10	66.96	79.32

Tabla 2. Grosor del cojinete plantar en mm de cada uno de los tratamientos, a las 3 y 4 horas.

Tiempos	Solución salina (-)	Extracto (mg/Kg)			Indometacina (+)
	n= 6	25	50 n=6	100	n=6
3 horas	3.9 ± 0.11 *	3.2 ± 0.26*+	3.1 ± 0.160*+	3 ± 0.094*+	2.6 ± 0.085*+
4 horas	4.3 ± 0.13*	3.2 ± 0.11*+	3.1 ± 0.179*+	3 ± 0.192*+	2.7 ± 0.106*+

Prueba ANOVA y prueba de Tukey como *Post hoc*.

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

La diferencia de medias es significativa a  $p \leq 0.05$

\*  $p = 0.001$  cada tratamiento vs grupo control negativo

+  $p = 0.002$  los extractos vs Indometacina

## 8.2 Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con algodón pellet.

Tabla 3. Peso húmedo y peso seco de los pellets de cada uno de los tratamientos.

Parámetros	Solución salina (-) n= 6	Extracto (mg/Kg)			Hidrocortisona (+) n=6
		25	50 n=6	100	
<b>Peso Húmedo</b>	96.3 ± 11.5	97.3 ± 6.5	104.7 ± 15.7	96.6 ± 15.4	94.7 ± 5.7
<b>Peso seco</b>	17.9 ± 2.1	18 ± 3.2	19.4 ± 2.8	19.5 ± 3	17.5 ± 1.2

Prueba ANOVA y prueba de Tukey como *Post hoc*.

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

La diferencia de medias es significativa a  $p \leq 0.05$

Tabla 4. Índice de los órganos diseccionados de cada uno de los tratamientos.

Parámetros	Solución salina (-) n= 6	Extracto (mg/Kg)			Hidrocortisona (+) n=6
		25	50 n=6	100	
<b>Índice esplénico</b>	0.46 ± 0.07	0.5 ± 0.12	0.5 ± 0.13	0.52 ± 0.08	0.32 ± 0.08
<b>Índice cardíaco</b>	0.44 ± 0.04	0.44 ± 0.06	0.43 ± 0.03	0.55 ± 0.11	0.50 ± 0.05
<b>Índice renal</b>	1.17 ± 0.07	1.14 ± 0.16	1.04 ± 0.13	1.20 ± 0.09	1.21 ± 0.07
<b>Índice hepático</b>	6.09 ± 0.51	5.94 ± 0.43	6.1 ± 0.51	5.5 ± 0.45	5.32 ± 0.44

Prueba ANOVA y prueba de Tukey como *Post hoc*

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

La diferencia de medias es significativa a  $p \leq 0.05$

### 8.3 Prueba de Ceruloplasmina y Nitritos

Tabla 5. Concentración de ceruloplasmina en cada uno de los tratamientos.

Parámetro	Solución salina (-) n= 6	Extracto (mg/Kg)			Hidrocortisona (+) n=6
		25	50	100	
<b>Ceruloplasmina</b>	51.8 ± 2.03	48.6 ± 3.41	49.5 ± 1.4	50.9 ± 4.95	45 ± 4.07*

Prueba ANOVA y prueba de Tukey como *Post hoc*.

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

La diferencia de medias es significativa a  $p \leq 0.05$

\*  $p < 0.05$  grupo control positivo vs tratamientos

Tabla 6. Concentración de nitritos en cada uno de los tratamientos

Parámetro	Solución salina (-) n= 6	Extracto (mg/Kg)			Hidrocortisona (+) n=6
		25	50	100	
<b>Nitritos</b>	0.57 ± 0.57	0.51 ± 0.35	0.31 ± 0.11	0.37 ± 0.15	0.49 ± 0.24

Prueba ANOVA y prueba de Tukey como *Post hoc*.

