

93
2ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
BIOLOGIA

"INHIBICION DE LA MIGRACION DE LEUCOCITOS
Y DE LA PERMEABILIDAD POR EL EFECTO DEL
EXTRACTO ACUOSO DE *Aloe variegata*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
LICENCIADO DE BIOLOGIA
P R E S E N T A :
LAURA RAMOS SAUCEDO

TRABAJO REALIZADO BAJO LA DIRECCION DE LA:
DRA. BEATRIZ VAZQUEZ CRUZ



SAN JUAN IZTACALA, MEXICO 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

264739



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, a 25 de junio de 1993

SOLICITUD PARA REVISION DE ESTUDIOS

LIC. AMERICA LANBA ROMERO
JEFE DE LA UNIDAD DE
ADMINISTRACION ESCOLAR.
P R E S E N T E .

Por medio de la presente comunico a Usted que el Presente
de Biología:

LAURA RAMOS SAUCEDO

ha concluido su trabajo de Tesis titulado:
"Inhibición de la migración de leucocitos y de la
permeabilidad por el efecto del extracto acuoso de
Aloe variegata"

habiendo entregado a esta Jefatura los votos aprobados.
Se extiende la presente a fin de que procedan los trámites
pertinentes para la realización de su examen profesional.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

M. EN C. IGNACIO PEÑALOSA CASTRO
JEFE DE LA CARRERA DE BIOLOGIA

RECEBI
1993
CAMPUS IZTACALA
JUN 25 1993

A Dios:

Por guiar siempre mis pasos.

A la memoria de mi padre:

Con veneración infinita.

A mi madre:

Por su comprensión y cariño.

A mi esposo:

Por que con su amor y confianza me impulsa a seguir adelante.

A mis hijos:

Por que ellos representan una fuente de estímulo constante para luchar en la vida.

A mis hermanos:

Por su cariño y apoyo.

Mi Gritud:

A la Dra. Beatríz Vázquez Cruz por su gran ayuda para la elaboración de este trabajo.

A todos los que desinteresadamente contribuyeron a la realización de este sueño.

INDICE.

	Página
A. Resumen	1
I. Introducción	3
1. Proceso Inflamatorio	3
1.1. Cambios Vasculares	5
1.1.1. Adaptaciones Hemodinámicas	5
1.1.2. Cambios en la Permeabilidad	7
1.2. Cambios Leucocitarios	7
1.2.1. Marginación y Pavimentación	8
1.2.2. Migración	10
1.2.3. Quimiotaxis y Conglomeración	11
1.2.4. Fagocitosis	13
1.3. Mediadores Químicos	15
1.3.1. Mediadores químicos de origen celular	17
1.3.1.1. Aminas vasoactivas	17
1.3.1.2. Prostaglandinas	25
1.3.1.3. Componentes lisosomales	31
1.3.2. Mediadores Químicos de Origen Plasmático	33
2. Fármacos Antiinflamatorios	42
2.1. Antiinflamatorios no esteroideos	44
2.2. Antiinflamatorios esteroideos	49

3. Aloe	58
3.1 Historia	58
3.2. Clasificación y origen de la planta	60
3.3. Descripción botánica	60
3.4. Composición química	61
3.5. Propiedades y usos	64
4. Justificación	66
5. Objetivo	66
6. Hipótesis	66
II. Material y Métodos	67
1. Extracción del Material	67
1.1. Preparación del gel	67
1.2. Preparación del extracto acuoso	67
1.3. Preparación del extracto clorofórmico y etanólico	68
2. Animales	68
3. Preparación de las esponjas	68
4. Actividad Antiinflamatoria	69
4.1. Implantación de esponjas	69
4.2. Edema inducido por carragenina en la extremidad inferior de la rata.	73
4.3. Inhibición de la migración de neutrófilos en la cavidad peritoneal	74

5. Prueba de Contorsión	76
III. Análisis Estadístico	76
IV. Resultados	77
4.1. Implantación de esponjas	77
4.2. Edema inducido por carragenina en extremidad posterior de la rata	83
4.3. Inhibición de la migración de neutrófilos en la cavidad peritoneal	89
4.4. Contorsión	92
V. Conclusión	92
VI. Bibliografía	95

A. RESUMEN

Diferentes fármacos antiinflamatorios son utilizados para disminuir el proceso inflamatorio, más su utilidad terapéutica es limitada, debido a sus efectos adversos. El Aloe variegata de la familia de las Lileaceas conocido popularmente como sábila, ha sido utilizada ampliamente en la medicina tradicional, para tratar diferentes padecimientos inflamatorios, por tal motivo el objetivo de éste trabajo fue estudiar el efecto antiinflamatorio del Aloe variegata en diferentes modelos experimentales de inflamación.

