

72  
2ej

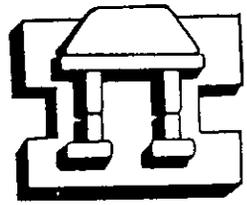


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
IZTACALA  
CARRERA DE BIOLOGIA

EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Calea zacatechichi*.

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A  
**HIPOLITO VENEGAS FLORES**



IZTACALA

TLALNEPANTLA, EDO. DE MEXICO

1999

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

278851



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.

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacología del Proyecto de Investigación en Productos Naturales de la Unidad de Investigación Interdisciplinaria para las Ciencias de la Salud y la Educación de la E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. Beatriz Vázquez Cruz, de quien agradezco la generosa asesoría recibida.

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Beatriz Vázquez Cruz, por sus valiosos consejos y observaciones en la dirección de este trabajo, así como por las facilidades y el generoso apoyo recibidos en el laboratorio de farmacología de la U.I.C.S.E., del cual la Dra. Vázquez es la responsable.

Al candidato a Doctor David Segura Cobos, por su extraordinaria y desinteresada colaboración en la realización de este trabajo, así como por el permanente apoyo e invaluable consejos para la elaboración del reporte final. Punto y aparte, mi más sincero reconocimiento por su gran calidad humana que lo convierte en una persona excepcional.

A la Bióloga Ma. Edith López Villafranco, por su valiosos consejos y sugerencias para el mejor desarrollo de este trabajo, así como por el apoyo recibido en el herbario de la E.N.E.P. Iztacala para la identificación de la planta utilizada en este trabajo.

A mis revisores de tesis: Q.F.B. Irma Delfin Alcala, M en C. Claudia Tzasná Hernández D., M en C. Eduardo Barrera Escorcia, Biol. Soledad Chino Vargas. Por las observaciones y sugerencias hechas, para la mejor presentación de este trabajo.

A la U.N.A.M., por el apoyo y facilidades recibidas a través del otorgamiento de un permiso especial para elaboración de tesis.

A mis compañeros de trabajo: Sr. Gustavo Garcia R. , Sr. Adauto Figueroa T. , Sr. Pedro Gonzales Zamora, Sra. Luz María Ramírez R. Por el apoyo e impulso recibidos para la realización y terminación de este trabajo.

A todas aquellas personas, que desinteresadamente me apoyaron en la realización de este trabajo.

Para mis hijas:

Aline Elizabeth Venegas Pantoja

y

Vania Itzel Venegas Pantoja

La vida es un proceso de constantes altibajos. Si alguna vez alcanzan la cima, mantengan la integridad y el equilibrio y jamás olviden su origen. Empero si el éxito fuera parte de un difícil sueño, entonces conviertanlo en propósito para hacerlo realidad; el entusiasmo, el esfuerzo, la tenacidad y la constancia sin duda serán sus mejores aliados.

“ Con todo mi amor ”

Para mis padres:

Salomon Venegas Castro

y

Epifania Flores Vivar

“ Con gratitud y cariño ”

## ÍNDICE

<b>Página</b>	
<b>Resumen</b>	vi
<b>I. Introducción</b>	1
1. Proceso Inflamatorio	1
1.1. Inflamación aguda	1
1.1.1. Inflamación crónica.	9
1.2. Mediadores químicos del proceso inflamatorio	11
1.3. Mediadores químicos de origen celular	14
1.3.1. Histamina	14
1.3.2. Serotonina	16
1.3.3. Prostaglandinas	17
1.3.4. Vía ciclooxigenasa	19
1.3.5. Vía lipooxigenasa	21
1.4. Mediadores químicos de origen plasmático	23
1.4.1. Sistema de las cininas	24
1.4.2. Sistema del complemento	26
1.4.3. Vía Clásica	26
1.4.4. Vía Alternativa	27
1.4.5. Vía Plaquetaria	28
1.5. Fármacos Antiinflamatorios	29
1.5.1. Antiinflamatorios no esteroideos	29
1.6. Antiinflamatorios esteroideos	32
2. Medicina Tradicional	34
3. Descripción Botánica	35
3.1. <i>C. zacatechichi</i>	35
3.2. Sinonimia popular	36
3.3. Taxonomía de <i>C. zacatechichi</i>	36
3.4. Distribución geográfica	36
3.5. Usos Medicinales	36
3.6. Composición Química	37
<b>II. Antecedentes</b>	40
<b>III. Objetivo</b>	41
<b>IV. Material y Métodos</b>	42
1. Materiales	42
1.1. Material biológico	42
2. Adquisición de la planta	42
3. Preparación del extracto acuoso	42
4. Reacciones de identificación fitoquímica	43
5. Investigación de la actividad antiinflamatoria	43
5.1. Formación de edema en las extremidades posteriores de las ratas por administración de carragenina (tratamientos por	

por vía intraperitoneal)	43
5.2. Formación de edema en las extremidades posteriores de las ratas por administración de carragenina (tratamientos por vía oral)	44
5.3. Migración celular a la cavidad peritoneal, por administración de carragenina (tratamientos por vía intraperitoneal)	45
5.4. Migración celular a la cavidad peritoneal por administración de carragenina (tratamientos por vía oral)	46
5.5. Prueba de contorsión en ratones (tratamientos por vía intraperitoneal)	47
5.6. Prueba de contorsión en ratones (tratamientos por vía oral)	47
<b>V. Análisis estadístico</b>	48
<b>VI. Resultados</b>	49
1. Reacciones de identificación fitoquímica	49
2. formación de edema en las extremidades posteriores de las ratas por administración de carragenina (tratamientos por vía intraperitoneal)	50
2.1. formación de edema en las extremidades posteriores de las ratas por administración de carragenina (tratamientos por vía oral)	51
2.2. Migración celular a la cavidad peritoneal por administración de carragenina (tratamientos por vía intraperitoneal)	52
2.3. Migración celular a la cavidad peritoneal por administración de carragenina (tratamientos por vía oral)	53
2.4. Prueba de contorsión en ratones (tratamientos por vía intraperitoneal)	54
2.5. Prueba de contorsión en ratones (tratamientos por vía oral)	55
<b>VII. Discusión</b>	56
<b>VIII. Conclusiones</b>	61
<b>IX. Anexo</b>	62
<b>X. Bibliografía</b>	63

## Resumen

*Calea zacatechichi*, arbusto de la familia Asteraceae habita en las regiones cálidas de la República Mexicana abarcando desde la península de Yucatán hasta los Estados de Morelos, Veracruz y San Luis Potosí. La medicina tradicional popular la reporta como antiinflamatorio en problemas de vesícula biliar, apéndice, e hígado (Martínez, 1961; Diaz, 1976; Argueta y col., 1994). Sin embargo no existen estudios farmacológicos que apoyen este uso, por lo cual el objetivo de este trabajo de tesis, fue estudiar si el extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi* tiene efecto antiinflamatorio y analgésico. Las hojas se extrajeron con agua destilada a ebullición por 10 minutos en una proporción de 1 g de hojas por 20 mL de agua y se ensayó en ratas Wistar macho de 250-300 g de peso utilizando los modelos de inflamación aguda: a) formación de edema por administración subplantar de carragenina, b) migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal por administración de carragenina y c) se realizó la valoración de la analgesia por la prueba de contorsión en ratones de la cepa CD1 de 20-25 g de peso. El extracto fue administrado por dos vías, oral e intraperitoneal en dosis de 10 y 100 mg/kg ; como fármaco estándar se utilizó indometacina 10 mg/kg. En la prueba de formación de edema por vía intraperitoneal, el extracto en ambas dosis inhibió la formación de edema en 56 y 55 % en relación al grupo control al cual se administró solución salina al 0.9 % que incrementó el volumen en (263.74  $\mu$ L) a las cuatro horas. Por vía oral, iguales dosis de extracto inhibieron la formación de edema en 52 y 50 % respectivamente en relación al control que incrementó el volumen en (257.08  $\mu$ L) en el mismo lapso de tiempo. En relación a los grupos tratados con indometacina, estos mostraron una inhibición del edema de 77.16 % por vía intraperitoneal y 74.3 % por vía oral.

En la prueba de migración celular a la cavidad peritoneal, el extracto de *C. zacatechichi* en dosis de 10 y 100 mg/kg de peso, inhibió la migración celular en 29.79 % y 52.08 % respectivamente en relación al grupo control que mostró la migración de neutrófilos más alta (13 373 neutrófilos/mL). Por vía oral, la

inhibición de la migración fue de 44.39 % y 60.19 % respectivamente en relación al control (13493 neutrófilos/mL). Por vía intraperitoneal, la indometacina inhibió la migración de neutrófilos en 75.56 %. Por vía oral, la dexametasona 1 mg/kg de peso inhibió la migración de neutrófilos en 46.97 %.

En la prueba de contorsión el extracto de *C. zacatechichi* en dosis de 1, 10 y 100 mg/kg de peso aplicadas por vía intraperitoneal, redujo el número de contorsiones en 28.5 %, 47.68 % y 50.14 % respectivamente en relación al control que mostró un número mayor de contorsiones en un lapso de 20 minutos. Por vía oral, la reducción del número de contorsiones fue de 17.44 %, 37.43 % y 38.42 %, respectivamente en relación al control en igual lapso de tiempo. La indometacina por vía intraperitoneal disminuyó las contorsiones en 93.7 %, y por vía oral en 93.26 %.

Las pruebas fitoquímicas preliminares para reconocer compuestos con posible actividad antiinflamatoria, dieron positiva la reacción para: alcaloides, coumarinas, esteroides, flavonoides y sesquiterpenlactonas. Estos elementos sumados a los anteriores y al hecho que el extracto mostró actividad por vía oral lo cual evidencia su absorción por esta vía, nos permite concluir que el extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi* contiene uno o más componentes con actividad antiinflamatoria y analgésica que justifican el uso de esta planta como antiinflamatorio en la práctica de la medicina tradicional popular.

## I. INTRODUCCIÓN.

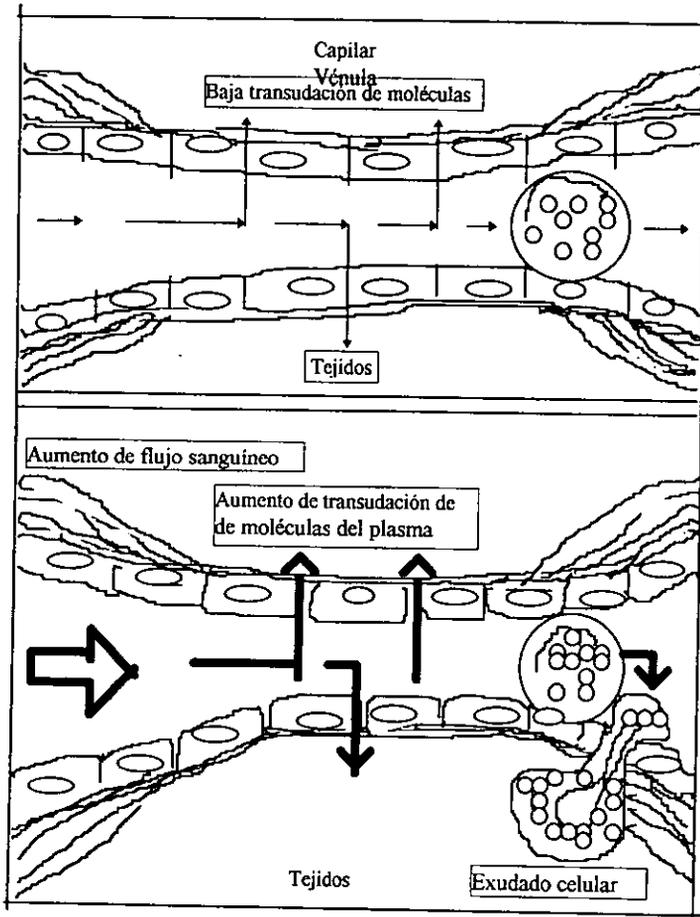
### 1. Proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio es uno de los procesos patológicos más frecuentes e importantes que se encuentran en la práctica de la medicina. En alguna de sus múltiples formas y manifestaciones, la inflamación se esconde tras una de las causas más importantes de muerte en el mundo actual, la infección y representa además, una característica permanente de muchas otras enfermedades que si bien no son mortales, si provocan sufrimiento e incapacidad (Pérez, 1987). Durante mucho tiempo, el proceso inflamatorio fue considerado como un mecanismo natural de defensa, sin embargo, actualmente se ha observado que bajo algunas circunstancias es también el responsable directo de muchos síntomas y complicaciones que se presentan en gran número de enfermedades (Pérez, 1987). En general, el desarrollo del proceso inflamatorio implica la participación directa de alguno de los muchos agentes causales posibles, los cuales presentan una gran diversidad de origen que involucra desde simples traumatismos de tipo mecánico, físicos en forma de calor, radiación, etc., químicos (sustancias tóxicas y corrosivas), biológicos (agentes de tipo bacteriano, virus y hongos) e inmunológicos (reacciones del tipo antígeno-anticuerpo). De alguna forma, la naturaleza del agente lesivo define las características de la evolución del proceso inflamatorio, así como la intensidad y duración, elementos que permiten diferenciarlo en procesos de inflamación aguda e inflamación crónica (Robbins, 1997).

#### 1.1. Inflamación aguda.

La existencia de una lesión tisular producida por algún agente causal, genera en consecuencia un proceso de liberación de diversas sustancias, las cuales producen una serie de cambios espectaculares a nivel de los tejidos. Lo que generalmente se reconoce como un proceso de inflamación, el cual se ilustra en la figura 1 (Guyton, 1997).

(a)



(b)

FIGURA 1: En el esquema (a) se representa el tejido normal. En el esquema (b), algunas de las principales alteraciones que ocurren durante el desarrollo del proceso inflamatorio. Incremento del flujo sanguíneo, mayor transudación de grandes moléculas séricas en el lecho capilar y migración leucocitaria a través de las vénulas. (Modificado de Roitt, 1996).

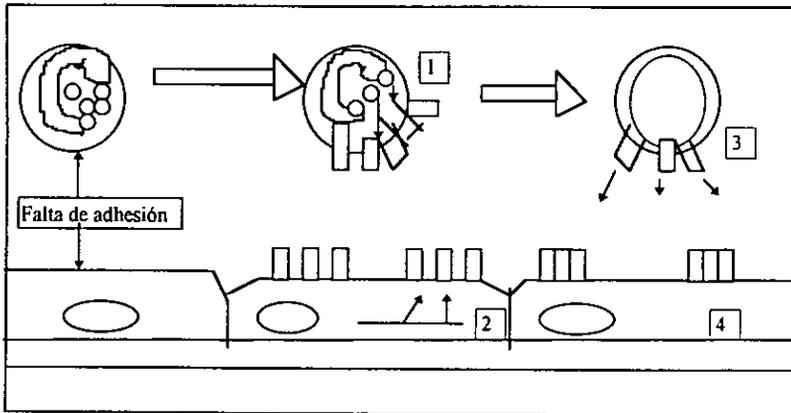
Este conjunto de cambios a nivel tisular que ocurren durante el desarrollo del

proceso inflamatorio agudo, en general se caracteriza por el desarrollo de eventos bien definidos, algunos de los cuales señalamos a continuación (Guyton, 1997).

- 1) Vasodilatación de los vasos sanguíneos locales con el consiguiente exceso de flujo sanguíneo local.
- 2) Incremento de la permeabilidad capilar con el paso de grandes cantidades de líquido de los espacios intersticiales.
- 3) A menudo la coagulación de líquido en los espacios intersticiales por una excesiva cantidad de fibrinógeno y de otras proteínas que salen de los capilares.
- 4) Migración de granulocitos y monocitos al tejido.
- 5) Tumefacción de las células tisulares (Guyton, 1997).

El conjunto de cambios vasculares ilustrado en la figura 1, generalmente se manifiestan en forma temprana después de la agresión al tejido. Primero se produce vasoconstricción arterial en forma pasajera, luego de manera progresiva se transforma en vasodilatación que afecta la microcirculación del área lesionada y trae consigo incremento del flujo de la circulación e incremento de la temperatura, lo cual, produce una coloración roja en la zona inflamada. Simultáneamente aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos favoreciendo con ello la salida de líquido plasmático hacia el espacio intersticial, dando paso a la formación de "edema". El edema genera una elevada concentración de eritrocitos en los pequeños vasos e incrementa la viscosidad disminuyendo la velocidad del flujo, fenómeno denominado como "estasis" (Roitt, 1996; Guyton, 1997). En la medida en que se produce el estancamiento del flujo, los leucocitos se marginan de la columna central estableciendo contacto con el endotelio el cual poco después, puede observarse prácticamente tapizado de este tipo de células, lo que da lugar al fenómeno conocido como "marginación leucocitaria".

Posteriormente los leucocitos se adhieren a la superficie endotelial a través de una interacción específica entre moléculas de adherencia complementarias figura 2, las cuales están presentes en las superficies leucocitarias, endotelial, en células cebadas y basófilos (Pérez, 1987; Guyton, 1997). En la tabla 1, son mencionadas algunas de las principales moléculas de adhesión en el endotelio, en leucocitos, en células cebadas y basófilos (Hamawy, 1994; Roitt, 1996).