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

La diferencia de medias es significativa a  $p \leq 0.05$

## 9. DISCUSIÓN

Las plantas medicinales se han usado desde hace muchos años, son almacenes de varias sustancias que les dan propiedades curativas, se han aislado muchos compuestos y han sido estudiados en muy variados campos, sin embargo, hoy en día se continúan usando muchas plantas curativas en forma empírica sin ningún tratamiento industrial, incluso en algunas zonas estos siguen siendo la base más importante para mantener la salud de las comunidades.<sup>4</sup>

Muchos compuestos extraídos de plantas han demostrado tener actividad antiinflamatoria. La inflamación es una respuesta a estímulos nocivos como patógenos, células dañadas o cualquier otro agresor de naturaleza química, física o biológica.

En el método de edema plantar inducido por carragenina hay una reacción de carácter inflamatorio mediada en la primera fase de la inflamación por la liberación de diversos autacoides (histamina, serotonina, bradicinina) y en una segunda fase están presentes las prostaglandinas, esto dentro del proceso de inflamación aguda. Los compuestos inhibidores de la síntesis de prostaglandinas resultan eficaces en la inhibición de dicho edema.<sup>63</sup>

En el ensayo de inflamación aguda de nuestro estudio, a partir de los porcentajes de inhibición de la inflamación se observó que el grupo tratado con *Sanvitalia procumbens*



si presenta un efecto antiinflamatorio al compararlo con el grupo control negativo, sin embargo, los porcentajes de inhibición de la inflamación no siguen una cinética de dosis-respuesta, esto puede deberse a que las concentraciones del extracto son bajas, posiblemente aumentando la concentración, podríamos observar una mejor dosis-respuesta.

En el análisis estadístico ANOVA se observó diferencia estadísticamente significativa del grupo tratado con *Sanvitalia procumbens* respecto al grupo control negativo  $p < 0.05$ , con lo cual podemos sugerir que el extracto inhibe la liberación o acción de las prostaglandinas pero aún así resulta ser menos efectivo que la Indometacina, esto se puede deber a que éste fármaco es una sustancia pura y nuestro extracto de la planta no lo es.

La implantación subcutánea de pellets de algodón en los ratones da lugar a la formación de un granuloma que consiste en una cápsula fibrosa vascularizada que contiene fibroblastos e infiltrado de células mononucleares. En el ensayo de inflamación crónica los resultados obtenidos del peso húmedo y peso seco de los pellets nos mostraron que el efecto de los extractos de la planta tienen un mayor peso comparados con el grupo control negativo, lo que nos sugiere un efecto pro inflamatorio de los extractos, sin embargo, al realizarle el análisis estadístico no se encontró diferencia estadística significativa entre los grupos.

En muchas ocasiones se producen efectos adversos con fármacos que se caracterizan por la acción tóxica sobre un órgano o grupo de células. En nuestro estudio los índices de los órganos del grupo que recibió el extracto en el ensayo crónico, no resultaron significativos cuando se compararon con los índices de los órganos del grupo testigo, esto sugiere que la planta no tiene un efecto tóxico en los animales utilizados medido por la alteración de órganos.

Al medir la concentración de ceruloplasmina, que es una proteína de fase aguda, la cual se produce en hígado como una respuesta a procesos inflamatorios, se encontró diferencia estadísticamente significativa en el grupo control positivo en comparación con los otros tratamientos, ya que se utilizó un fármaco con actividad antiinflamatoria comprobada con el cual se esperaba que las concentraciones de ceruloplasmina fueran menores, en cuanto al grupo que recibió el extracto mostró menores concentraciones al compararlo con los valores encontrados en el grupo testigo negativo, sugiriendo que el extracto presentó un efecto antiinflamatorio, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Al medir la concentración de nitritos se observó que las medias de los extractos fueron menores en comparación con el grupo control negativo, sin embargo, la diferencia no fue estadísticamente significativa, lo cual nos sugiere que la administración del extracto al favorecer la respuesta inflamatoria, puede impactar en la cantidad y actividad oxidante de las células, de modo que, al disminuir la respuesta inflamatoria, disminuye

la activación celular y con esto la producción de especies oxidantes, lo cual puede manifestarse como una concentración de nitritos menor como se observó en este caso, aunque la diferencia no haya sido estadísticamente significativa.