Se utilizaron ratas Wistar de 200-250 g de peso, se formaron grupos a los cuales se les administró por vía intraperitoneal indometacina (8 mg/Kg), extracto acuoso de áloe (1 ml) y al grupo control solución salina (1 ml), 30 min después se les implantaron subcutáneamente esponjas impregnadas con carragenina y/o dextrán, dejandolas así durante 2, 4, 6 y 8 hrs; con el exudado obtenido se determinó la migración de leucocitos y la cantidad de proteínas. A otros grupos de ratas se les administró por vía s.c. indometacina (10 mg/Kg), dexametasona (0.5 mg/Kg) y solución salina (0.1 ml/Kg), se les administró por vía i.p. los siguientes extractos de Aloe variegata: acuoso (100 mg/Kg), clorofórmico (100 mg/Kg), transcurridos 60 min. se les administró por vía intraplantar carragenina (100 µg en 0.1 ml) y se midió el edema por el método de desplazamiento cada hora hasta 8 hrs. En otro grupo de animales se estudio la migración de leucocitos a la cavidad peritoneal, para lo cual a los animales se les administró por vía s.c. los siguientes extractos: acuoso (400 mg/Kg), etanólico (50, 200 y 600 mg/Kg), indometacina (10 mg/Kg) y dexametasona (0.5 mg/Kg) y para el grupo control solución salina (1 ml); después de 1 hr se les administró por vía i.p. carragenina (100 µg/ml), transcurridas 4 hrs se midió el número total de células y se hizo la cuenta diferencial. También se estudio la actividad analgésica de los extractos de Aloe variegata, se formaron grupos de 8 ratones de la cepa CD1 de 20 a 25 g de peso a los que se les administró los siguientes extractos de áloe: por vía oral acuoso

(100 y 200 mg/Kg) y clorofórmico (25 mg/Kg), por vía s.c. (25, 50 y 100 mg/Kg) e indometacina (10 mg/Kg), después de 1 hr se les administró por vía i.p. ácido acético (60 mg/Kg).

Nuestros resultados muestran que en ratas tratadas con esponjas implantadas impregnadas con carragenina y/o dextrán, el extracto acuoso de áloe inhibió la migración de leucocitos y de proteínas siendo el efecto máximo a las 4 hrs, obteniendo una cuenta total de leucocitos de $0.402 \pm 0.89 \times 10^6$ y de proteínas $2.04 \pm 0.90 \text{ mg/ml}^{-1}$, en comparación con el grupo control el cual fue de $3.17 \pm 0.84 \times 10^6 \text{ mg/ml}$ y $3.36 \pm 1.26 \text{ mg/ml}^{-1}$ respectivamente; en esponjas impregnadas con dextrán el número de leucocitos fue de $0.150 \pm 0.03 \times 10^6 \text{ mg/ml}$ y de proteínas plasmáticas de $1.33 \pm 0.30 \text{ mg/ml}^{-1}$, y para el grupo control la conte total de células fue de $2.80 \pm 0.15 \times 10^6$ y de proteínas de $6.45 \pm 1.04 \text{ mg/ml}^{-1}$. En el estudio de inhibición del edema se observó que el extracto acuoso y clorofórmico de áloe disminuyó significativamente el incremento de volumen (75 y 62 μl respectivamente) en relación al grupo control el cual fué de (160 μl). La inhibición de la migración de leucocitos a la cavidad peritoneal con los extractos de áloe se observó una inhibición del 28% con el extracto acuoso y con el clorofórmico de 42.9% de inhibición. Con el extracto etanólico se observó que la dosis de 600 mg/Kg se produjo 48% de inhibición. Por otro lado se observó que los extractos de áloe acuoso y etanólico disminuyeron el número de contorsiones inducidas con ácido acético en un 64.9% y 64.5% respectivamente.