#### Modulación de la adhesión leucocitaria.

FIGURA 2 : En general se reconocen cuatro formas para reforzar la unión entre leucocitos y endotelio. Muchas de las células poseen reservorios de moléculas de adhesión que pueden desplazarse en forma rápida hacia la superficie celular. 1) Las células endoteliales del área inflamada, pueden sintetizar nuevas moléculas de adhesión. 2) Moléculas como LFA-1, tienen la capacidad de aumentar su afinidad después de la activación celular. 3) La reorganización de las moléculas de adhesión en la superficie de la célula, puede generar zonas de alta avidéz. 4) En la práctica, las células pueden servirse de varios de estos mecanismos, además de que existe la posibilidad de cambios de afinidad posteriores a la interacción inicial entre las células (Esquema modificado de Roitt, 1996).

TABLA 1: Principales moléculas de adhesión (Hamawy, 1994; Roitt, 1996).

En endotelio	En leucocitos	En células cebadas y basófilos
a) E-Selectinas	a) Integrinas	a) Superfamilia de las inmunoglobulinas
ELAM-1	LFA-1	LAM-1
MP-140	CR1	LFA-2
MEL-14	CR3	gp140
b) Familia del supergén de las inmunoglobulinas	MO-1	LFA-3
ICAM-1	P150	
ICAM-2	P95	
VCAM	MAC-1	
	L-selectinas	

Una vez que el proceso de adhesión se realiza, los leucocitos atraviesan la membrana basal trasladándose al espacio extravascular, fenómeno conocido como "diapédesis", ilustrado en la figura 3, el cual se traduce en un mecanismo de agregación celular en el área lesionada. La diapédesis no es un fenómeno específico de los leucocitos, también se ha observado que ocurre con otros tipos de células como eritrocitos, linfocitos, monocitos y algunos otros elementos circulantes que salen de los capilares. La diapédesis es un fenómeno en apariencia netamente pasivo, considerando que ocurre particularmente cuando la "estasis" y la vasodilatación se encuentran en un estado relativamente pronunciado (Roitt, 1996; Guyton, 1997).

Una vez que los leucocitos se encuentran fuera de los vasos, son fuertemente atraídos en una sola dirección que los conduce hacia el sitio de la lesión, a través de factores quimiotácticos en la forma que se describe en la figura 3. Algunos de estos factores son: los factores del complemento (C5, C6, C7, C3a, C5a ), algunas endotoxinas, restos necróticos de neutrófilos, trombina, caseína, calicreína, prostaglandina E<sub>2</sub>, leucotrieno (LTB<sub>4</sub>), interleucinas (IL-8), el factor quimiotáctico neutrofílico (NCF), fibrinopéptidos y algunos productos de la degradación de la fibrina. Este proceso de

desplazamiento leucocitario es lo que conocemos como “quimiotaxis”. Los eventos principales que ocurren durante este proceso, así como las principales moléculas quimiotácticas que participan, se describen en la figura 3, (tabla 2) (Clerici, 1983; Pérez, 1987; Guyton, 1997).

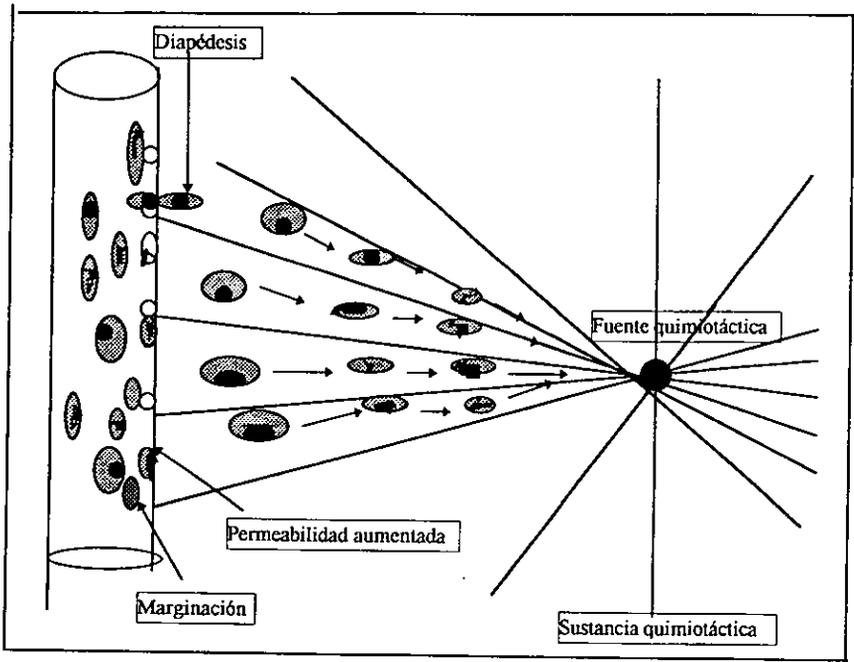


FIGURA 3: El esquema describe el proceso de quimiotaxis, fenómeno en que ocurre el desplazamiento de los neutrófilos en forma unidireccional, atraídos por una fuente quimiotáctica generada por una sustancia producida en el sitio de la lesión tisular, que desarrolla el proceso de inflamación aguda (Modificado de Guyton, 1997).

TABLA 2: Principales moléculas quimiotácticas que actúan en leucocitos  
(Modificado de Roitt, 1996).

Factor.	Características.	Origen.	Acción en:
C5a	Péptido de 77 aminoácidos	N terminal de cadena C5a	Neutrófilos, eosinófilos, macrófagos
F-Met-Leu-Phe	Tripéptido con bloqueo de N terminal	Procariotas	Neutrófilos eosinófilos macrófagos
LTB <sub>4</sub>	Metabólito del ácido araquidónico a través de la lipooxigenasa	Mastocitos basófilos macrófagos	Neutrófilos macrófagos eosinófilos (presentes en ECF)
IL-8	proteína de 10 kDa	Monocitos activados	Neutrófilos, basófilos

Uno de los grandes beneficios derivados del proceso de quimiotaxis en el foco de inflamación es la "fagocitosis", fenómeno que se describe en la figura 4. El proceso de fagocitosis consiste básicamente en un mecanismo de reconocimiento de todos los materiales extraños al organismo, la ingestión celular y digestión del agente o de los materiales extraños convirtiéndose quizás, en la función de mayor importancia que los neutrófilos y macrófagos llevan a cabo, traducándose en un importante mecanismo de protección y defensa para el organismo durante el desarrollo del proceso inflamatorio y en general, ante la amenaza constante de los agentes medioambientales.

Por otra parte, la acción de los fagocitos se lleva a cabo de manera selectiva, ya que de otro modo podría implicar la posible inclusión de algunas células y estructuras normales del organismo. El que este proceso se lleve a cabo de manera correcta, depende de manera fundamental de tres importantes factores. El primero, está en relación directa con las características naturales de los tejidos, las superficies lisas generalmente presentan una cierta resistencia a la acción fagocitaria; las superficies rugosas en cambio, aumentan la probabilidad de ser fagocitadas.

El segundo factor, considera la repulsión de cargas, la mayoría de las sustancias naturales del organismo, presentan cubiertas de tipo proteínico que ejercen acción protectora y permiten repeler la fagocitosis, a diferencia de los tejidos vivos, los tejidos muertos y la mayoría de las partículas extrañas al organismo, generalmente carecen de este tipo de cubiertas convirtiéndolas en fácil blanco de la acción de los fagocitos.

El tercer factor depende de la capacidad del organismo para utilizar sus propios medios específicos para el reconocimiento de los materiales extraños, característica importantísima que depende fundamentalmente del sistema inmunitario, el cual es responsable de producir los anticuerpos necesarios e indispensables para combatir los agentes de tipo infeccioso como las bacterias. Los anticuerpos se adhieren a las membranas bacterianas haciéndolas especialmente susceptibles de ser fagocitadas. Para conseguir este objetivo, la molécula del anticuerpo se combina con el producto C3 de la denominada cascada del complemento, parte adicional importante del sistema inmunitario. La molécula de C3 se une entonces a los receptores de la membrana de los fagocitos, dando inicio al proceso de fagocitosis en la forma en que se describe en la figura 4. Finalmente, el proceso llevado a cabo en forma completa se reconoce como "opsonización" (Guyton, 1997).

Las células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) juegan también un papel determinante como factores de remoción de algunos estímulos y restos celulares; se ha observado que en la medida en que muestran la capacidad para fagocitar y digerir al estímulo nocivo, también presentan la capacidad para liberar enzimas líticas capaces de amplificar y prolongar el proceso inflamatorio en forma excesiva, generando en ocasiones más daños que beneficios en los tejidos los cuales posteriormente, en muchos casos se han manifestado como una de las principales causas que dan origen a procesos de inflamación de otra índole, la inflamación crónica (Roitt, 1996; Guyton, 1997).

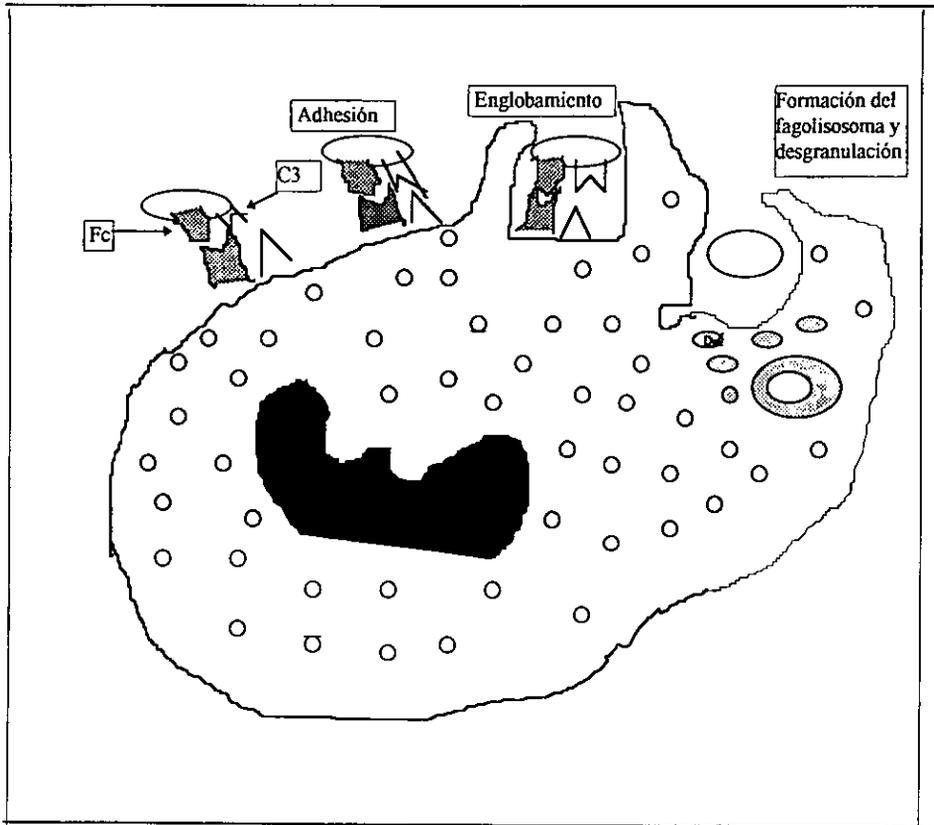


FIGURA 4: La fagocitosis de una partícula extraña implica la adhesión y unión de Fc y C3 a receptores específicos localizados en la membrana celular del leucocito. La mayoría de los microorganismos no son reconocidos si no se encuentran revestidos de factores séricos (opsoninas) (Modificado de Unkeless, 1989).

### 1.1.1. Inflamación crónica.

Cuando un estímulo inicial en una reacción inflamatoria no es eliminado por la misma reacción o mediante un control adecuado, entonces persiste un estado constante de inflamación en el cual prevalece la infiltración de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, proliferación de fibroblastos e incremento de tejido conjuntivo (fibrosis), así como la destrucción celular (Bauman y col., 1994). Esta modalidad prolongada de

inflamación da lugar al desarrollo de patologías como la silicosis, tuberculosis, y ,en general. a trastornos autoinmunes donde de manera característica existe abundancia de tejido granulomatoso, exudado, monocitosis con muchas células multinucleares gigantes formadas por fusión, linfocitos y acumulación de células plasmáticas. La invasión de tejido conectivo genera fibrosis con posibles hiperplasias localizadas o generalizadas dependiendo de la naturaleza y el lugar del proceso inflamatorio crónico (Pérez, 1987; Robbins, 1997). En la práctica, es difícil determinar el momento exacto en que ocurre la transición de inflamación aguda a crónica, no obstante, la respuesta inflamatoria en el caso de la segunda presenta características específicas que permiten su consideración por separado, las cuales se detallan en la tabla 3 (Pérez, 1987; Sibille, 1993; Robbins, 1997).

**TABLA 3: Algunas diferencias entre inflamación aguda e inflamación crónica (Modificada de Pérez, 1987).**

	<b>Inflamación aguda</b>	<b>Inflamación crónica</b>
a) Cambios vasculares	Muy significativos	Menos significativos, proliferativos
b) Tipos celulares	Leucocitos polimorfonucleares	Células mononucleares (linfocitos, macrófagos, cels. plasmáticas) etc. cels. epiteliales y gigantes en inflamación granulomatosa
c) Cambios extracelulares	Formación de exudado, lesión aguda de los tejidos	Organización del exudado, coexistencia de lesión y reparación de tejidos
d) Mediadores químicos	Mediadores plasmáticos, aminas vasoactivas, lípidos ácidos, algunos contenidos lisosómicos	Además de todos los anteriores, linfocinas, fosfolipasa A <sub>2</sub>
e) Resultado final del proceso		A menudo la lesión del tejido es mediada por células inflamatorias; papel destacado de la respuesta inmunológica en la morfología de la lesión

Desde el punto de vista clínico, la manifestación de un proceso de inflamación crónica generalmente suele presentarse bajo alguna de las formas siguientes:

1) Puede presentarse como la continuación de un proceso de inflamación aguda por persistencia de un estímulo inflamatorio, o por alguna interferencia con el proceso de curación normal.

2) La reincidencia de brotes de inflamación aguda, generalmente es un factor determinante para la manifestación de un proceso de inflamación crónica.

3) Puede darse de manera insidiosa en forma de una respuesta prolongada de baja intensidad sin episodio agudo sintomático clásico. Algunas de las enfermedades más incapacitantes en el ser humano como la artritis reumatoide y la tuberculosis, corresponden a ésta última (Pérez, 1987; Robbins, 1997).

## **1.2. Mediadores químicos del proceso inflamatorio.**

Un mediador inflamatorio es cualquier sustancia endógena cuya concentración aumenta en el sitio del traumatismo inflamatorio, asociada con la aparición de por lo menos una respuesta o cambio estructural del tejido (Pérez, 1987; Roitt, 1996). La búsqueda de mediadores químicos de las diversas respuestas y cambios estructurales de los tejidos en la inflamación aguda fue iniciada por Sir Thomas Lewis al intentar explicar las diversas reacciones vasculares de la piel frente a una lesión partiendo de lo más elemental la observación. En 1924 una de las primeras hipótesis en este sentido, propuso la existencia de un factor humoral como la razón del aumento de la permeabilidad capilar durante un proceso inflamatorio agudo, debido a que los efectos locales de la histamina eran idénticos a los obtenidos con muchos otros tipos de irritación, lo cual sugería la idea de una sustancia química o alguna otra relacionada con ella (sustancia H) la cual al ser liberada en los tejidos, provocaba el aumento de la permeabilidad capilar. En 1936, Menkin criticó la idea de Lewis y propuso que el principio radicaba en los exudados inflamatorios y podía ser extraído. El principio fue llamado leucotaxina debido a que también atraía a los leucocitos y marcó una contribución importantísima al considerar al exudado como una fuente de mediadores y por considerar que una sola sustancia podía actuar como mediador durante y en más

de un proceso en la inflamación aguda (Pérez, 1987).

Actualmente, existen muchas sustancias que se reconocen como mediadores químicos, que juegan un papel importante en la inflamación. Por ejemplo, se sabe que el desarrollo del proceso inflamatorio es controlado por las citocinas, los productos de los sistemas enzimáticos del plasma y los mediadores químicos vasoactivos liberados a partir de mastocitos, basófilos y plaquetas, estos últimos directamente asociados con la respuesta inflamatoria y a los cuales se atribuyen los principales signos y síntomas que se producen (Roitt, 1996). Los mediadores que controlan los diferentes tipos de reacción inflamatoria difieren entre sí. Están los llamados de acción rápida como las aminas vasoactivas y los productos del sistema de las cininas que modulan la respuesta inflamatoria inmediata (Roitt, 1996). Posteriormente otro tipo de mediadores recién sintetizados como los leucotrienos intervienen en el proceso de acumulación y activación de otras células. Una vez que los leucocitos arriban al área de inflamación, liberan mediadores que controlan la acumulación y activación de otras células (Roitt, 1996). Sin embargo, en las reacciones inflamatorias iniciadas por el sistema inmunitario el último control lo ejerce el antígeno, de igual modo que éste, es controlado por la misma respuesta inmunitaria. Por esta razón la acumulación celular en los sitios de infección crónica o en las reacciones autoinmunes (aquellas en las que el antígeno no puede finalmente ser erradicado) es diferente de aquella que se observa en los lugares donde el estímulo antigénico es rápidamente eliminado (Roitt, 1996). En el plasma se reconocen cuatro sistemas enzimáticos que juegan un papel determinante en la hemostasis y el control de la inflamación: sistema de coagulación, sistema fibrinolítico (plasmina), el sistemas de cininas y el sistema del complemento (Roitt, 1996). La tabla 4 incluye los mediadores químicos más importantes, su origen y su acción biológica..