## **10. CONCLUSIONES**

Dado que se observó una menor inflamación medida a través del grosor del cojinete plantar en los animales tratados con el extracto y una tendencia a menores niveles de ceruloplasmina y nitritos respecto al grupo control negativo, los resultados sugieren que la planta *Sanvitalia procumbens* si presenta actividad antiinflamatoria en fase aguda pero no la presenta en fase crónica.

## **11. PERSPECTIVAS**

1. Aislar e identificar los componentes activos de la planta para conocer cuál es la sustancia activa que está llevando a cabo el efecto.
2. Realizar el ensayo con dosis de 75, 150 y 300 mg/Kg. para observar de una mejor manera el efecto dosis-respuesta.
3. Extraer la planta en medio etanólico y realizar el ensayo para comparar el efecto en los 2 extractos.

## 12. ANEXOS

### ANEXO 1. Preparación de soluciones

#### Extracto

El peso promedio de los ratones de 35 g

Dosis 100 mg/Kg

$$100 \text{ mg} \text{ --- } 1000 \text{ g}$$

$$\underline{X= 3.5 \text{ mg}} \text{ --- } 35 \text{ g}$$

Lo máximo que se le puede administrar a un ratón son 0.2 mL y se requieren preparar 10 mL:

$$3.5 \text{ mg} \text{ --- } 0.2 \text{ mL}$$

$$\underline{X= 175 \text{ mg}} \text{ --- } 10 \text{ mL}$$

- Para la solución A pesar 175 mg y disolver en 10 mL de solución salina obteniendo una dosis de 100 mg/Kg.
- Para la solución B tomar 5 mL de la solución A y adicionar 5 mL de solución salina obteniendo una dosis de 50 mg/Kg
- Para la solución C tomar 5 mL de la solución B y adicionar 5 mL de solución salina obteniendo una dosis de 25 mg/Kg.

### **Carragenina (1%)**

- Pesar 50 mg de carragenina.
- Disolver en 5 mL de agua inyectable libre de pirógenos.

### **Goma ghatti (1%)**

- Pesar 0.2 g de goma ghatti.
- Disolver en 20 mL de agua destilada en el horno de microondas por ciclos de 10 segundos.

### **Indometacina (10 mg/Kg)**

Peso promedio de los ratones 35 g

- 10 mg --- 1000 g

$$\underline{X=0.35 \text{ mg}} \text{ --- } 35 \text{ g}$$

- 0.35 mg --- 0.2 mL

$$\underline{X= 1.75 \text{ mg}} \text{ --- } 1 \text{ mL}$$

Partimos de cápsulas de Indometacina de 25 mg

- Para la solución A: Disolver 25 mg de Indometacina en 5 mL de goma ghatti.
- Tomar de la solución A 1 mL y disolver en 2.85 mL de goma ghatti.

### **Hidrocortisona (15 mg/Kg)**

Ampolleta de 130 mg de polvo que contiene 100 mg de principio activo.

Peso promedio de los ratones 35 g

- 15 mg --- 1000 g

$$\underline{X=0.525 \text{ mg}} \text{ --- } 35 \text{ g}$$

- 0.525 mg --- 0.2 mL

$$\underline{X=26.25 \text{ mg}} \text{ --- } 10 \text{ mL}$$

- En 130 mg ---- 100 mg p.a

$$\underline{X=34.12 \text{ mg}} \text{ ---- } 26.25 \text{ mg p.a}$$

- Pesar 34.12 mg de Hidrocortisona.
- Disolver en 10 mL de solución salina.

### **Agarosa (1%)**

- Pesar 0.2 g de Agarosa.
- Disolver en 20 mL de agua destilada en el horno de microondas por ciclos de 10 segundos.



### Ácido clorhídrico (0.1N)

$$g = (N)(P_{eq})(V)$$

$$g = (0.1 \text{ N}) \left( \frac{36.46 \text{ g/mol}}{1 \text{ eq/mol}} \right) (0.1 \text{ L}) = \underline{0.3646 \text{ g/eq}}$$

$$V = \frac{m}{\rho}$$

$$V = \frac{0.3646 \text{ g}}{1.12 \text{ g/mL}} = 0.3255 \text{ mL}$$

- Medir con una pipeta graduada 0.3 mL de ácido sulfúrico.
- Adicionarlos en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.