Con estos resultados nos permiten concluir que en los extractos de Aloe variegata, acuoso, etanólico y clorofórmico, existen compuestos capaces de disminuir los signos y síntomas del proceso inflamatorio, lo cual corrobora el uso del áloe en la medicina tradicional para combatir el proceso inflamatorio.

I. INTRODUCCIÓN

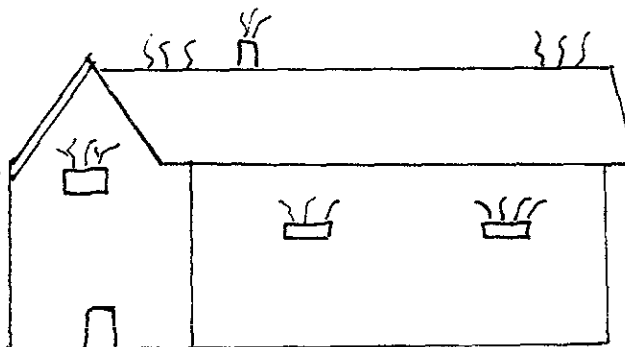
1. PROCESO INFLAMATORIO

“La inflamación es un proceso tan viejo como la medicina misma” (Ryan and Majno 1977). Desde tiempos muy remotos se empleaban diversos términos para designar el daño local causado por algún agente agresor. La palabra inflamación deriva del latín inflamare (Spector W. G. 1977); el cual es un proceso que entra en funcionamiento cuando el tejido es dañado por agentes medio ambientales ya sean físicos (calor, frío excesivo o traumas), químicos (ácidos y drogas), biológicos (bacterias, virus y hongos) e inmunológicos (reacción antígeno-anticuerpo). Inmediatamente, después de la lesión aparecen los signos clínicos de la inflamación descritos por Celsus: rubor, calor, dolor y edema (Figura 1)(Rather L. J. 1971) y en algunos casos se manifiesta un quinto signo, “la pérdida o disminución de la función” descrito por Virchow en 1854.

El proceso inflamatorio involucra una serie de mecanismos de defensa del huésped en contra del agente, los cuales son:

1. Cambios vasculares: a) Adaptaciones hemodinámicas, b) Modificaciones en la permeabilidad vascular y 2. Cambios leucocitarios, encaminados a eliminar al agente agresor (Robbins, 1990).

DAÑO OCASIONADO POR FACTORES
MEDIO AMBIENTALES.



SIGNOS CLINICOS DE LA
INFLAMACION:
RUBOR, CALOR, DOLOR Y EDEMA.



RESPUESTA VASCULAR:
VASODILATACION, INCREMENTO EN
LA PERMEABILIDAD Y MIGRACION.

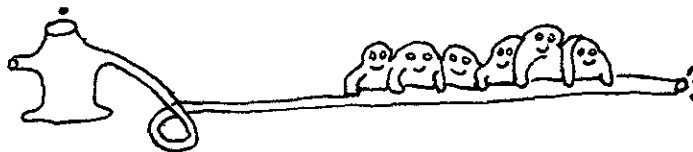


Figura 1 Componentes de la respuesta inflamatoria.
(Modificado de Dorothy F. Bainton 1980).

1.1. Cambios Vasculares.

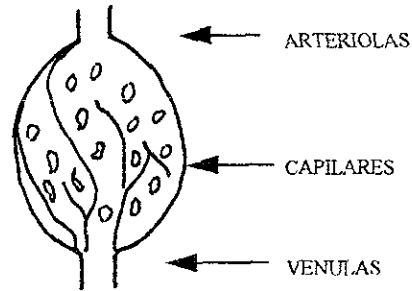
La respuesta vascular en el sito lesionado es fundamental para la reacción inflamatoria aguda, sin riego sanguíneo adecuado los tejidos no podrían presentar respuesta inflamatoria.