**TABLA 4: Principales mediadores químicos de la inflamación que controlan el aporte sanguíneo y la permeabilidad vascular, o que modulan el movimiento de las células (Modificado de Roitt, 1996).**

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

### 1.3. Mediadores químicos de origen celular.

#### 1.3.1. Histamina.

Uno de los primeros mediadores que participa en la etapa temprana del proceso inflamatorio agudo es la histamina, su concentración disminuye en forma rápida en los primeros 60 min (Ward, 1996), su biosíntesis, la cual se explica en la figura 5, se inicia con la descarboxilación del aminoácido histidina. La histamina es una molécula hidrófila compuesta por un anillo imidazol y un grupo amino, enlazados ambos por dos grupos metileno. La forma farmacológicamente activa a nivel de receptores histamínicos es el tautómero monocatiónico  $N\gamma - H_1$ , aunque también pueden intervenir algunas propiedades químicas distintas de este monocatión en interacción con receptores  $H_1$  y  $H_2$  (Ganellin y Parsons, 1982). Las tres clases de receptores principales con los cuales la histamina produce sus efectos son  $H_1$ ,  $H_2$  y  $H_3$  (tabla 5), los cuales pueden ser activados en forma distinta por análogos de la histamina, es por ello que la 2- metilhistamina activa respuestas preferentemente mediadas por receptores  $H_1$ , mientras que la 4 (5)-metilhistamina tiene efectos preferentemente en receptores  $H_2$  (Black y col., 1972). Un análogo quiral de la histamina (R) -  $\alpha$  - metilhistamina es el agonista preferido de los receptores  $H_3$  (Arrang y Col., 1987).

La distribución de la histamina incluye prácticamente todo el reino animal, la mayoría de los tejidos de mamíferos la contienen, el sitio principal de depósito son las células cebadas y basófilos, ambos la sintetizan y depositan en sus gránulos secretores (Goodman y Gilman, 1996), fisiológicamente la histamina juega un papel importante ya que es uno de los mediadores inflamatorios preformados y almacenados. La liberación de histamina obedece al estímulo de una gran diversidad de factores que en forma inespecífica pueden liberarla (venenos de serpiente, bacterias y plantas) y en forma específica por la interacción del antígeno anticuerpo (IgE) en la superficie de células cebadas y basófilos., su liberación influye en forma decisiva en las respuestas de hipersensibilidad alérgica inmediata (Goodman y Gilman, 1996). Una vez liberada la histamina, ejerce efectos de tipo local y general en músculo liso y glándulas generando contracción en bronquios e intestinos y una potente relajación en los vasos sanguíneos de pequeño calibre; estimula la secreción de ácido en el estómago, la formación de

edema y las terminaciones nerviosas del sistema nervioso central. En el desarrollo de la inflamación, la activación de receptores  $H_1$  es la encargada de producir algunos síntomas del proceso inflamatorio como: rubor, hiperemia, hipotensión arterial e incremento de la permeabilidad vascular con la consiguiente formación de edema. La activación de los receptores  $H_2$  genera incremento en la frecuencia cardíaca y estimula la secreción del ácido gástrico (Black y col., 1972). Los receptores  $H_3$ , originalmente descritos como presinápticos y localizables en terminaciones nerviosas con acción reguladora y retroalimentaria de la síntesis y liberación de la histamina (Arrang y col., 1983), ahora se sabe que también actúan en diferentes tejidos acoplados a las proteínas G y estimulando las terminaciones nerviosas, particularmente aquellas que modulan el dolor y el prurito (Ookuma y col., 1993).

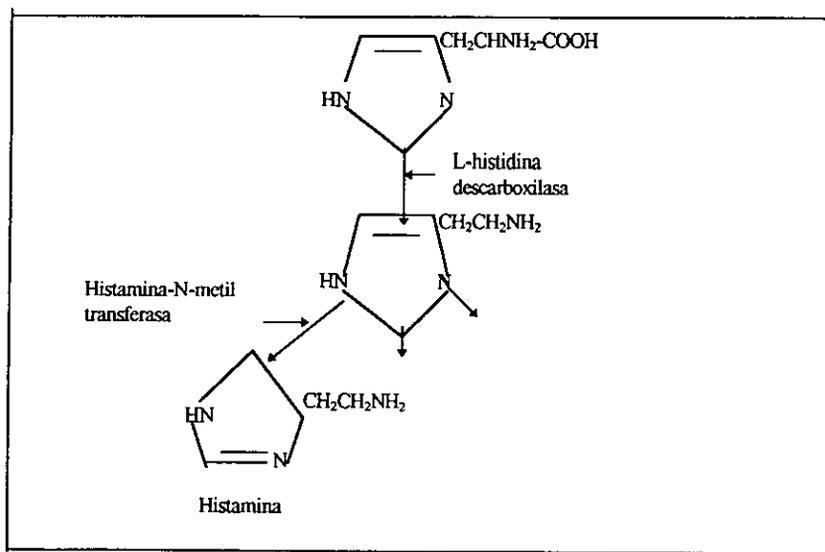


FIGURA 5 : Síntesis de la histamina.

TABLA 5 : Principales receptores de histamina (Goodman y Gilman, 1996).

Receptor :	Distribución :	Acción biológica :
H <sub>1</sub>	Músculo liso, endotelio encéfalo	vasodilatación : rubor, hiperemia, hipotensión arterial e incremento, de la permeabilidad vascular, formación de edema.
H <sub>2</sub>	Mucosa gástrica , músculo cardíaco y células cebadas.	aumento de la frecuencia cardíaca, estimulación de la producción de ácido gástrico.
H <sub>3</sub>	presináptica: encéfalo plexo mientérico , otras neuronas	regulación retroalimentaria de la síntesis y liberación de histamina, estimulación de terminaciones, prurito.

### 1.3.2. Serotonina.

Un segundo mediador químico que interviene en la fase temprana de la inflamación aguda es la serotonina, cuya síntesis se describe en la figura 6. Es conocida también como 5-hidroxitriptamina y se forma enzimáticamente a partir de L-triptófano por hidroxilación del anillo indol seguida por descarboxilación del aminoácido (Katzung, 1996). La serotonina es una amina vasoactiva localizada en los gránulos de mastocitos (en roedores), en plaquetas y en el cerebro. La inyección directa de serotonina en la piel, produce un incremento en la permeabilidad vascular. Es un potente inductor de contracción del músculo liso y de la secreción de células secretoras de moco y sustancias serosas (Pérez, 1987). Los mastocitos liberan serotonina en respuesta a diversos agentes como toxinas bacterianas, veneno de serpiente, proteasas como la tripsina, polímeros como los dextranos y polivinilpirrolidona, anafilotoxinas (C3a y C5a) así como el estímulo antigénico de mastocitos previamente sensibilizados que tienen en la superficie Ig E específica (Pérez , 1987). Por otra parte, los efectos de la serotonina en el desarrollo del proceso inflamatorio, son mediados por diversos receptores de la membrana celular que producen además de vasoconstricción,

agregación plaquetaria y actúan en las terminaciones nerviosensoriales, lo cual se traduce en dolor y prurito (Pérez, 1987; Goodman y Gilman, 1996).

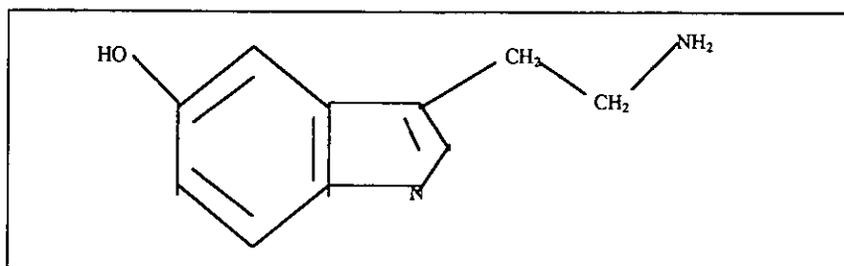


FIGURA 6 : Estructura química de la serotonina. (Katzung, 1996).

### 1.3.3. Prostaglandinas.

Las prostaglandinas (PGs) son ácidos carboxílicos insaturados de 20 carbonos con un anillo de ciclopentano, que derivan del ácido araquidónico y al igual que los leucotrienos y otros compuestos similares, también se les conoce como eicosanoides. Existen diferentes clases de prostaglandinas detectadas en los diversos tejidos y líquidos corporales, razón por la cual se afirma que su distribución es amplia, aún cuando no se acumulen libremente en los tejidos pues como sabemos, su producción se limita a la disponibilidad del ácido araquidónico libre (Pérez, 1987). Las prostaglandinas y otros metabolitos del ácido araquidónico, son los autacoides que producen la mayor cantidad y diversidad de efectos en el organismo, lo que se explica por la existencia de receptores característicos que median sus acciones., un esquema para clasificar dichos receptores en plaquetarios y de músculo liso, se basa fundamentalmente en el patrón de efectos y potencias relativas de los agonistas naturales y sintéticos tabla 6 (Cóleman y col., 1994); considerando este punto, solamente mencionaremos los aspectos más importantes relacionados en forma directa con el desarrollo del proceso inflamatorio. Existen dos familias de autacoides derivadas de los fosfolípidos de la membrana, aquellos formados a partir del ácido araquidónico, cuya biosíntesis se muestra en la figura 7. Entre los

cuales se incluyen: prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos  $A_2$ , leucotrienos y fosfolípidos modificados (Goodman y Gilman, 1996). Los efectos biológicos que producen como ya se mencionó, son heterogéneos y contribuyen a diversos procesos de carácter fisiológico y patológico. Algunos ejemplos del primero ocurren con el tono del músculo liso, hemostasis, trombosis, parto, secreción gastrointestinal., como ejemplo del carácter patológico tenemos el proceso inflamatorio. Algunas categorías de fármacos antiinflamatorios como los de tipo no esteroidal, basan sus efectos terapéuticos en el bloqueo de la formación de prostaglandinas (Goodman y Gilman, 1996). La biosíntesis de prostaglandinas puede llevarse a cabo en respuesta a diversos estímulos entre los cuales están: estímulos de tipo mecánico, químico, térmico o bacteriano, los cuales se relacionan en forma directa con la aparición de los signos y síntomas del proceso inflamatorio. Un ejemplo de ello son las prostaglandinas  $PGE_2$  y  $PGI_2$ , cuya inyección en la piel de seres humanos, aún en dosis muy pequeñas, incrementa la sensibilidad de los receptores al dolor (Ferreira, 1972). En el proceso de biosíntesis de prostaglandinas, sujeto a la disponibilidad del ácido araquidónico este es liberado de los fosfolípidos de la membrana celular por acción de las fosfolipasas, las cuales una vez activadas por diversos estímulos y por la entrada de calcio a la célula hidrolizan los fosfolípidos de la membrana produciendo la liberación del ácido araquidónico, el cual posteriormente es metabolizado en productos oxigenados por acción de las enzimas ciclooxigenasas y lipooxigenasas (Goodman y Gilman, 1996). El resultado es la activación directa de las fosfolipasas (C,  $A_2$  o ambas) o el incremento de las concentraciones citosólicas de calcio que también activan las enzimas mencionadas (Smith, 1992) (figura 7). La biosíntesis de prostaglandinas, por otra parte, se lleva a cabo de manera gradual a través de un complejo de enzimas microsómicas de amplia distribución.

TABLA 6::Diversidad en los receptores de prostaglandina (PG) que modifican la agregación leucocitaria y el tono de músculo liso (Modificado de Goodman y Gilman, 1996).

Súbtipo de receptor PG	Agregación leucocitaria	Tono de músculo liso
DP	-	
EP <sub>1</sub>		+
EP <sub>2</sub>		-
EP <sub>3</sub>	+/-	+
FP		+
IP		+
TP no plaquetario		+
TP plaquetario	+	

#### 1.3.4. Vía Ciclooxygenasa.

En la ruta biosintética de las prostaglandinas, la primera enzima que interviene es la denominada sintetasa del endoperóxido de prostaglandina o también conocida como ciclooxigenasa de ácido graso, de la cual existen dos isoformas (COX-1 y COX-2) (Smith, 1992). La primera se expresa en forma constitutiva en casi todas las células. La segunda generalmente no existe o existe en pequeñas cantidades, pero puede ser inducida por algunos factores séricos como citocinas y factores de crecimiento. Las ciclooxigenasas poseen principalmente dos actividades. Una acción de sintetasa de endoperóxido que oxigena y produce una estructura en anillo en el ácido graso precursor no esterificado para la formación de endoperóxido cíclico de PPG<sub>2</sub> y una segunda actividad de peroxidasa que transforma PGG<sub>2</sub> en PGH<sub>2</sub> (Hamber y col., 1974). Las prostaglandinas G y H son químicamente inestables sin embargo, la acción enzimática permite hacer posible su transformación en diferentes prostaglandinas y tromboxanos entre los cuales se incluyen : PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> y PGD<sub>2</sub> ( Samuelsson y col., 1975; Needleman y col., 1986; Sigal, 1991). También se han identificado algunas isomerasas que intervienen en la biosíntesis de las prostaglandinas

E<sub>2</sub> y D<sub>2</sub> en algunos tejidos. Una 9- ceto reductasa cataliza la interconversión de prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2α</sub>. El endoperóxido PGH<sub>2</sub> también es metabolizado en dos compuestos químicamente inestables pero fuertemente activos. El tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) es formado por la tromboxano sintasa; TXA<sub>2</sub> se degrada por mecanismo no enzimático en tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) el cual es estable pero inactivo (TXB<sub>2</sub>). La PGI<sub>2</sub> es formada a partir de PGH<sub>2</sub> por la prostaciclina sintasa; es hidrolizada por mecanismos no enzimáticos hasta la forma inactiva 6-ceto-PGF<sub>1α</sub>. La mayoría de los tejidos poseen la capacidad para sintetizar los productos intermedios PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> a partir del ácido araquidónico en forma libre, pero su biotransformación, es variable en cada uno de ellos dependiendo de la enzima que exista en él, así como de su abundancia relativa. Un ejemplo de ello ocurre con el pulmón y el bazo, que tienen la capacidad para sintetizar toda la gama de productos, a diferencia de ello, las plaquetas contienen tromboxano sintasa, enzima principal que metaboliza PGH<sub>2</sub>, en tanto que las células del endotelio contiene prostaciclina sintasa (Goodman y Gilman , 1996).

La ciclooxigenasa 1 (COX-1) ejerce su acción enzimática principalmente a nivel del retículo endoplásmico, en tanto que la ciclooxigenasa 2 (COX-2) muestra cierta predominancia alrededor del núcleo, con algunas señales de existencia a nivel de citoplasma. In vivo, se ha demostrado que COX-2 puede ser sintetizada en tanto persista el estímulo inflamatorio, aspecto que se ha corroborado plenamente en diferentes modelos de inflamación llevados a la práctica (Rimarchin y col., 1994; Goodman y Gilman, 1996) .

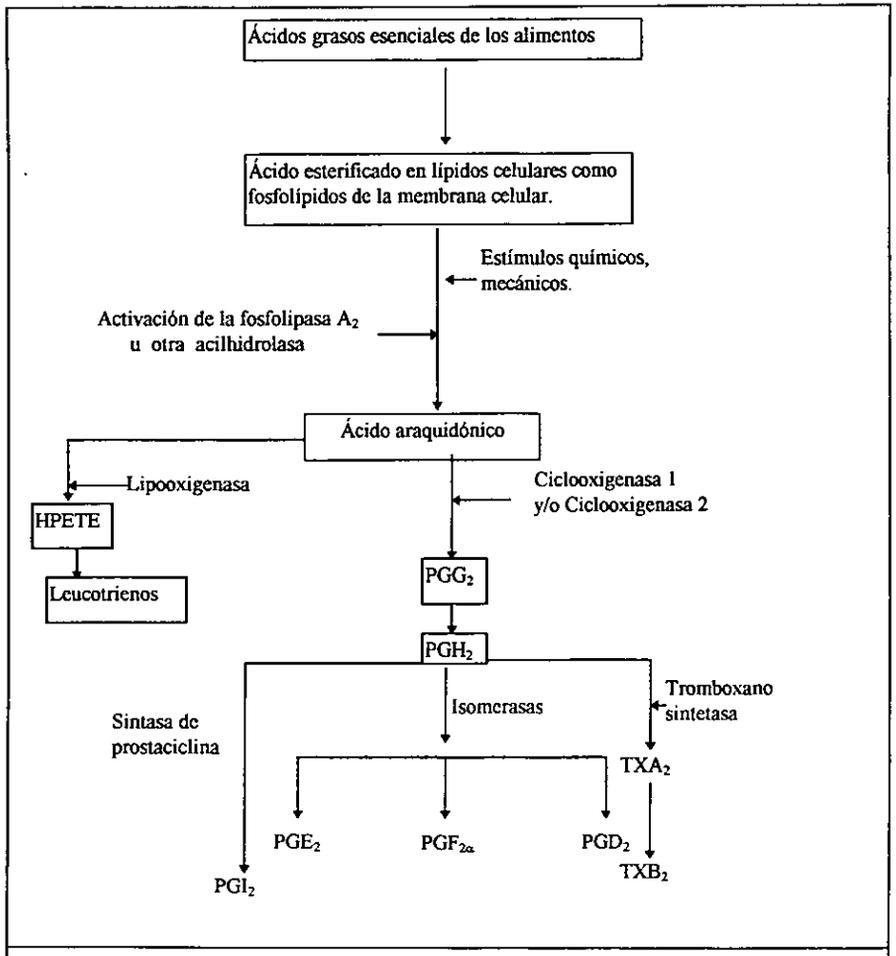


FIGURA 7: Biosíntesis de los productos del ácido áraquidónico vía ciclooxigenasa. y lipooxigenasa (Modificado de Goodman y Gilman, 1996).