### Sulfato de cobre (5%)

- Pesar 0.5 g de sulfato de cobre.
- Disolver en 10 mL de agua en un matraz Erlenmeyer.

### Cloruro de amonio (5%)

- Pesar 5 g de cloruro de amonio.
- Disolver en 100 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer.
- Ajustar a pH= 9 con una solución de borato de sodio.

### **Nitrito de sodio (2 µg/mL)**

- Pesar 20 mg de nitrito de sodio.
- Disolver en 100 mL de agua destilada.
- De la solución anterior tomar 1 mL y disolver en 100 mL de agua destilada.

### **Solución acuosa de ácido acético (15%)**

- Medir con una probeta 22.5 mL de ácido acético.
- Adicionarlos en 127.5 mL de agua destilada en un vaso de precipitado.
- 

### **Reactivo de sulfanilamida**

- Pesar 0.5 g de sulfanilamida.
- Disolver en 150 mL de ácido acético al 15% en un vaso de precipitado.
- Proteger el frasco de la luz.

### **Reactivo de NED**

- Pesar 0.2 g de N-(1-naftil)-etilendiamino diclorhidrato
- Disolver en 150 mL de ácido acético glacial al 15% en un vaso de precipitado.
- Proteger el frasco de la luz.

### 13. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Medicina Tradicional [Internet]. México: OMS; 2009. [Consultado el 5 de Marzo de 2013]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/es/>
2. Hernández G. Fitoquímica y evaluación de la actividad antiinflamatoria y citotóxica de extractos orgánicos y compuestos aislados de hojas de *Oncidium sphacelatum* Lindl. (Orchidaceae). [Tesis]. México: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 2010.
3. Argueta A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana; 2009 [Consultado el 15 de Abril de 2013]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>
4. Bueno M. Historia de las Hierbas Mágicas y Medicinales [Internet]. España: Estugraf Impresores; 2008 [Consultado el 20 de Abril de 2013]. Disponible en: [http://books.google.com.mx/books?id=yoaCtOsVcVEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.mx/books?id=yoaCtOsVcVEC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
5. Cosme I. El uso de las plantas medicinales. Intercultural [Internet]. 2008. [Consultado el 7 de Marzo de 2013]. Disponible en: [http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/8921/1/tra6\\_p23-26\\_2010-0.pdf](http://cdigital.uv.mx/bitstream/123456789/8921/1/tra6_p23-26_2010-0.pdf)

6. Bermúdez A, Oliveira M, Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 2005; 30(8): 453-459.
7. Organización Mundial de la Salud. Situación Reglamentaria de los Medicamentos herbolarios [Internet]. Alemania: OMS; 2000. [Consultado el 18 de Abril de 2013]. Disponible en: <http://apps.who.int/medicinedocs/es/d/Jwhozip58s/>
8. Rodriguez L, Reyes J, Burchiel S, Herrera D, Torres E. Risks and benefits of commonly used herbal medicines in Mexico. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2008 [Consultado el 30 de Abril de 2013]; 227(1) 125-135. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X07004516>
9. Serrano A, Cabrera L, Saldaña M, Ruiz B, Avendaño C. Riesgos de las plantas medicinales en uso concomitante con medicamentos. *Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud* [Internet]. 2003 [Consultado el 30 de Abril de 2013]; 27(6) 161-167. Disponible en: <http://www.msc.es/farmacia/infmedic>
10. Carballo A, Cortada C, Gadano A. Riesgos y beneficios en el consumo de plantas medicinales. *Theoría*. 2005; 14(2):95-108.
11. Monroy C, Monroy R. Análisis preliminar de la dominancia cultural de las plantas útiles en el Estado de Morelos. *Bol Soc Bot Mex* [Internet]. 2004 [Consultado el 3 de Mayo de 2013]; 74(1) 77-95. Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57707405>
12. Argueta A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana; 2009

[Consultado el 15 de Abril de 2013]. Disponible en:  
<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>