1.1.1. Adaptaciones Hemodinámicas.

Los signos clínicos de la inflamación (rubor, calor, dolor y edema) son el resultado de modificaciones en la microcirculación del área dañada, inmediatamente después de la lesión hay vasoconstricción de arteriolas seguida de vasodilatación de vénulas, capilares y linfáticos (figura 2), aumentando así el riego sanguíneo (lo que origina el rubor y aumento de la temperatura local (calor), lo cual hace que los microvasos se congestionen produciéndose hipertermia, por otro lado el endotelio de las vénulas y los capilares aumentan su permeabilidad, originando el escape de líquido y proteínas del plasma, sedimentación de eritrocitos (hemoconcentración) y desplazamiento de los leucocitos hacia la periferia, conduciendo al aumento de la presión hidrostática e incrementándose aún mas la permeabilidad, resultando así el escape de proteínas del plasma (albúmina, globulina y fibrinógeno) que pasan a través de la pared de los vasos hacia el tejido dañado, de este modo la circulación en el área dañada se dificulta y contribuye a la éstasis y estancamiento de la microcirculación, como resultado de estos cambios se forma el edema.

MICROCIRCULACION:

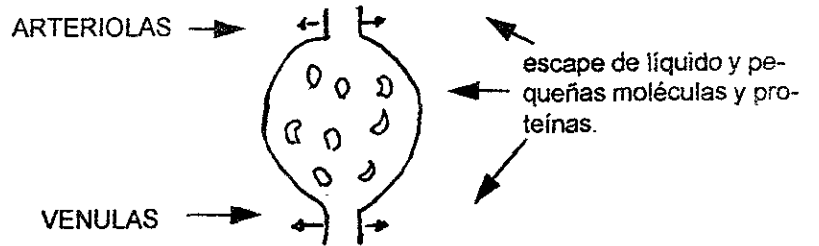
NORMAL



RESPUESTA INFLAMATORIA



VASOCONSTRICCIÓN BREVE



VASODILATACION PROLONGADA

Figura 2 Cambios vasculares

1.1.2. Cambios en la permeabilidad.

La vasodilatación va seguida de aumento de la presión en capilares y vénulas; lo cual explica el paso del líquido y moléculas pequeñas a través de la pared de los vasos (figura 2), este ensanchamiento de las uniones interendoteliales comprobadas por microscopia electrónica por Majno y Palade (1961) son importantes para explicar el paso de moléculas. Este ensanchamiento se debe a la contracción de las miofibrillas. De tal manera que por este ensanchamiento hay escape de macromoléculas que quedan atrapadas en la membrana basal, y al aumentar la gravedad de la lesión, también aumenta el ensanchamiento del espacio intercelular endotelial, lo cual permite se forme un exudado rico en proteínas.

1.2. Cambios Leucocitarios.

El fenómeno histológico del proceso inflamatorio es la reducción de leucocitos, la mayor parte de ellos se transportan de forma específica a áreas de infección e inflamación, de los cuales, los granulocitos (neutrófilos) y los monocitos son los que principalmente tienen mayor capacidad para destruir cualquier agente agresor por medio de la fagocitosis, los linfocitos actúan más eficazmente en reacciones antígeno - anticuerpo..

La conglomeración y la acción de leucocitos en el área dañada se lleva a cabo bajo los siguientes eventos:

- 1) Marginación y Pavimentación.
- 2) Migración
- 3) Quimiotaxis y Conglomeración.
- 4) Fagocitosis (Hersh y Bodey 1970).

1 2.1 Marginación y Pavimentación.

Conforme se produce el estancamiento del flujo sanguíneo, los neutrófilos se separan del torrente circulatorio y se ponen en contacto con el endotelio, de los capilares en el área inflamada, efecto que se conoce como marginación, (figura 3) La adhesión de los leucocitos se debe a la interacción específica entre moléculas de adherencia complementarias presentes en las superficies leucocitarias y endoteliales (Robbins, 1990; Pelletier, 1992; Lasky, 1992).

Las moléculas de adhesión son proteínas de membrana, existen un gran número de moléculas de adhesión las cuales, por su relación estructural se han agrupado en familias como se muestra en la tabla 1.