### 1.3.5. Vía Lipooxigenasa.

Por otra parte, tenemos a las lipooxigenasas. Familia de enzimas citosólicas que catalizan la oxigenación de ácidos grasos poliénicos para formar los hidroperóxidos lípidos correspondientes (Sigal, 1991 ). La lipooxigenasa requiere de un sustrato con

dos dobles ligaduras (cis), el ácido araquidónico posee varias de estas dobles ligaduras y es metabolizado hasta dar diversos productos con el grupo hidropoxi en diferentes posiciones. En relación a los metabolitos de ácido araquidónico, éstos se denominan ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETE). Las lipooxigenasas muestran una especificidad particular que permite diferenciarlas en relación a la forma de colocación del grupo hidropoxi. Los tejidos se distinguen según el tipo de lipooxigenasas que contienen, un ejemplo de ello son las plaquetas que sólo contienen 12- lipooxigenasa y sintetizan 12-HPETE los cuales por otra parte, son intermediarios inestables análogos a PGG<sub>2</sub> o PGH<sub>2</sub> y son más metabolizados por diversas enzimas (Goodman y Gilman 1996). La 5-lipooxigenasa es quizás la enzima de mayor importancia en el grupo ya que permite la biosíntesis de leucotrienos (LT) (Samuelsson y col., 1987; Sigal, 1991). El ácido araquidónico es el precursor de las cuatro series de leucotrienos y el ácido 5,8,11,14,17- eicosapentanoico de la quinta serie, lo cual se explica en la figura 8. Una vez que las células han sido activadas, aumenta el calcio intracelular, la 5- lipooxigenasa entonces se liga a la proteína activadora (FLAP) (Sigal, 1991 ). Esta unión activa la enzima, permitiendo que se una a la membrana celular e incremente la síntesis de 5-HPETE y de leucotrienos. La leucotrieno sintasa A (LTA ) guarda relación con la 5-lipooxigenasa y estimula la redistribución de 5 - HPETE hasta una forma de 5, 6, - epóxido inestable denominada leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) (Borgeat y Samuelsson, 1979). LTA<sub>4</sub> puede transformarse en leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) mediante LTA-hidrolasa. Otra de las posibilidades es que también puede conjugarse con glutatión a través de la LTC<sub>4</sub>-sintetasa, para formar LTC<sub>4</sub> (Murphy y col., 1979). El LTB<sub>4</sub> es producido por la eliminación de ácido glutámico partiendo de LTC<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>, y surge debido al desdoblamiento y separación de la glicina. La reincorporación del ácido glutámico produce el llamado LTF<sub>4</sub> (Samuelsson y col., 1987). En general, se acepta que una mezcla de LTC<sub>4</sub> y LTD<sub>4</sub> constituyen la denominada sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRS-A).

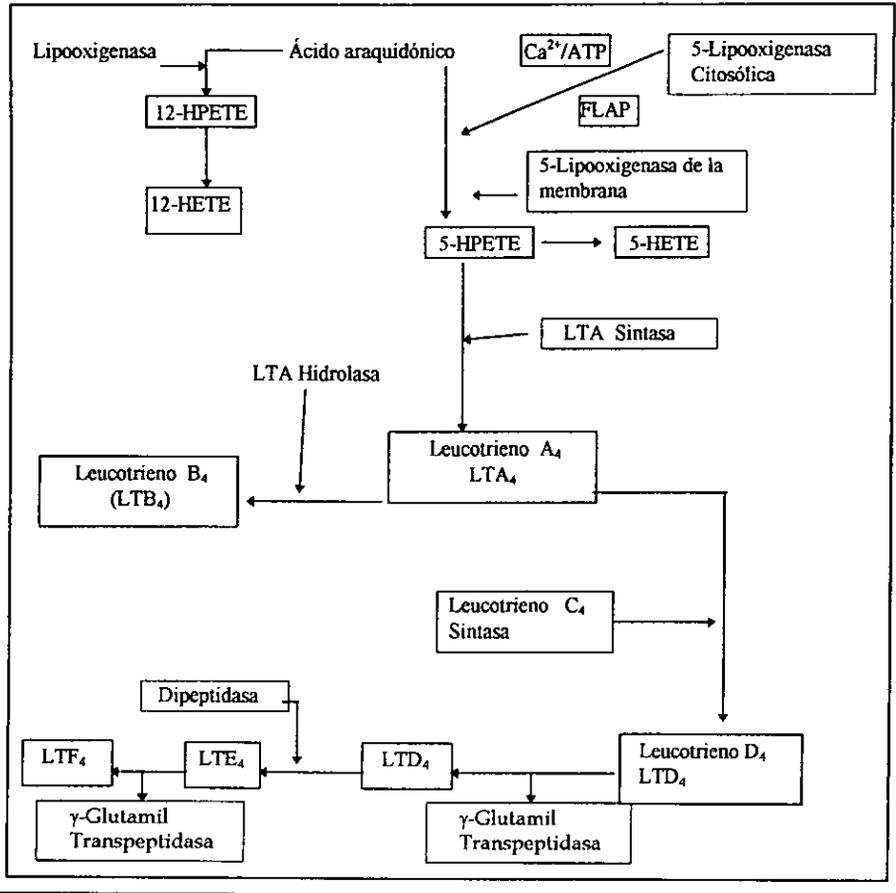


FIGURA 8: Biosíntesis de los principales productos del ácido araquidónico vía lipooxigenasa (Modificado de Goodman y Gilman, 1996).

#### 1.4. Mediadores químicos de origen plasmático.

En el plasma existen tres sistemas proteínicos interrelacionados que producen mediadores químicos, estos son el sistema de las cininas, el sistema del complemento y el sistema de la coagulación de la sangre. La activación de estos autacoides de acción local, se lleva a cabo por diversos factores como lesiones tisulares, reacciones de alergia e infecciones de tipo viral. Los efectos que producen son vasodilatación, incremento de

la permeabilidad vascular, síntesis de prostaglandinas y dolor (Pérez, 1987; Goodman y Gilman, 1996).

#### 1.4.1. El sistema de las cininas.

El sistema de las cininas está integrado por una serie de proteínas (muchas de ellas con actividad enzimática) que a través de una serie de reacciones a manera de cascada, forman un número de pequeños péptidos con actividad vascular, las cininas. Una lesión tisular modifica el endotelio de los vasos dejando expuesta a la colágena, este hecho es suficiente para activar el factor XII conocido como factor Hageman, el cual participa en la activación del factor XI o factor de coagulación, el sistema fibrinolítico (activación del plasminógeno) y la activación de la precalicreína, esta última se transforma en calicreína plasmática y actúa como cininogenasa sobre los cininógenos de alto peso molecular (HMW). La calicreína tisular actúa sobre ambos cininógenos de alto y de bajo peso molecular (HMW y LMW) liberándose de esta forma bradicinina y calidina (Goodman y Gilman, 1996). La vida media de las cininas es muy breve debido a la gran cantidad de cininasas en el plasma y los tejidos que las degradan a péptidos inactivos (Proud y Kaplan, 1988). Los receptores de las cininas conocidos son: B<sub>1</sub> y B<sub>2</sub> (Regoli y Barabé, 1980). Los receptores B<sub>1</sub> regulan las contracciones en el músculo liso (Dray, 1993); efecto que se explica en situaciones como traumatismos, presión tisular, inflamación y estrés. En las células como los macrófagos inducen la producción de mediadores inflamatorios como la interleucina (IL- 1) y el factor de necrosis tumoral (TNF). Los receptores B<sub>2</sub> ligan selectivamente bradicinina y calidina y se encuentra en casi todos los tejidos normales. Los receptores B<sub>2</sub> median la mayor parte de los efectos producidos por la bradicinina y calidina en ausencia de inflamación. Cuantitativamente B<sub>2</sub> es mayor que B<sub>1</sub> en casi todos los tejidos. Los receptores B<sub>2</sub> modulan la contracción del músculo liso, producen vasodilatación, incremento de la permeabilidad capilar, promueven la migración y acumulación leucocitaria, generan dolor y estimulan la síntesis de prostaglandinas (Dray, 1993; Goodman y Gilman, 1996).

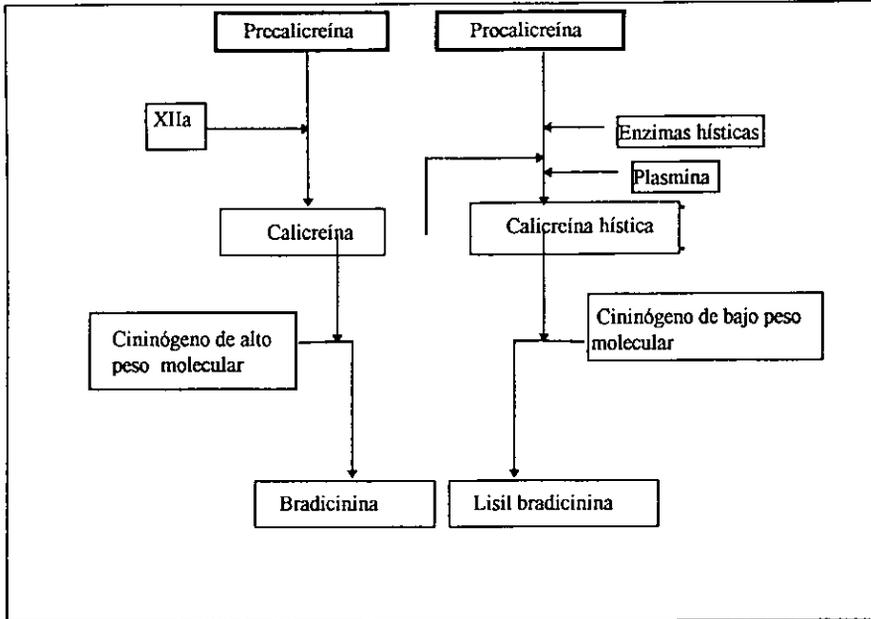


FIGURA 9: Activación del sistema de cininas. El factor de Hageman (XII) actúa sobre la precaliceína para generar caliceína que a su vez, libera bradicinina a partir del cininógeno de alto peso molecular (HMWK). La precaliceína y HMWK circulan en forma de complejo. Diversas enzimas activan la procaliceína a caliceína hística que libera lisil-bradicinina a partir del cininógeno de bajo peso molecular ( Modificado de Roitt, 1996).

#### 1.4.2. El sistema del complemento.

El sistema del complemento también está compuesto por una serie de 20 proteínas de las cuales por lo menos la mitad poseen actividad enzimática y pueden ser activadas por diferentes vías denominadas: vía clásica, vía alternativa y vía plaquetaria. Las cuales a través de una serie de reacciones en cascada generan varios péptidos de gran interés en la inflamación aguda (Pérez, 1987). De este importante grupo de proteínas, 11 se localizan en el plasma (de la proteína C1 a la proteína C9, B y D). En estado inactivo son solubles en agua, pero son moléculas sólidas una vez adheridas a las

membranas de los gérmenes agresores (Pérez, 1987; Guyton, 1997). Los péptidos con actividad vascular son fragmentos de bajo peso molecular o anafilotoxinas derivadas de C3 y C5 durante la activación o desdobladas de sus respectivas fuentes por proteasas de origen bacteriano e hístico. C3 y C5 incrementan la permeabilidad vascular por liberación de histamina de los mastocitos.

#### 1.4.3. Vía clásica.

El desarrollo del proceso inflamatorio es directamente influido por los productos del sistema del complemento, los cuales contribuyen de manera positiva a nivel local incrementando el flujo sanguíneo con la consecuente pérdida y coagulación de proteínas entre los tejidos. Evitando de esta manera un mayor desplazamiento de los agentes agresores por los tejidos (Pérez, 1987). El mecanismo de activación de la vía clásica, el cual se explica en la figura 10, generalmente responde a reacciones del tipo antígeno-anticuerpo generando un conjunto de reacciones en cascada que inician con la activación de la proenzima C1 y produciendo diversos productos al final, muchos de ellos con efectos importantes que permiten combatir a los microorganismos invasores o toxinas y disminuir el daño que éstos generan (Pérez, 1987). Algunos de los efectos más importantes que producen son:

- a) opsonización y fagocitosis por acción de los neutrófilos y macrófagos.
- b) lisis a través del complejo lítico designado como C5b6789, con acción directa sobre las membranas celulares bacterianas.
- c) aglutinación por adhesión de microorganismos entre sí.
- d) neutralización viral por acción de las enzimas del complemento.
- e) quimiotaxis por acción del fragmento C5 que produce migración de neutrófilos y macrófagos.
- e) activación de mastocitos y basófilos que liberan histamina.
- f) efectos inflamatorios locales que incrementan el flujo sanguíneo, pérdida de proteínas por los capilares y coagulación. Evitando de esta forma el desplazamiento de los microorganismos agresores por los tejidos (Pérez, 1987; Rojas, 1996).

#### **1.4.4. Vía alternativa.**

La vía alternativa del sistema del complemento, cuyo mecanismo de activación se muestra en la figura 10, generalmente se lleva a cabo debido a la interacción entre moléculas de polisacáridos de gran tamaño con las membranas celulares de algunos microorganismos invasores de tipo bacteriano, complejos inmunes y algunas toxinas, los cuales son capaces de generar lesión en los tejidos e influir en la permeabilidad vascular del proceso inflamatorio agudo (Pérez, 1987). La interacción de moléculas de gran tamaño como los fosfolípidos de las membranas de microorganismos extraños con los factores B y D del sistema del complemento, genera la activación de C3, produciendo una reacción en cascada y formando productos finales que al igual que en la vía clásica es evidente que contribuyen en la respuesta inflamatoria (Pérez, 1987; Guyton,1997).

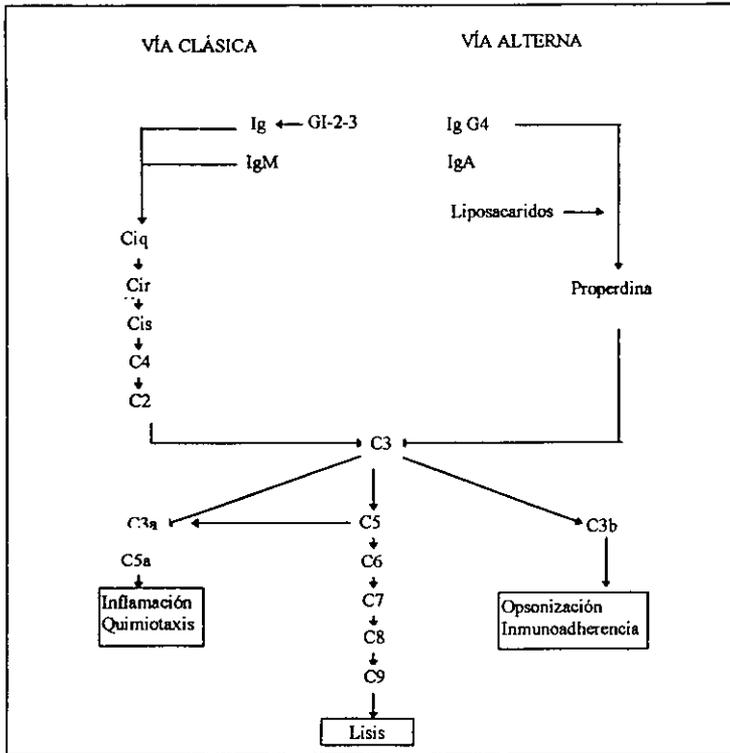


FIGURA 10: El esquema muestra el mecanismo de activación de la vía clásica y vía alternativa del sistema del complemento. El C3 constituye el denominado núcleo de activación. De C5 a C9 son integradas a la unidad de ataque que generan la perforación de la membrana y producen en consecuencia lisis de la célula o del agente agresor (Modificado de Rojas, 1996).

#### 1.4.5. Vía plaquetaria.

Una tercera forma de activar el sistema del complemento es a través de la vía plaquetaria. La vía plaquetaria es la de más reciente descubrimiento y ostenta una gran importancia en función de que actúa como un mecanismo acelerador de la coagulación liberando mediadores químicos contenidos en las plaquetas, que intervienen en el proceso inflamatorio agudo. El sistema de coagulación puede

producir lesiones de dimensiones catastróficas en los tejidos. Un ejemplo típico de ello es la reacción de Arthus, en la cual se produce la ruptura de la pared de arterias y venas, provocando la infiltración de células inflamatorias en una región del organismo particularmente localizada. La lesión se acompaña en forma inmediata de trombosis y oclusión completa de la circulación que traen como consecuencia isquemia y muerte del tejido a nivel local (Pérez, 1987). La activación de la vía plaquetaria genera trombina, la cual se une a las plaquetas formando un complejo trombina-plaqueta con actividad de esterasa. El complejo actúa sobre el factor C3, que a su vez actúa sobre el factor C5, y así en forma sucesiva hasta llegar al factor C9. El proceso genera lesión en las plaquetas, que en respuesta, liberan otros factores de coagulación, contribuyendo de este modo en el proceso inflamatorio.