13. Arellano A, Flores J, Tun J, Cruz M. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. México: Universidad Autónoma de Yucatán; 2003.
14. Gómez H, González K, Domingo J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. 2011; 10(3):182-217.
15. Madariaga J. Inflamación [Internet]. Chile: Unidad de Anatomía Patológica; 2006 [Consultado el 4 de Junio de 2013]. Disponible en:  
<http://www2.udec.cl/~webpatologia/Inflamacion.htm>
16. Nathan C. Points of control in inflammation. Nature. 2002; 420(1):846-852.
17. Chuaqui B, Duarte I, González S, Rosenberg H. Manual de Patología General. 2<sup>da</sup> ed. Chile: Pontificia Universidad Católica de Chile; 2007.
18. Punchard A, Whelan C, Adcock J. The journal of Inflammation. J Inflamm. 2004; 1(1):1-12
19. Sánchez P, Sirera R, Peiró G, Palmero F. Estrés, depresión, inflamación y dolor. R.E.M.E. 2008; 11(28):1-15.
20. Kumar V, Abbas K, Cotran R, Fausto N, Mitchel N, Robbins R. Patología Humana. 8<sup>a</sup> ed. Barcelona: Elsevier; 2008.
21. García P. Inflamación. RAC. 2008; 102(1):91-159.

22. Rosado J, Mendoza V. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 2007; 32(2):58-69.
23. Pardo J. *Anatomía Patológica*. 2ª ed. España: Harcourt; 1997.
24. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby J. *Inmunología*. 5ª ed. México: Mcgraw-Hill Interamericana; 2004.
25. Parslow T, Stites D, Terr A, Imboden J. *Inmunología básica y clínica*. 10ª ed. México: El Manual Moderno; 1998.
26. Arnaiz A, Regueiro J, López C. *Inmunología*. Madrid: Editorial Complutense; 1995.
27. Anand A, O'Connor D. *Lo esencial en patología* [Internet]. Barcelona: Elsevier; 2011 [Consultado el 6 de Junio de 2013]. Disponible en: [http://books.google.com.mx/books/about/Lo\\_esencial\\_en\\_patolog%C3%ADa.htm?id=h9nP2pmeMccC&redir\\_esc=y](http://books.google.com.mx/books/about/Lo_esencial_en_patolog%C3%ADa.htm?id=h9nP2pmeMccC&redir_esc=y)
28. Prasad T, Venkat R, Swamy A, Reddanna P, Pulla G, Rami D. Exploring the Anti-inflammatory and Anti-cancer compounds from the leaves of *Acalypha indica*. *J Pharm Biol Sci*. 2012; 4(2):1-7.
29. Robbins R, Kumar V, Abbas K, Aster J. *Patología Humana*. 9ª ed. Barcelona: Elsevier; 2012.
30. Tortosa J, Crespo S. *Conceptos básicos de Patología Forense* [Internet]. México: Palibrio; 2011 [Consultado el 6 de Junio de 2013]. Disponible en: <http://www.google.com.mx/search?hl=es&tbo=p&tbn=bks&q=isbn:1617644803>

31. Castro del Pozo S, Pérez J. Manual de Patología General. 6<sup>a</sup> ed. Barcelona: Masson; 2006.
32. Pastrana J, García de Casasola G. Fisiopatología y patología general básicas para ciencias de la salud. España: Elsevier; 2013. 464 p.
33. Stevens A, Lowe J. Anatomía patológica. 2<sup>a</sup> ed. Madrid: Harcourt; 2001. 657 p.
34. Robbins R, Cotran R. Patología estructural y funcional. 8<sup>a</sup> ed. España: Elsevier; 2010.
35. Ross M, Pawlina W. Histología. Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular. 5<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2007. 975 p.
36. Thews G, Mutschler E, Vaupel P. Anatomía, fisiología y patofisiología del hombre [Internet]. Barcelona: Reverté; 1983 [Consultado el 8 de Junio de 2013]. 777 p. Disponible en: <http://www.google.com.mx/search?hl=es&tbo=p&tbm=bks&q=isbn:8429155791>
37. Silva M, García M, Castillo L, Ania J, Gómez D. Técnico especialista en Laboratorio. 2<sup>a</sup> ed. España: MAD; 2006. 639 p.
38. García T. Fundamentos de inmunobiología [Internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1997 [Consultado el 11 de Junio de 2013]. 551 p. Disponible en: [http://books.google.com.mx/books?id=YpP4WeZ2x14C&printsec=copyright.&redir\\_esc=y](http://books.google.com.mx/books?id=YpP4WeZ2x14C&printsec=copyright.&redir_esc=y)
39. Koolman J, Röhm K. Bioquímica. Texto y atlas. 3<sup>a</sup> ed. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2004.