### **1.5. Fármacos antiinflamatorios.**

Ya hemos señalado la importancia del proceso inflamatorio como un mecanismo de defensa del organismo ante la existencia de alguna lesión o infección. Sin embargo, también es cierto que bajo algunas circunstancias, la misma respuesta inflamatoria puede prolongarse de manera excesiva hasta convertirse en un proceso altamente nocivo y/o permanecer en un estado crónico degenerativo como sucede con algunas enfermedades del tipo de la artritis reumatoide y de la tuberculosis. En estos casos, es necesario recurrir a tratamientos de mayor efectividad, lo cual se logra a través del uso de fármacos antiinflamatorios no esteroideos o esteroideos según los requerimientos del caso. A continuación hemos considerado algunos de estos fármacos tomando como punto de referencia la importancia comercial así como los daños secundarios que producen al ser utilizados en muchos casos en forma indiscriminada.

#### **1.5.1. Fármacos antiinflamatorios no esteroideos.**

Los antiinflamatorios incluidos en esta categoría, generalmente son considerados también como analgésicos y antipiréticos. Este grupo de fármacos antiinflamatorios abarca una gran diversidad de compuestos con escasa relación química entre sí (aunque casi todos son ácidos orgánicos); no obstante lo anterior, comparten algunas de las

actividades terapéuticas y efectos colaterales. El compuesto prototipo de este grupo es el ácido acetilsalicílico (aspirina), y en algunos señalamientos se les menciona también como fármacos similares a aspirina. El término más utilizado, sin embargo, es el de antiinflamatorios no esteroidales (Goodman y Gilman, 1996), y es el que adoptamos en la redacción de este texto. Algunos de los antiinflamatorios más destacados en este grupo de fármacos son: el Ibuprofén, Indometacina, Ácido acetyl salicílico, Naproxén, Diclofenac, Keterolac y Oxicam. Las estructuras químicas de algunos de ellos se muestran en la figura 11 (Goodman y Gilman, 1996).

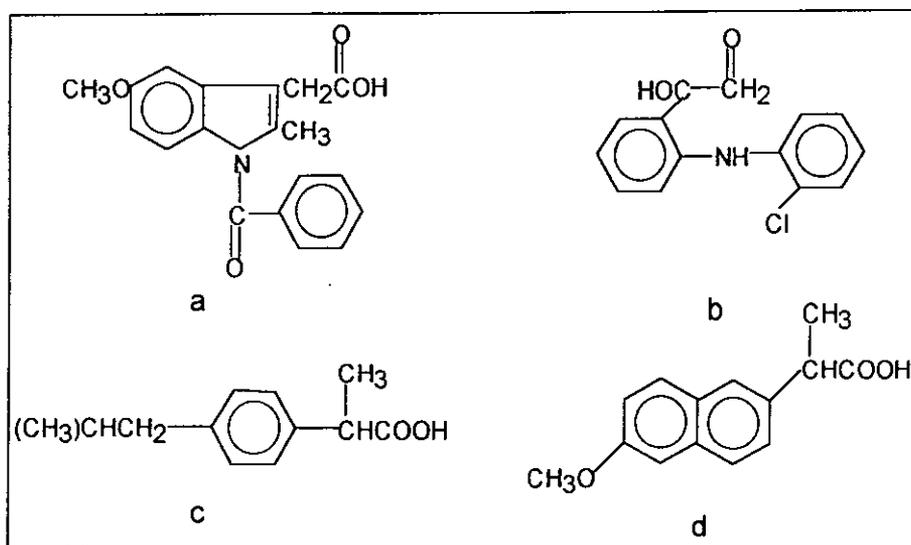


FIGURA 11: Estructura química de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroidales. a) indometacina, b) diclofenac, c) ibuprofeno, d) naproxeno (Goodman y Gilman, 1996).

El mecanismo de acción de este grupo de antiinflamatorios radica, de manera fundamental, en que inhiben en forma no selectiva las actividades de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) y la ciclooxigenasa 2 (COX-2). Las ciclooxigenasas son las enzimas encargadas de convertir el ácido araquidónico en los precursores de las prostaglandinas, por lo

consiguiente, los antiinflamatorios no esteroideos también inhiben la biosíntesis de prostaglandinas ( $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGF}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ), tromboxanos y prostaciclina además de inhibir también la migración de leucocitos y macrófagos al sitio lesionado. Este tipo de antiinflamatorios, sin embargo, no inhiben la formación de leucotrienos, los cuales también juegan un papel importante durante el desarrollo del proceso inflamatorio (Goodman y Gilman, 1996).

Otro de los aspectos que comparten todos los antiinflamatorios no esteroideos son los efectos indeseables. El daño más frecuente que producen es la generación de úlcera gástrica o intestinal, la cual en algunos casos suele acompañarse de anemia secundaria generalmente debido a la pérdida de sangre. Otros de los efectos colaterales que producen, son la generación de disturbios en la función plaquetaria al reducir el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular en pacientes con padecimientos de insuficiencia cardíaca congestiva o cirrosis hepática. También estimulan la retención de sodio y agua, la cual en ocasiones termina en formación de edema (Goodman y Gilman, 1993). Como podemos observar, la importancia de este grupo de fármacos antiinflamatorios está fuera de toda discusión al ofrecer un caudal de beneficios terapéuticos que contrarrestan algunos de los signos y síntomas más importantes del proceso inflamatorio, sin embargo, tampoco se pueden ignorar los numerosos y frecuentes efectos secundarios que producen, los cuales en muchas ocasiones inducen de manera obligada al abandono de los tratamientos o, en otros casos, al planteamiento de modificaciones sobre los mismos de tal modo que permitan la búsqueda de nuevas alternativas para el tratamiento de este tipo de males y, sobre todo, que disminuyan los riesgos de daños secundarios en el tratamiento de los problemas que involucran estados inflamatorios.

#### **1.6. Fármacos antiinflamatorios de tipo esteroideal.**

El grupo de fármacos antiinflamatorios de tipo esteroideal, cuya estructura química de algunos se muestra en la figura 12, incluye una gran diversidad de productos farmacéuticos entre los cuales encontramos que los de uso más frecuente incluyen: dexametasona, cortisona, hidrocortisona, prednisona y prednisolona. El mecanismo de acción de estos fármacos antiinflamatorios radica fundamentalmente en

su gran capacidad para inhibir los fenómenos de tipo vascular como la vasodilatación y el incremento de la permeabilidad vascular, la diapédesis y la quimiotaxis. Otros de los efectos que muestran son la capacidad para disminuir o incrementar el daño tisular dependiendo de la naturaleza del agente causal así como de la intensidad del proceso inflamatorio. También estimulan la síntesis de lipocortina, proteína que inhibe las actividades de la fosfolipasa A<sub>2</sub> disminuyendo en consecuencia la liberación de ácido araquidónico y la síntesis de sus metabolitos: prostaglandinas, leucotrienos, y tromboxanos. Otro de los efectos que muestran es la capacidad para inhibir la transcripción de las citocinas: (IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8) y el factor de necrosis tumoral (TNF), lo cual trae como consecuencia una disminución en la expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales. En forma directa, se ha podido observar que también inhiben la expresión de moléculas como ICAM-1 y E-Selectinas (Barnes, 1993). como podemos observar, la importancia de este grupo de fármacos antiinflamatorios también se encuentra fuera de toda discusión considerando la amplia gama de efectos que producen y que en cierta forma se traducen en una disminución de los síntomas del proceso inflamatorio, lo cual sin embargo, no evita de ninguna manera la gran cantidad de efectos colaterales que se producen ante la supresión de los fármacos y sobre todo ante el uso continuo de elevadas dosis.

En relación a los efectos indeseables que generan este tipo de antiinflamatorios se ha observado que la toxicidad que los caracteriza obedece generalmente a efectos inmediatos de la supresión de los fármacos y/o al uso continuo de grandes dosis. Suele presentarse un síndrome característico debido al retiro de corticoesteroides el cual se manifiesta en la presencia de fiebre, mialgia, artralgia y malestar general con algunos casos raros donde se presenta pseudotumor cerebral con papiledema (Levine y Leopold, 1973). Otros de los daños observados van desde un incremento de la susceptibilidad a infecciones en general hasta la formación de úlcera péptica, miopatía, nerviosismo, insomnio, cambios en el estado de ánimo, formación de cataratas capsulares posteriores en niños, osteoporosis y fracturas vertebrales generalmente producidas por compresión, además de inhibición del crecimiento en niños (Goodman y Gilman, 1996).

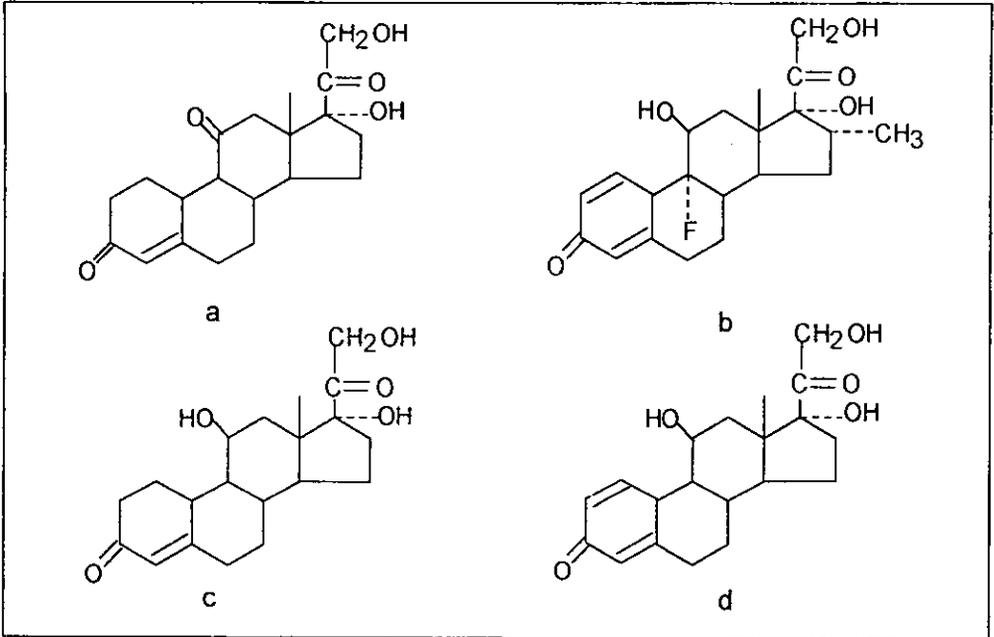


FIGURA 12: Estructura química de algunos fármacos antiinflamatorios esteroidales: a) cortisona, b) dexametasona, c) hidrocortisona, d) prednisona. (Bowman y Rand, 1984).

## 2. Medicina tradicional.

La búsqueda permanente de nuevos fármacos capaces de ofrecer una mejor acción terapéutica y que simultáneamente permitan disminuir los efectos secundarios nocivos, sin duda demanda un esfuerzo de investigación constante, los resultados que se obtienen sin embargo, no siempre son los más alentadores. El caso particular de los fármacos antiinflamatorios no son la excepción de la regla, la mayoría de estos fármacos han sido sintetizados tomando como base la estructura química de algunos preexistentes. Esto ha generado una proliferación de antiinflamatorios con escasas diferencias farmacológicas, que en muchos casos da como resultado que también comparten los mismos efectos secundarios, por lo cual consideramos que las plantas constituyen una fuente de singular importancia y un enorme recurso para la búsqueda de nuevas alternativas de antiinflamatorios. La medicina tradicional popular mexicana es un buen ejemplo de la importancia de las plantas; el valor y aceptación que manifiestan como recurso terapéutico en amplios segmentos de la población, para el tratamiento de un gran número de enfermedades de origen diverso, está demostrado sobremanera en función de la práctica generalizada de los recursos vegetales como una alternativa medicinal.

En relación a las plantas que son utilizadas para el tratamiento de padecimientos inflamatorios en México, podemos decir que existe una gran variedad de plantas que son utilizadas con esta finalidad. A continuación solo por mencionar algunos ejemplos, señalamos algunas de las más destacadas tomando como referencia la recomendación que de ellas hace la medicina tradicional popular: capulín (*Cerasus capuli*), linaza (*Linum usitatissimum*), almendra dulce (*Prunus amigdalus*), llantén (*Plántago major*), malva (*Malva silvestris*), diente de león (*Taraxacum officinale*), y la gran mayoría de las especies de *Aloe* (Martínez, 1961; Díaz, 1976; Argueta y col., 1994).

Para la realización de este trabajo se utilizó como sujeto de estudio al arbusto *Calea zacatechichi* (figura 13), especie conocida comúnmente como "prodigiosa" y recomendada por la medicina tradicional popular, por sus efectos como analgésico, antiinflamatorio y antipirético, en algunos padecimientos que involucran estados inflamatorios de origen diverso, de los cuales hablaremos más adelante.

### 3. Descripción botánica.

*C. zacatechichi*, ejemplar que se muestra en la figura 13, es un arbusto de aspecto muy ramificado que llega a alcanzar hasta tres metros de altura. Presenta hojas opuestas y sencillas de forma oval y puntiaguda con una longitud de 3-4 cm por 2-3 cm de ancho, la textura de sus hojas es arrugada y pubescente con bordes festoneados, sus flores se presentan agrupadas en capítulos cimosos, cada uno de aproximadamente 5 cm de diámetro, sus flores marginales presentan forma lingulada y son de color blanco, las flores centrales presentan forma tubular y son de color amarillo, presentan involucrio de forma acampanada con varias series de brácteas, las exteriores son más cortas, los frutos son aquenios de 4 ó 5 aristas con un vilano con escamas recortadas. Florece en el mes de Septiembre (Martínez, 1961; Díaz, 1976 ; Argueta y col., 1994).



FIGURA 13: *C. zacatechichi*.

### 3.1. Sinonimia popular.

En algunos Estados de la República Mexicana, *C. zacatechichi* es conocida popularmente con diferentes nombres según la región o el Estado. A continuación señalamos algunos de los nombres comunes más utilizados por la población en general: en Morelos se le conoce como "ahuapatli" y "prodigiosa", en Chiapas se le conoce como "chalhamal", "tzeital" y "hierba amarga", en Michoacán se conoce como "prodigiosa", en Jalisco se le nombra "simonillo", en Yucatán se le llama "tzikin" y en Oaxaca se le conoce con el nombre de "zacate de perro" (Argueta y col., 1994).

TABLA 7: Taxonomía de *C. zacatechichi*.

Familia	Compositae/ Asteraceae
Género	<i>Calea</i>
Especie	<i>zacatechichi</i>
Nombre Científico	<i>Calea zacatechichi</i> (Schlecht.)

### 3.2. Distribución geográfica.

*C. zacatechichi* es una planta originaria de México. Su distribución geográfica incluye diversos Estados de la República que abarcan desde la Península de Yucatán, hasta los Estados de Morelos, Puebla, Veracruz, Oaxaca y San Luis Potosí. Su hábitat incluye principalmente aquellas regiones del país que presentan climas cálidos y se encuentra generalmente asociada con la selva baja caducifolia, bosques de encinos, pastizales y vegetación secundaria y matorrales (Argueta y col., 1994).

### 3.3. Usos medicinales.

En la medicina tradicional popular, *C. zacatechichi* se utiliza para el tratamiento de una gran diversidad de malestares y/o enfermedades, entre las cuales encontramos algunos padecimientos que involucran estados inflamatorios cuyo origen es diverso, algunos de los cuales señalamos a continuación en la tabla 8 (Martínez, 1961; Díaz,

1976; Argueta y col., 1994).

TABLA 8: Usos principales de *Calea zacatechichi* en la medicina tradicional popular. (Martínez, 1961; Díaz, 1976; Argueta y col., 1994).

Para el tratamiento de.	Forma de administración.	Parte utilizada de la planta
Inflamación de vesícula	infusión	hojas, flores
Inflamación de apéndice	Cocimiento	hojas, ramas
Reducción de fiebre	Infusión	Hojas c/sin flor
Astringente	Infusión	Hojas
Mejorar apetito	Infusión	Hojas- flor
Expulsión de bilis derramada	Cocimiento	Hojas
Ictericia	Cocimiento	Hojas y ramas
Problemas de estómago	Infusión	Hojas
Cólicos abdominales	Infusión	Hojas
Diarreas	Infusión	Hojas c/sin flores

Además de los usos señalados, existe el reporte que los indios chontales utilizan a *C. zacatechichi* para obtener mensajes divinos durante el sueño (Mayagoitia y col., 1986), es decir dentro de las enfermedades consideradas en los síndromes de filiación cultural. En algunas regiones, se utiliza la planta como antidiabético (Román, 1992).

### 3.5. Composición química.

Estudios realizados en el Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN y el Instituto de Química de la UNAM, señalan que las partes aéreas de *C. zacatechichi* contienen una gran diversidad de compuestos, algunos de los

más destacados son mencionados a continuación: sesquiterpenos, caleínas A, B, C, D, E y FR, los sesquiterpenos 1-B, 2-C, 2-D, 3-A, y 3-B, dos derivados de la atripleciolida, el acetil de erioflorina, dihidro-germacreno D, los acetoxi y oxozacatechinólida, la sexbrevina, los flavonoides acacetina y sus derivados metilados, la hidroxidimetoxi-flavona dimetil-eter-apigenina, algunos esteroides como mastenol y estigmastadienol además de los triterpenos escualeno y el acetato de taraxerol (Martínez, 1961; Díaz, 1976; Argueta y col., 1994).

Otros informes establecen que en la raíz de *C. zacatechichi*, se encuentran compuestos como: los monoterpenos cimenol, timol e isobutiratos correspondientes, además de un aceite esencial, un principio amargo de función glucosídica, tanino y ácido succínico, entre otros. También se han aislado los sesquiterpenos calaxina, ciliarina, acetil o metil-acacetina, sexbrevina y varios análogos de budleina A, neurolenina B y caleína calecromenus A y B. Las caleínas I y II y I-betaacetoxizacatechinólido (Martínez, 1961; Díaz, 1976; Argueta y col., 1994).