40. Tizard I. Introducción a la inmunología veterinaria. 8<sup>va</sup> ed. España: Elsevier; 2009. 592 p.
41. Duró J. Reumatología clínica. España: Elsevier; 2010. 503 p.
42. Rugeles M, Patiño P, Montoya C. Inmunología. Una ciencia activa [Internet]. Colombia: Universidad de Antioquia; 2009 [Consultado el 11 de Junio de 2013]. 686 p. Disponible en: [books.google.com.mx/books?isbn=9587142306](https://books.google.com.mx/books?isbn=9587142306)
43. Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 5<sup>a</sup> ed. Argentina: Editorial Médica Panamericana; 2005. 485 p.
44. Hellman N, Gitlin J. Ceruloplasmin metabolism and function. Annu Rev Nutr. 2002; 22:439-452.
45. Martínez S, Tecles F, Parra M, Cerón J. Proteínas de fase aguda: Conceptos básicos y principales aplicaciones clínicas en medicina veterinaria. An Vet. 2001; 17:97-114.
46. Yapur V, Bustos M, González A, Negri G. Ceruloplasmina: determinación de su actividad ferroxidasa. Acta Bioquím Clin Latinoam. 2007; 41(3):51-347.
47. Martínez A, Anaya A. Relación entre biomarcadores de estrés oxidativo, proteínas de fase aguda y distintas actividades laborales del Distrito Federal. [Tesis]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 2013. p. 74.
48. González M. Tratado de medicina paliativa y tratamiento de soporte del paciente con cáncer [Internet]. Madrid: Médica panamericana; 2007 [Consultado el 11 de Junio de 2013]. 900 p. Disponible en: <https://www.google.com.mx/search?hl=es&tbo=p&tbm=bks&q=isbn:8498351316>



49. Mendoza N. Farmacología médica. México: Editorial Médica Panamericana; 2008. 1008 p.
50. Herráez V, Herranz R, López M. ¿Qué es un modelo animal? .Gaceta óptica. 2004; (382):20-24.
51. Rodríguez E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. Acta bioethica. 2007; 13(1): 25-40.
52. Blázquez E. Fundamentos Moleculares de la Medicina II. Madrid: Real Academia Nacional de Medicina; 2007. 249 p.
53. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. Biomedicina. 2006; 2(3): 252-256.
54. Department of Health and Human Services. Guidance for industry. Animal models. Essential Elements to Address Efficacy under the Animal Rule. Food and Drug Administration. 2009. 19 p.
55. Mrad A. Ética en la investigación con modelos animales experimentales. Alternativas y las 3 RS de Russel. Revista Colombiana de Bioética. 2006; 1(1):163-183.
56. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Guía para cuidado y uso de animales de experimentación. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. 2009. 90 p Cardoso C.
57. Altamirano A. Manual para manejo de animales de laboratorio. México: UNAM. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 1994. 97 p.

58. Fernández M. Utilización de modelos animales en investigación del Cáncer. *Salud Militar*. 2012; 31(1): 55-58
59. Benavides F, Guénet J. Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. España: Universidad de Alcalá; 2003. 309 p.
60. Fuentes F, Mendoza R, Rosales A, Cisneros R. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: Ratón. Lima: Centro Nacional de Productos Biológicos; 2008. 50 p.
61. Olajide A, Makinde J, Awe E. Effect 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: 113-117.
62. Marroquín R, Flores M, Carreón R, García M, Mora J, Aguilar A, Hernández A. 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. *J Ethnopharmacol*. 2009; 124(3):639-641.
63. Márquez Y, Alvear S, Montellano H, Meléndez M. Efecto antiinflamatorio de *Pinus leiophylla* Schlechtendal & Cham. en la rata. *Rev. Mex. Ciencias farmacéuticas*. 2008; 39(2):22-27.