Por otra parte, encontramos que estudios más recientes de la planta reportan la existencia de diversos compuestos en el extracto etanólico de las hojas de *C. zacatechichi*. Entre los compuestos químicos de mayor interés para este trabajo, encontramos algunas sesquiterpenlactonas de los grupos: eudesmanólidos, germacranólidos, isoheleninas y partenólidos. Grupos de sesquiterpenlactonas cuyas estructuras se presentan en la figura 14, todos ellos componentes de gran interés, debido a que son compuestos relacionados con actividad antiinflamatoria, algunos de ellos ya probados en algunos modelos experimentales (Bork y col., 1997).

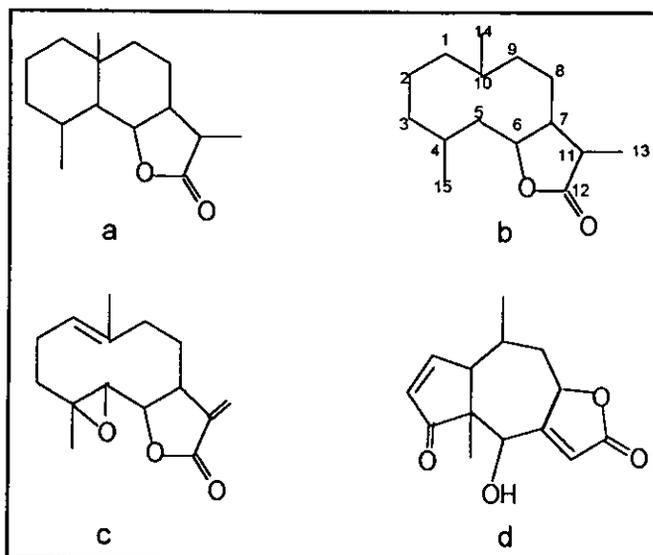


FIGURA 14: Estructura química de algunas sesquiterpenlactonas de los grupos: a) eudesmanólidos, b) germacranólidos, c) partenólidos, d) isoheleninas (Modificado de Domínguez, 1979).

## II. ANTECEDENTES.

### *Calea zacatechichi.*

En el contexto de la medicina tradicional popular, algunos de los primeros antecedentes que encontramos de *C. zacatechichi* datan del siglo XVI. Martín de la Cruz es una de las primeras personas en mencionar las bondades de este arbusto utilizándolo en forma de aperitivo. Francisco Hernández relata que el uso del jugo de *C. zacatechichi* — mezclado con otra planta y espesado con miel, utilizándolo en forma de emplasto sobre el bazo obstruido, provoca que la obstrucción se abra y se arrojen los humores negros y atrabiliosos. En el siglo XIX, se mencionó que la planta fue utilizada como tónico amargo ofreciendo buenos resultados; y a finales del mismo siglo, *C. zacatechichi* gozó de cierta fama para contrarrestar las calenturas palustres y se recomendaba además por sus efectos astringentes. Ya en pleno siglo XX, Alfonso Herrera señaló algunas características de la planta estableciendo que no presentaba toxicidad pero sí producía efectos purgantes, reducía las calenturas pero no curaba el paludismo. Más adelante, Maximino Martínez consigna la planta con efectos de aperitivo, antipirético y astringente. Luis Cabrera cita a *C. zacatechichi* con efectos antidiarreicos. La Sociedad Farmacéutica de México la menciona como aperitivo. Shultes y Hoffman reportan que *C. zacatechichi* presenta efectos como alucinógeno, antidiarreico, antipalúdico, aperitivo e insecticida (Martínez, 1961; Díaz, 1976; Argueta y col., 1994). Finalmente, en la medicina tradicional actual se reporta a *C. zacatechichi* como útil para el tratamiento de diversas enfermedades que involucran padecimientos de tipo inflamatorio particularmente de la vesícula biliar, hígado y apéndice.

### III. OBJETIVO.

#### 1.1. Objetivo General.

Estudiar si el extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi* tiene efecto antiinflamatorio en modelos experimentales de inflamación en animales

## IV. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 1.1. Materiales.

En el desarrollo de este trabajo se utilizó: carragenina (Sigma Chemical Co.), dexametasona (Merck-Sharp), indometacina (Sigma Chemical Co.), heparina (Sigma St Louis, M O), albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Co.); el resto de los reactivos en general fueron de calidad reactivo analítico (Merck).

#### 1.1.1. Material biológico.

Se utilizaron ratas Wistar machos de 250-300 g de peso corporal, los cuales se mantuvieron en cautiverio bajo un régimen de dieta estándar con toma libre de agua. También se utilizaron ratones machos de la cepa CDI de 20-25 g de peso corporal, los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones señaladas anteriormente.

### 2. Adquisición de la planta .

La muestra de *C. zacatechichi* para el desarrollo del trabajo experimental así como los ejemplares que se depositaron en el Herbario de la E.N.E.P. Iztacala de la U.N.A.M. con el número de registro 26901, se adquirieron en el mes de marzo de 1998 en el "Mercado Sonora", establecimiento especializado en plantas medicinales y principal abastecedor de las mismas en la Ciudad de México, Distrito Federal. La identificación de la planta se llevó a cabo en el Herbario de la E.N.E.P. Iztacala de la U.N.A.M. Las condiciones de las plantas con las cuales se realizó el trabajo, fueron en estado seco, con presencia de flores y semillas.

### 3. Preparación del extracto acuoso.

- 1) Se separaron las hojas secas de *C. zacatechichi*, se pesaron y se pusieron en agua destilada a ebullición, se mantuvieron hirviendo durante 10 minutos. La proporción fue de 1 g de hojas por 20 mL de agua.
- 2) Para eliminar los restos de material vegetal el extracto se filtró y después se colocó en un vaso de precipitado previamente pesado, posteriormente se sometió a un proceso de secado en horno a una temperatura de 60°C durante 24 horas, aproximadamente.

3) Luego se determinó el peso del extracto seco (3000 mg), y se resuspendió en 50 mL de solución salina estéril (Abbot) (concentración final 60 mg/ml).

4) El pH se ajustó a 7.4 con gotas de solución de NaOH 1 N, y se guardó en viales manteniéndose a temperatura de congelación hasta el momento de utilizarse.

#### 4. Reacciones de identificación fitoquímica.

Una vez que se obtuvo el extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi*, se realizaron pruebas preliminares de identificación fitoquímica (Domínguez, 1979), para detectar la presencia de compuestos con posible actividad antiinflamatoria. Las pruebas que se llevaron a cabo fueron (ver anexo):

1) Alcaloides: Reacción de Mayer.

2) Coumarinas: tratamiento con  $H_2SO_4$  y luz ultravioleta.

3) Esteroles: Reacción de Salkowsky.

4) Flavonoides: Reacción de Shinoda.

5) Sesquiterpenlactonas: con el reactivo de Baljet (Revisar anexo).

#### 5. Investigación de la actividad antiinflamatoria.

5.1. Formación de edema en las extremidades posteriores de la rata, por administración de carragenina (Tratamientos por vía intraperitoneal).

1)- Se formaron al azar 4 grupos de ratas Wistar machos de 250-300 g de peso, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía intraperitoneal.

Grupo 1) Solución salina al 0.9 %.

Grupo 2) Indometacina (Merck-Sharp & Dohme) 10 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg de peso.

Grupo 4) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 100 mg/kg de peso.

Una hora después de administrados los diferentes tratamientos, se aplicó 0.1 mL de carragenina al 1%, preparada con solución salina estéril al 0.9 %, en una de las extremidades posteriores de los animales en la región de la aponeurosis plantar. En la otra extremidad se aplicó un volumen igual de solución salina estéril al 0.9 %. Posteriormente, se procedió a obtener un registro durante el curso temporal de la

formación de edema a través del incremento del volumen en las extremidades tratadas durante cuatro horas. Las mediciones se hicieron a intervalos de una hora, siguiendo el método de desplazamiento del mercurio propuesto por Van Arman y col. el cual consiste en medir la presión que ejerce el desplazamiento del mercurio en una columna, al ser introducidas las extremidades tratadas con carragenina (inflamación) y solución salina (control). La columna de mercurio se encuentra conectada a un transductor de presión P-1000 A, a su vez interconectado a un amplificador y un sistema de registro, en este caso un fisiógrafo de mesa Mod. DMP-4B (Narco Bio Systems). La diferencia de volumen registrada entre las dos extremidades posteriores a las cuales se administró carragenina y solución salina, respectivamente, se consideró como el edema producido por la carragenina y se expresó en  $\mu\text{L}$  (Van Arman y col., 1965).

#### **5. 2. Formación de edema en las extremidades posteriores de la rata, por administración de carragenina (Tratamientos por vía oral).**

1)- Se formaron al azar 4 grupos de ratas Wistar machos de 250-300 g de peso, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía oral.

Grupo 1) Solución salina al 0.9 %.

Grupo 2) Indometacina (Merck-Sharp & Dohme) 10 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg de peso.

Grupo 4) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 100 mg/kg de peso.

Una hora después de administrados los diferentes tratamientos, se aplicó 0.1 mL de carragenina al 1%, preparada con solución salina estéril al 0.9 %, en una de las extremidades posteriores de los animales en la región de la aponeurosis plantar. En la otra extremidad se aplicó un volumen igual de solución salina estéril al 0.9 %. Posteriormente, se procedió a obtener un registro durante el curso temporal de la formación de edema a través del incremento del volumen en las extremidades tratadas durante cuatro horas. Las mediciones se hicieron a intervalos de una hora, siguiendo el método de desplazamiento del mercurio propuesto por Van Arman y col. el cual consiste en medir la presión que ejerce el desplazamiento del mercurio en una

columna, al ser introducidas las extremidades tratadas con carragenina (inflamación) y solución salina (control). La columna de mercurio se encuentra conectada a un transductor de presión P-1000 A, a su vez interconectado a un amplificador y un sistema de registro, en este caso un fisiógrafo Mod. DMP-4B (Narco Bio Systems). La diferencia de volumen registrada entre las dos extremidades posteriores a las cuales se administró carragenina y solución salina respectivamente, se consideró como el edema producido por la carragenina y se expresó  $\mu\text{L}$  (Van Arman y col., 1965).

### 5. 3. Migración celular a la cavidad peritoneal, por administración de carragenina (Tratamientos por vía intraperitoneal).

1) Se formaron al azar 4 grupos de ratas Wistar machos de 250-300 g de peso corporal, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía i.p.

Grupo 1) 1 mL de solución salina estéril al 0.9%.

Grupo 2) indometacina 10 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg de peso.

Grupo 4) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 100 mg/kg de peso.

2) Una hora después de aplicados los tratamientos, se aplicaron 3 mL de carragenina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , preparada en solución salina estéril al 0.9 %) por vía i.p.

3) Después de 4 horas las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, se les lavó la cavidad peritoneal con 10 mL de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH 7.4, conteniendo 5 U/mL de heparina y 5% de albúmina sérica bovina, y se aplicó masaje en la región abdominal por espacio de dos minutos, aproximadamente.

4) Del líquido peritoneal de c/u de los animales, se recuperaron 5 mL de líquido, se tomaron muestras de 20  $\mu\text{L}$  que fueron diluidos en 400  $\mu\text{L}$  de violeta de genciana en ácido acético, para la cuenta total de leucocitos en la cámara de Neubauer .

5) El volumen restante del lavado peritoneal se centrifugó por 3 minutos a 1500 rpm; se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 0.4 ml de la solución de seroalbúmina al 3 % .

6) De esta suspensión se aplicaron 1 y 2 gotas, respectivamente, sobre portaobjetos cubiertos con papel filtro que fueron dejados secar a temperatura ambiente durante

aproximadamente 30 horas.

7) Una vez que los portaobjetos estuvieron secos se tiñeron sumergiéndolos por 5 minutos en colorante de Wright y lavándolos por 3 minutos en agua corriente.

8) En los portaobjetos así preparados, se hizo la cuenta diferencial de células blancas de acuerdo con el método propuesto por Souza y Ferreira, 1985, que consiste en registrar el número de neutrófilos entre los diferentes grupos de leucocitos para obtener la migración celular hacia la cavidad peritoneal.

#### **5. 4. Migración celular a la cavidad peritoneal, por administración de carragenina (Tratamientos Por vía oral).**

1) Se formaron al azar 4 grupos de ratas Wistar machos de 250-300 g de peso corporal, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía oral.

Grupo 1) 1 mL de solución salina estéril al 0.9%.

Grupo 2) Dexametasona 1 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg de peso.

Grupo 4) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 100 mg/kg de peso.

2) Una hora después de aplicados los tratamientos, se aplicaron 3 mL de carragenina (100 µg/mL, preparada en solución salina estéril al 0.9 %), por vía i.p.

3) Después de 4 horas las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, se les lavó la cavidad peritoneal con 10 mL de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS), pH 7.4, conteniendo 5 U/mL de heparina y 5% de albúmina sérica bovina, y se aplicó masaje en la región abdominal por espacio de dos minutos, aproximadamente.

4) De la cavidad peritoneal de c/u de los animales se recuperaron 5 mL de líquido, se tomaron muestras de 20 µL que se diluyeron en 400 µL de violeta de genciana en ácido acético, para la cuenta total de leucocitos en la cámara de Neubauer .

5) El volumen restante del lavado peritoneal se centrifugó por 3 minutos a 1500 rpm; se decantó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 0.4 ml de la solución de seroalbúmina al 3 % .

6) De esta suspensión se aplicaron 1y 2 gotas respectivamente sobre portaobjetos cubiertos con papel filtro que se dejaron secar a temperatura ambiente durante

aproximadamente 30 horas.

7) Una vez que los portaobjetos estuvieron secos se tiñeron sumergiéndolos por 5 minutos en colorante de Wright y lavándolos por 3 minutos en agua corriente.

8) En los portaobjetos así preparados, se hizo la cuenta diferencial de células blancas de acuerdo con el método propuesto por Souza y Ferreira, 1985, que consiste en registrar el número de neutrófilos entre los diferentes grupos de leucocitos para obtener la migración celular hacia la cavidad peritoneal.

#### **5. 5. Prueba de contorsión en ratones (Tratamientos por vía intraperitoneal).**

1)- Se formaron al azar 5 grupos de ratones machos de la cepa CD1, de 20-25 g de peso corporal, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía i.p.

Grupo 1) Solución salina estéril.

Grupo 2) Indometacina 10 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 1 mg/kg de peso.

Grupo 4) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg de peso.

Grupo 5) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 100 mg/kg de peso

2) Después de transcurridos 30 minutos, se administraron a cada animal por vía i.p. 60 mg de ácido acético/kg de peso corporal de una solución al 0.6%. Por ser el ácido acético un compuesto irritante, el propósito de esta operación fue inducir dolor, uno de los síntomas que acompañan al proceso inflamatorio. Como muestra evidente de dolor el animal exhibe "contorsiones" (Bowman y Rand, 1984), las cuales consisten en comprimir la zona del abdomen contra la superficie de la mesa proyectando al mismo tiempo las patas traseras hacia atrás.

3) Una vez administrado el ácido acético, se procedió a contar el número de contorsiones, a intervalos de 2 minutos durante un período de 20 minutos.

#### **5. 6. Prueba de contorsión en ratones (Tratamientos por vía oral).**

1)- Se formaron al azar 5 grupos de ratones machos de la cepa CD1, de 20-25 g de peso corporal, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía oral.

Grupo 1) Solución salina estéril.

Grupo 2) Indometacina 10 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 1 mg/kg de peso.

Grupo 4) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg de peso.

Grupo 5) Extracto acuoso de *C. zacatechichi* 100 mg/kg de peso

2) Después de transcurridos 30 minutos, se administraron a cada animal por vía i.p. 60 mg de ácido acético/kg de peso corporal de una solución al 0.6 %. Por ser el ácido acético un compuesto irritante, el propósito de esta operación fue inducir dolor, uno de los síntomas que acompañan al proceso inflamatorio. Como muestra evidente de dolor el animal exhibe "contorsiones" (Bowman y Rand, 1984), las cuales consisten en comprimir la zona del abdomen contra la superficie de la mesa proyectando al mismo tiempo las patas traseras hacia atrás.

3) Una vez administrado el ácido acético, se procedió a contar el número de contorsiones, a intervalos de 2 minutos durante un período de 20 minutos.

#### V. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos de todos los experimentos se sometieron a un tratamiento estadístico en el cual se obtuvo la media de cada uno de los grupos y el error estándar de la media. Para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados se utilizó la prueba de "t de Student" para una \*  $P < 0.05$ .

## VI. RESULTADOS.

### 1. Reacciones de identificación fitoquímica.

En relación a las pruebas de reconocimiento de metabolitos secundarios que se llevaron a cabo sobre el extracto acuoso de *C. zacatechichi*, para detectar algunos de los componentes químicos de interés para el desarrollo de este trabajo, se encontraron diversas clases de compuestos que son señalados en la tabla 9, algunos de los cuales han sido reconocidos y se insertan en la categoría de compuestos relacionados con actividad antiinflamatoria.

TABLA 9: Compuestos químicos detectados en el extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi*.

compuestos.	Reacción
Alcaloides	+
Coumarinas	+
Esteroles	+
Flavonoides	+
Sesquiterpenlactonas	+

## 2. Formación de edema en las extremidades posteriores de la rata, por administración de carragenina (por vía intraperitoneal).

Al graficar el efecto producido por el extracto acuoso de *C. zacatechichi*, sobre la formación de edema inducido por la carragenina, se observó que la extremidad posterior del grupo control (sin tratamiento), mostró un incremento de volumen dependiente del tiempo que llegó al máximo en cuatro horas; el incremento de volumen fue de 263.74  $\mu\text{L}$ .

El grupo tratado con indometacina en el mismo lapso de tiempo mostró un incremento de 62.88  $\mu\text{L}$ , por lo que se consideró que hubo una inhibición de la formación de edema de 76.16%.

Los grupos tratados con extracto de *C. zacatechichi*, mostraron en el mismo lapso de tiempo un incremento de volumen menor que el control: 116.05  $\mu\text{L}$  y 118.68  $\mu\text{L}$ , a las dosis de 10 y 100 mg/kg de peso respectivamente, por lo que se consideró que el extracto inhibió la formación de edema en 56% y 55% respectivamente en relación al grupo control. Pese a que las dosis responden a una progresión geométrica, no se observaron diferencias importantes entre ellas como puede corroborarse en la figura 15.

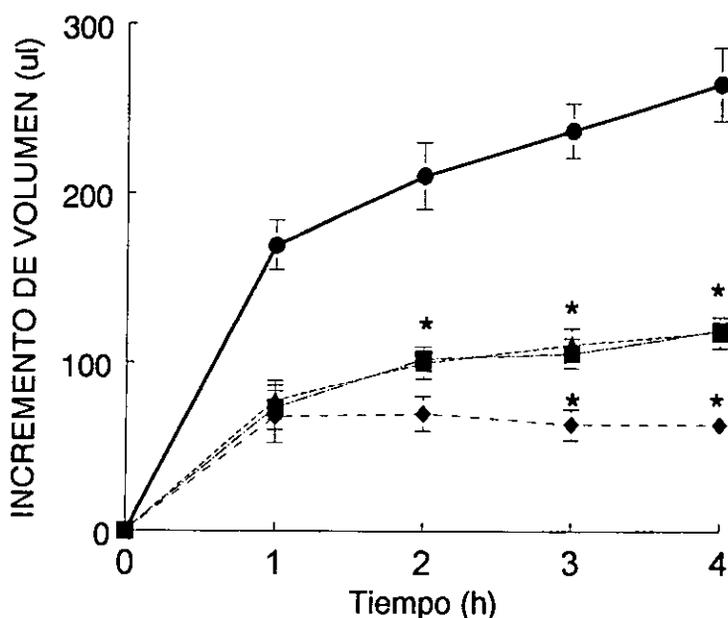


FIGURA 15: Efecto del extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg (▲ ) y 100 mg/kg (■ ), indometacina 10 mg/kg (♦ ) y solución salina (● ), administrados por vía intraperitoneal, sobre el edema inducido por 0.1 mL de carragenina al 1 % en la extremidad posterior de la rata (n=10, \* p<0.05).

## 2.1. Formación de edema en las extremidades posteriores de la rata, por administración de carragenina (por vía oral).

Cuando se utilizó la vía oral para la administración del extracto observamos que el grupo control (sin tratamiento), mostró también un incremento de volumen dependiente del tiempo, llegando al punto máximo igualmente en cuatro horas. El incremento de volumen fue de  $257.08 \mu\text{L}$ .

El grupo tratado con indometacina en el mismo lapso de tiempo, mostró un incremento de volumen de  $65.92 \mu\text{L}$  por lo que se consideró que hubo una inhibición de la formación de edema de 74.36 %.

Los grupos tratados con extracto acuoso de *C. zacatechichi*, mostraron un menor incremento de volumen que el control:  $133.68 \mu\text{L}$  y  $128.54 \mu\text{L}$  a las dosis de 10 y 100 mg/kg de peso respectivamente, por lo que se consideró que el extracto inhibió la formación de edema en 52 % y 50 % en relación al grupo control. Pese a que las dosis responden a una progresión geométrica, tampoco se observaron diferencias notables entre ellas como puede constatarse en la figura 16.

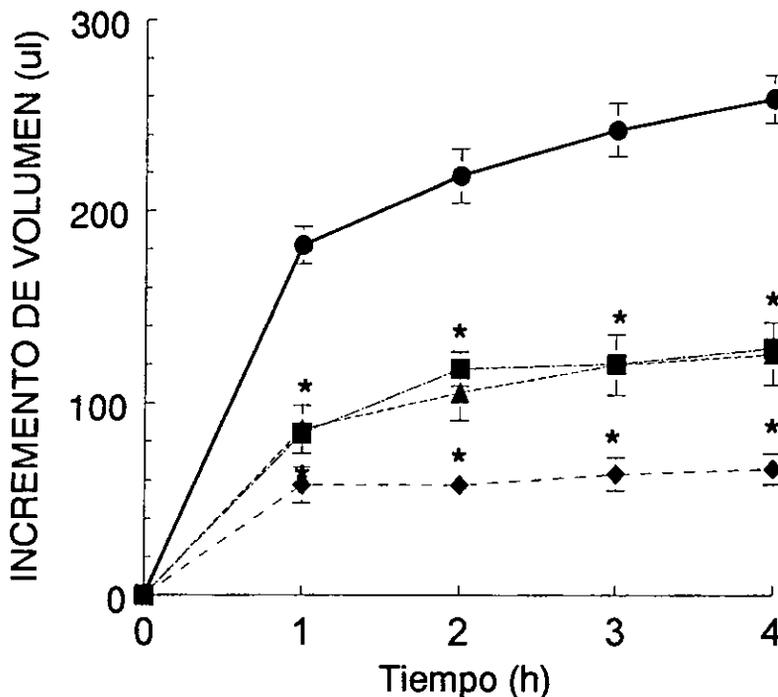


FIGURA 16: Efecto del extracto acuoso de *C. zacatechichi* 10 mg/kg (▲) y 100 mg/kg (■), indometacina 10 mg/kg (◆) y solución salina (●), administrados por vía oral, sobre el edema inducido por 0.1 mL de carragenina al 1 % en la extremidad posterior de la rata (n=10, \* p<0.05).

## 2.2. Migración celular a la cavidad peritoneal (vía intraperitoneal).

En relación a la migración celular, observamos que el grupo control mostró una elevada migración celular a la cavidad peritoneal, correspondiendo al número más alto de los diferentes tratamientos, 13 373 neutrófilos. El grupo tratado con indometacina mostró una inhibición de la migración celular de 65.08%.

Los grupos tratados con el extracto acuoso de *C. zacatechichi*, administrado por vía i.p., mostraron una reducción de la migración celular de 29.79% y 52.08% en relación al grupo control, a las dosis de 10 y 100 mg/kg de peso, respectivamente. A diferencia de los experimentos anteriores en que las dosis no influyeron en la intensidad de la respuesta, en éste si hubo diferencia entre las dosis de extracto como puede observarse en la figura 17.

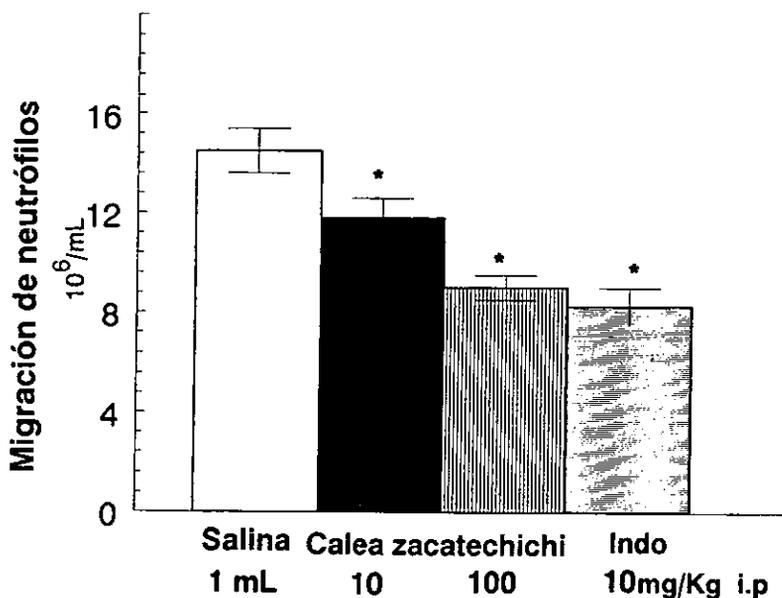


FIGURA 17: Efecto del extracto acuoso de *C. zacatechichi* (10 y 100 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg), administrados por vía intraperitoneal, sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal irritada previamente con carragenina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), \*  $p < 0.05$ ).

### 2.3. Migración celular a la cavidad peritoneal (vía oral).

Por vía oral observamos que el grupo control de ratones también mostró una elevada migración celular, correspondiendo al número más alto de los diferentes tratamientos, 13 493 neutrófilos. El grupo tratado con dexametasona (debido a que la indometacina daba resultados irregulares), mostró una inhibición de la migración celular de 46.97% a la dosis de 1 mg/kg de peso.

Los grupos tratados con el extracto acuoso de *C. zacatechichi*, administrado por vía oral, mostraron una reducción de la migración celular de 44.4% y 60% en relación al control a las dosis de 10 y 100 mg/kg de peso, respectivamente. En este experimento también se observaron diferencias entre las dosis de extracto utilizadas como puede observarse en la figura 18.

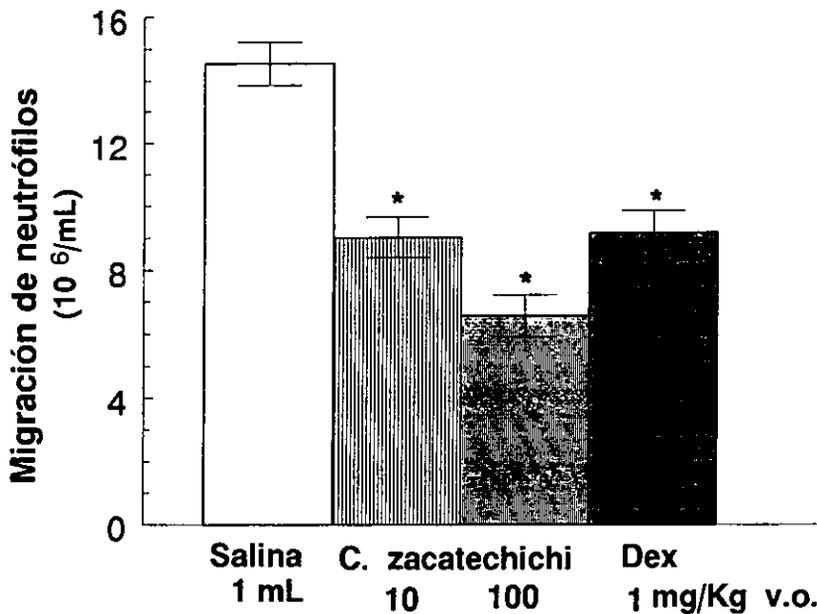


FIGURA 18: Efecto del extracto acuoso de *C. zacatechichi* (10 y 100 mg/kg ) y dexametasona (1 mg/kg), administradas por vía oral, sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal irritada previamente con carragenina (100µg/mL), \* p < 0.05).

#### 2.4. Prueba de contorsión en ratones (vía intraperitoneal)

En este ensayo podemos observar que el grupo control (sin tratamiento) fue el que mostró más dolor, considerando que obtuvo el mayor promedio de contorsiones, 36 en un lapso de 20 minutos a partir de la aplicación del ácido acético.

El grupo tratado con indometacina en el mismo lapso de tiempo, tuvo una disminución de 93.7% en el número de contorsiones en relación al control.

Los grupos tratados con extracto acuoso de *C. zacatechichi*, administrado por vía i.p., mostraron una reducción en el número de contorsiones de 28.5%, 47.58% y 50.14% en relación al grupo control a las dosis de 1, 10, y 100 mg/kg de peso, respectivamente. Las diferencias observadas entre las dosis administradas, dejan ver un menor efecto a la dosis de 1 mg/kg de peso. Las dosis de 10 y 100 mg/kg, mostraron efectos semejantes entre sí como se puede ver en la figura 19.

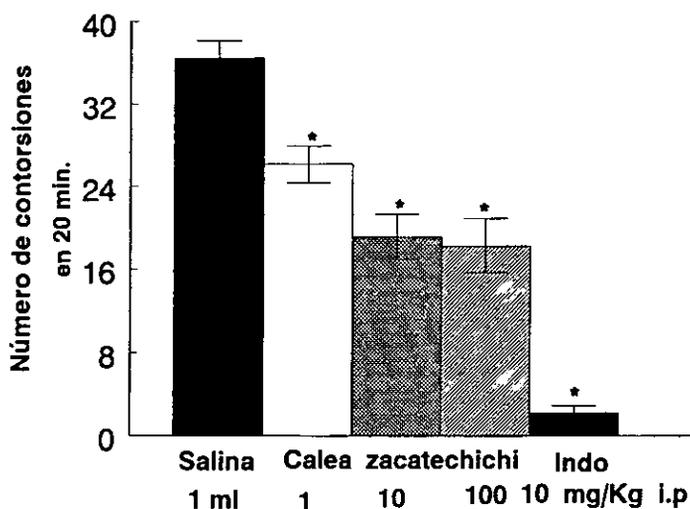


FIGURA 19: Efecto del extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi* (1, 10 y 100 mg/kg) e indometacina (10 mg/kg), administrados por vía intraperitoneal, sobre las contorsiones inducidas por administración intraperitoneal de ácido acético (60 mg/kg). (N=10, \* p< 0.05).

## 2.5. Prueba de contorsión en ratones (vía oral).

Por vía oral observamos que los ratones del grupo control mostraron el número de contorsiones más alto, un promedio de 45 contorsiones en 20 minutos.

El grupo tratado con indometacina, v.o., exhibió una reducción en el número de contorsiones de 93.26 % en el mismo lapso de tiempo.

Los grupos tratados con el extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi*, administrado por la vía oral, mostraron una reducción en el número de contorsiones de 17.44%, 37.53% y 38.42% en relación al grupo control, a las dosis de 1, 10, y 100 mg/kg de peso, respectivamente. Las diferencias observadas entre las dosis administradas, muestran un comportamiento semejante al experimento anterior como se puede ver en la figura 20.

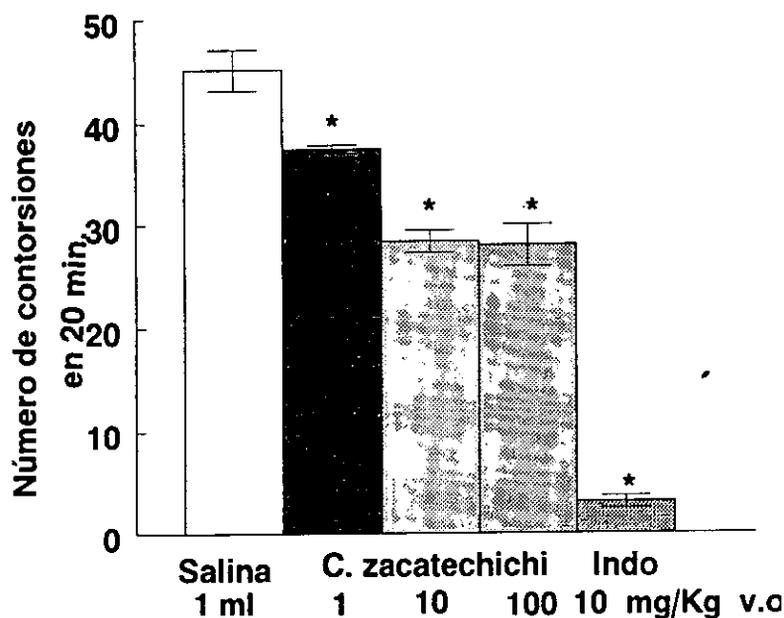


FIGURA 20: Efecto del extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi* (1, 10 y 100 mg/kg), e indometacina (10 mg/kg), administradas por vía oral, sobre las contorsiones inducidas por administración intraperitoneal de ácido acético (60 mg/kg). (N=10, \* p < 0.05).

## VII. DISCUSIÓN.

Los modelos animales de inflamación experimental se emplean para estudiar los compuestos con posible actividad antiinflamatoria y brindan una buena capacidad predictiva siempre que las concentraciones plasmáticas no sean demasiado desiguales por diferencias de ritmo metabólico entre hombre y especie animal utilizada para la prueba (Bowman y Rand, 1984). El modelo permite producir respuestas inflamatorias agudas, mediante la administración de sustancias adecuadas como la carragenina. El efecto inflamatorio puede juzgarse a partir del incremento de volumen generado por la formación de edema o por la migración celular (Bowman y Rand, 1984). También es posible estimar el dolor que acompaña a la inflamación, midiendo el cambio en el umbral de un estímulo (por ej. la presión), o mediante la administración de sustancias irritantes. Un modelo sencillo y confiable lo proporciona en el ratón la inyección intraperitoneal de ácido acético, sustancia irritante que produce un exudado inflamatorio y una respuesta característica de gran inquietud, que el ratón manifiesta en contorsiones como síntoma de dolor (Bowman y Rand, 1984).

Aunque la medicina tradicional popular administra siempre este recurso terapéutico (*C. zacatechichi*) por vía oral, en este trabajo se incluyó la administración por vía intraperitoneal a los animales en experimentación. La vía intraperitoneal en este trabajo fue considerada "equivalente" a la vía intravenosa en seres humanos; la finalidad fue observar el comportamiento y la eficacia del producto al ser administrado casi en forma directa al torrente sanguíneo. La administración por vía oral permitió observar el efecto del extracto en su forma de uso normal y de este modo confirmar el efecto de "él o los principios activos" a través de la absorción gastrointestinal.

La inhibición de la respuesta inflamatoria producida por el extracto (formación de edema, migración celular y respuesta al dolor) son claros indicios de la presencia de componentes con actividad antiinflamatoria y analgésica en el mismo. El extracto de *C. zacatechichi*, mostró capacidad para inhibir el incremento de volumen en las extremidades posteriores tratadas con carragenina, tanto administrado por vía oral como por vía intraperitoneal, con una ligera diferencia de actividad, que produjo un

efecto menor no significativo por la vía de administración oral.

El comportamiento del extracto durante el curso temporal de formación de edema, permitió observar algunos aspectos de interés para el desarrollo de este trabajo, El primero de ellos, es el grado de semejanza en los resultados obtenidos por ambas vías de administración. Por vía intraperitoneal, el extracto administrado prácticamente en forma directa al torrente sanguíneo, mostró una efectividad de 56 y 55 % de inhibición del proceso inflamatorio (figura 15). Por la vía oral, la efectividad fue de 52 y 50 % respectivamente (figura 16), resultados muy semejantes a los mencionados que evidencian la absorción del extracto por esta vía. Asumimos que la fracción activa del extracto no involucra en su composición péptidos o proteínas, sino componentes de naturaleza termoestable, ya que resistieron la temperatura de ebullición del agua por 10 minutos durante la preparación del extracto acuoso. La absorción del extracto por vía oral, también mostró indicios que sugieren que en la composición del mismo intervienen compuestos resistentes al pH ácido del estómago, ya que para ser absorbidos por la vía gastrointestinal, tuvieron que haber soportado no solo la presencia del ácido clorhídrico sino todo el conjunto de reacciones enzimáticas que juegan un papel determinante en el proceso digestivo. Otro aspecto observado es en relación a las dosis administradas, ya que el incremento de las mismas en forma geométrica, no se manifestó como un mayor efecto, posiblemente debido a que se trata de un extracto crudo con una gran cantidad de componentes, algunos de los cuales pudieran ser irritantes y que revierten de algún modo el efecto antiinflamatorio, alcanzando aparentemente la respuesta máxima con la dosis de 10 mg/kg de peso.

Otro resultado interesante, está en relación a la semejanza en el comportamiento de la indometacina (antiinflamatorio de tipo no esteroideal) y el extracto acuoso de *C. zacatechichi* a lo largo del período de observación de cuatro horas. Aspecto que quizá esté relacionado con el agente inflamatorio usado para las pruebas, la carragenina. La carragenina es un polisacárido que produce un edema en dos fases: la primera debida a la liberación de histamina que ocurre en los primeros minutos; la segunda es mediada por acción de las cininas con duración entre 90 y 150 minutos, tiempo en que se lleva a cabo la liberación de prostaglandinas (Di Rosa, 1972). Los antiinflamatorios de tipo no esteroideal como indometacina, basan su mecanismo de acción antiinflamatoria en la

inhibición no selectiva de las actividades de COX-1 y COX-2, enzimas encargadas de catalizar la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, cuya síntesis se prolonga en tanto persista el proceso inflamatorio (Goodman y Gilman 1996). Respecto al comportamiento del extracto de *C. zacatechichi* no proponemos que se trate de un antiinflamatorio no esterooidal, pero sí señalamos los aspectos de su actividad que nos parecieron coincidentes con el efecto de la indometacina sobre la formación de edema inducido por la carragenina.

Uno de los fenómenos característicos de la inflamación aguda es la quimiotaxis (Guyton, 1997). Durante el desarrollo de este proceso se lleva a cabo la migración celular, desplazamiento en que los neutrófilos constituyen las primeras células fagocíticas en dirigirse hacia el área lesionada, dando lugar al desarrollo del proceso inflamatorio (Rojas, 1983). Los neutrófilos aumentan su número hasta cuatro o cinco veces más de lo normal constituyéndose por varios días en las células predominantes en el área (Guyton, 1997), por esta razón consideramos importante ensayar también el extracto en un modelo de migración celular (Bowman y Rand, 1984). Consideramos que si el extracto de *C. zacatechichi* mostró capacidad para inhibir la formación de edema, consecuentemente también debe actuar sobre la migración celular, particularmente de los neutrófilos (Bowman y Rand, 1984; Guyton, 1997). Para ello se efectuó la prueba de migración celular a la cavidad peritoneal (área en que se indujo la respuesta inflamatoria con la misma sustancia irritante, carragenina) administrando el extracto vegetal tanto por vía oral como por vía intraperitoneal a los animales en experimentación. Los resultados por ambas vías de administración mostraron claros indicios de la actividad antiinflamatoria del extracto, al reducir la migración celular en 29.79 y 52.08 % en relación al control, administrando el extracto por vía intraperitoneal (figura 17). Por la vía oral, la efectividad del extracto fue de 44.4 y 60 % (figura 18). Por vía oral, el fármaco usado como referencia fue la dexametasona debido a cierta irregularidad en los resultados obtenidos con indometacina, y por la mayor facilidad de absorción que la dexametasona ofrece por esta vía. Como podemos ver en las gráficas correspondientes, los resultados de los experimentos de migración celular, evidencian la actividad antiinflamatoria del extracto administrado tanto por vía oral como por vía intraperitoneal, corroborando los resultados de los experimentos de formación de

edema.

Uno de los más molestos síntomas que acompañan al proceso de inflamación aguda es el dolor, por ello también se evaluó el efecto analgésico del extracto mediante la prueba de contorsión en ratones (Bowman y Rand, 1984). En estos experimentos se usó como estímulo irritante el ácido acético al 0.6 %, aplicado en la cavidad peritoneal para dar lugar a la respuesta inflamatoria aguda y con ella la liberación de los mediadores químicos histamina y bradicina cuya interacción, como sabemos, estimula a su vez la síntesis de prostaglandinas con el cúmulo de efectos señalados en la sección de mediadores inflamatorios, entre ellos el síntoma de dolor ( Blackwell y col., 1983; Bowman y Rand, 1984; Goodman y Gilman 1997).

Los resultados que se obtuvieron al administrar el extracto por las dos vías utilizadas muestran evidencias de actividad analgésica. Por vía intraperitoneal, el extracto mostró una efectividad para disminuir las contorsiones (consideradas como síntoma de dolor) de 28.5, 47.58, y 50.14 % en relación al control (figura 19). La dosis de 1 mg/kg evidenció un efecto menor, en tanto que la dosis intermedia y la más alta, dejaron ver resultados muy semejantes. Por la vía de administración oral, la actividad del extracto resultó considerablemente menor no obstante, aún la dosis más baja mostró evidencia de la actividad analgésica del extracto sobre las contorsiones inducidas por el ácido acético como puede constatarse en la (figura 20).

Los antiinflamatorios no esteroidales como la indometacina, en general también presentan efectos como analgésicos y antipiréticos (Goodman y Gilman, 1996), respecto al comportamiento del extracto acuoso de *C. zacatechichi*, observamos que mostró dos de los efectos señalados, como antiinflamatorio y como analgésico, lo cual no implica necesariamente que se trate de un compuesto no esteroidal, sin embargo los resultados sugieren la posibilidad de que el extracto de *C. zacatechichi* pudiera actuar al mismo nivel que la indometacina, considerando que son varios elementos los que coincidieron con la forma de acción de este fármaco de tipo no esteroidal: actividad antiinflamatoria sobre la formación de edema inducido por la carragenina, efecto inhibitorio sobre la migración celular hacia la cavidad peritoneal, efecto analgésico sobre las contorsiones (dolor) inducidas por el ácido acético en la cavidad peritoneal, actividad antiinflamatoria administrado casi directamente sobre el torrente sanguíneo, actividad y

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

absorción administrado por vía oral.

Por otra parte las pruebas fitoquímicas preliminares, permitieron reconocer en el extracto de *C. zacatechichi* algunos compuestos como: alcaloides, coumarinas, esteroides, flavonoides y sesquiterpenlactonas. Metabolitos secundarios que individualmente o en conjunto pudieran ser las sustancias responsables de la actividad farmacológica descrita. Para aclarar este aspecto del trabajo será necesario en un futuro aislar los componentes del extracto y ensayar cada componente por separado en cuanto a su actividad antiinflamatoria. En el grupo de sesquiterpenlactonas se han identificado algunos compuestos con actividad antiinflamatoria. Bork y col. (1997), refieren la identificación de sesquiterpenlactonas de los grupos: eudesmanólidos, germacranólidos, partenólidos e isoheleninas, en partes aéreas de *C. zacatechichi*

## VIII. CONCLUSIÓN.

El análisis de los resultados de las diferentes pruebas realizadas con el extracto acuoso de las hojas de *C. zacatechichi*, nos permite afirmar que dicho extracto contiene uno o más componentes con propiedades antiinflamatorias y analgésicas, los cuales pueden ser absorbidos por las vías de administración oral e intraperitoneal en los modelos animales utilizados. A partir de este reconocimiento, es válido suponer que dicho extracto actúa como antiinflamatorio como es postulado por la medicina tradicional popular.

## IX. ANEXO.

Prueba de Mayer (reacción genérica para reconocimiento de alcaloides ).

Disolver 1.36 g de  $\text{HgCl}_2$  en 60 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ; y 5 g de KI en 10 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ ; se mezclan las dos soluciones y se aforan a 100 mL con agua destilada. Se usa sobre soluciones aciduladas con HCl o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  diluidos (sólo usar unas gotas).

Coloración con el reactivo de Emerson. (Reacción genérica para reconocimiento de coumarinas).

Reactivo de Emerson :  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 0.5%, 4- aminoantipirina al 0.9%, ferrocianuro de potasio al 5.4 % en agua destilada.

Prueba de Salkowsky (reacción genérica para reconocimiento de esteroides).

1.2 mg de muestra de extracto de *C. zacatechichi* seco en 1 mL de cloroformo, se ponen en contacto con 1 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . La reacción positiva produce coloraciones amarillas o rojas.

Prueba de Shinoda (Reacción genérica para reconocimiento de flavonoides).

Se utiliza una pequeña muestra del extracto, 1 trozo de magnesio y unas gotas de HCl concentrado. La reacción positiva produce coloraciones rojizas, rojo-azulosas o violetas en presencia de flavonas.

Prueba de Baljet (reacción genérica para reconocimiento de sesquiterpenlactonas).

En un tubo de ensaye de 4 x 50 mm o un microcrisol se coloca una gota de solución metanólica de clorhidrato de hidroxilamina 2N con una gota de solución metanólica de hidróxido de potasio. La mezcla se calienta en un micromechero por espacio de 1 a 2 minutos, se enfría , se acidula con HCl 0.5 N se añade una gota de  $\text{FeCl}_3$  al 1%, la reacción positiva produce coloraciones violáceas.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, V. S., Jácquez, P., López, V. E. (1994). Herbario medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica.. I.M.S.S. Ed. México. pág. 42

Aguilar, A., Camacho, J. R., Chino, V. S., Jácquez, P., López, V. E. (1996). Plantas medicinales del Herbario del I.M.S.S. Cuadro básico por aparatos y sistemas del cuerpo humano. Ed. I.M.S.S. México. pág. 38

Argueta, V.A., Cano, A.L. y Rodarte, M.E. (1994). Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Vol. III. 1407,1408.

Appleton Lau, Tmliuson A., Willoughby A. Derek (1995). Induction of Ciclooxygenase and nitric oxide synthetase in inflammation Advances in Pharmacology. 35:27-28.

Bautista P. M. R. (1997). Aislamiento del principio activo antibradicinina de *Aloe barbadensis*. Tesis Profesional. Biología. E.N.E.P. Iztacala. U.N.A.M. págs. 1-8.

Bauman, H. and Gauldie, J. (1994). The acute phase response. Immunology Today. 15(2):74-80

Bork, M. P., Lienhard, S. M., Kuhnt, M., Escher, C., Heinrich, M. (1997). Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian Medicinal Plants and pure sesquiterpene lactone as potent inhibitors of transcription factor. FEBS Letters 402: 85-90

Bowman y Rand. (1984). Bases Bioquímicas y Patológicas. Ed. Interamericana. 2a. ed. 13.1- 13.29.

mechanisms. TIPS. 14:436 - 441.

Clerici, N. and Leyvan-Cobian, F. (1983). Generación de factores quimiotácticos por activación de las vías clásicas y alternativas del complemento. *Inmunología* 2 (1):25 - 42.

Davies, P., Bailey, P. and Goldenberg, M. M. (1984). The role Arachidonic acid Oxigenation Products in pain and Inflammation *Ann. Rev. Immunol* 2:335-357.

Dey, P.M. and Harborne, J.B. (1990). Monosaccharides en Sturgeon R.J. *Methods in Plant Biochemistry*. Vol.2, Ed. Academic Press. San Diego.1-3.

Van Arman, C. G., Begany, L. M. (1965). Some details of inflammations caused by yeast and carrageeneen *Exper. Therap.* 150:328.

Díaz, J. L. (1976). Edición facsimilar. Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. Instituto de Invetigaciones Biomédicas de la UNAM. IMEPLAN. México pp.30.

Durán, D. A., Cisneros, C. A. E., Fernández, A. M. A., Gersenowies, R. J., Meraz, M. S., Vargas, V. A. (1986). *Manual de Técnicas Estadísticas*. E.N.E.P. Iztacala. U.N.A.M. México.págs. 1-20.

Domínguez X. A. (1979). *Métodos de Investigación Fitoquímica*. Ed. Limusa. pp.84, 97-98, 113, 141, 217-219.

Dray, A. and Bevan, S. (1993). *Inflammation and Hyperalgesia: Highligting the Team Effort*. TIPS 14:287-290.

Faimboim, L., Satz, M. L. (1949). *Introducción a la Inmunología Humana*. Mosby Doyma Libros. Barcelona España.pp. 2-3.

Ferreira, S. H., Moncada, S. and Vane, R. J. (1974). Prostaglandins and Signs and Symptons. of Inflammation. Institute of Basic Medical Sciences, 175-187.

Ferreira, S. H. (1972). Prostaglandins, Aspirin-like drogs and Analgesia Nature New Biol. 240:200-203.

Ferreira, S. H., Moncada, S. (1971). Indometacin and Aspirin Abolish Prostaglandins release from the speen. Nature New. Biol. 231: 237-239.

Goodman, L. S. y A. Gilman. (1996). Bases Farmacológicas de la terapéutica. Editorial Médica Panamericana. México.pp. 565-587.

Guyton, C. A. (1997). Tratado de Fisiología Médica. 9a edic. Edit. Interamericana. 477-497.

Hardman, J. G. y Col. (1996). Las Bases Farmacológicas de la terapéutica. 9a ed. Edit. Panamericana. 1:619-731.

Higgs, A. G., Flower, J. R. and Vane, R. J. (1979). A new Approach to Antiinflammatory Drugs, Biochemical Pharmacology 28, 1959-1961.

Higgs, G. A., Salmon, J. A., Henderson, B. and Vane, J. R. (1987). Pharmacokinetics of Aspirin and Salicylate in relation to inhibition of Arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activty. Proc. Natl Acad. Sci 84: 1417-1420.

Junqueira, L. C. y Carneiro, J. (1987). Histología Básica. Ed. Salvat. Mallorca España pp. 21.

Lindgren, J. (1993). Transcelular Biosynthesis of leukotrienes and lipoxins via

leukotriene A4 transfer. TINS 14

López V. M. E. (1989). Contribución Etnobotánica en plantas medicinales utilizadas por dos grupos étnicos de Mecalapa, Municipio de Pantepec, Puebla. Tesis profesional. Biología, ENEP Iztacala, UNAM.

Male, D. K. (1991). Cell Traffic inflamation in *Advanced Inmunology* edic. 16a.

Martínez, M. (1961). Edición facsimilar. Las plantas medicinales de México. Ed. Botas. México. pags. 291-347.

Mayagoitia, L., Díaz, J. L., Contreras, C. M. "Pharmacological analisis of an alleged oneirogenic plant: *C. zacatechichi*" *J. Ethnopharmacology*. 1986 Dec; 18 (3):229-43

Medina, S. R., Reyes G. G. (1996). Sobre el desarrollo de AINEs con actividad inhibitoria selectiva COX-2: Meloxicam. *Acta Med.* 31 (122): 69-77.

Massimo Di Rosa (1972). Biological Properties of Carrageenan. *J. Pharma.* 24:84-102.

Pérez, R. M., Pérez, S., Zavala, M. A., Salazar, M. (1995). Anti-inflammatory activity of the bark *Hippocratea excelsa*. *J. of Ethnopharmacology*. 47: 85-90

Proud, D. and Kaplan; (1988). Kinin formation disorders. *Annu. Rev. Inmunol.* 6:49-83

Robbins Stanley (1997). *Patología Básica* 9a ed. Edit. Interamericana.

Roman, R. R., Alarcón - Aguilar, I, Lara- Lemus, A., Flores - Saenz, J. L. Hypoglycemic effect of plants used in México as antidiabetics. *Arch. Med. Res.* 1992 Spring; 23 (1): 59-64

Roitt, I. (1996). *Inmunología* 3a ed. Edit. Salvat. pp. 13-18.

Walter J. B. (1994). *Patología Humana*. Ed. El Manual Moderno. Mexico. pp. 89.