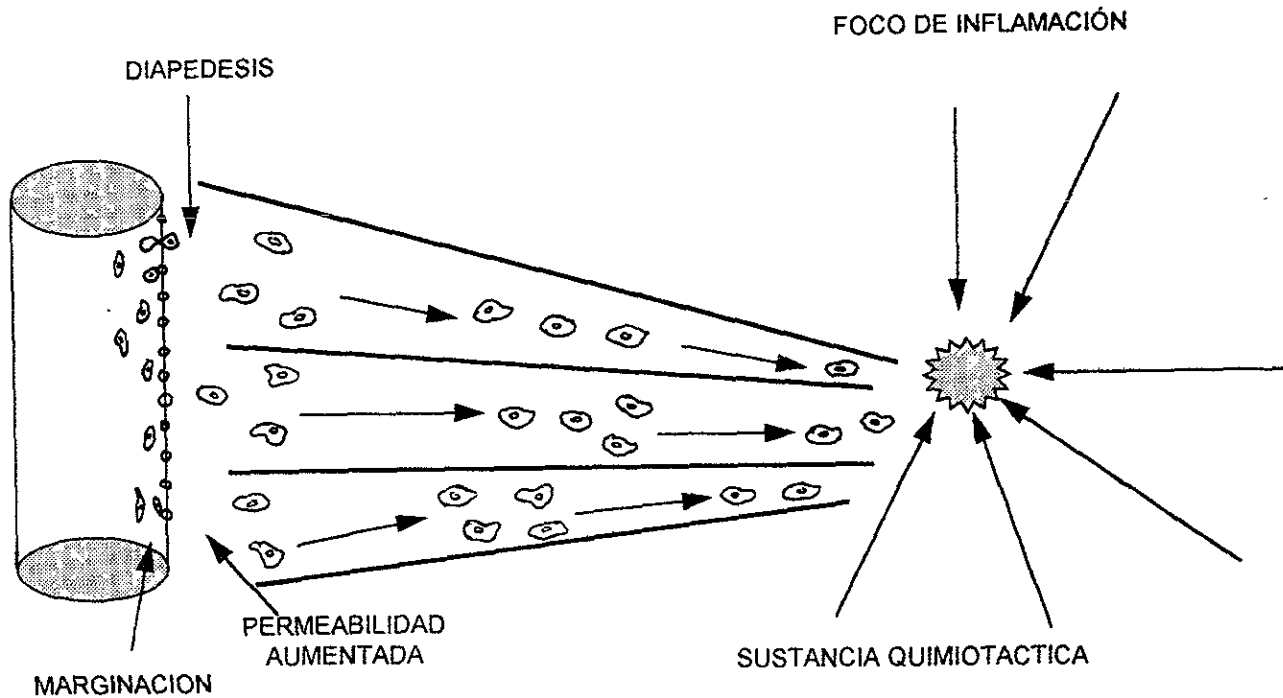


Figura 3 Cambios leucocitarios (Modificado de Guyton C. Arthur, 1997)

Bengham sugiere que el contacto entre el leucocito y la célula endotelial es por medio de pseudopodos y es donde las fuerzas electrostáticas son reducidas, ya que en estado normal el leucocito y la célula endotelial se repelen por cargas. El calcio quizá participe de alguna manera en esta adherencia, al actuar como puente entre las cargas negativas de la célula endotelial y las del leucocito (pavimentación). La quelación de calcio por EDTA bloquea la acumulación de leucocitos en los sitios de lesión (Segura J.J., Calvo J.R., 1997).

Tabla 1 Moléculas de Adhesión (Hamawy, 1994).

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

1.2.2. Migración:

La migración de los leucocitos de los vasos a los tejidos ocurre por acción de: los mediadores químicos de la inflamación, enzimas producidas por neutrófilos lo cual los induce a formar pseudopodos y pasar a través de las células endoteliales hacia el foco inflamatorio. La muerte de los neutrófilos, durante el encuentro con el agente agresor, les permite liberar sustancias quimiotácticas

para otras células. Otro fenómeno durante la migración es la diapédesis, que se observa por efecto de la marginación de los neutrófilos, las células endoteliales de los capilares y de las vénulas se separan fácilmente, formando aberturas suficientemente grandes para que el neutrófilo las atraviese. La diapédesis es uno de los mecanismos más importantes de acumulación de células en el área lesionada, no está limitada a los leucocitos; puede verse también que los eritrocitos, linfocitos, monocitos y otros elementos circulantes salen de los capilares; sin embargo este fenómeno parece ser pasivo dado que sólo tiene lugar cuando la estasis y la vasodilatación son muy pronunciadas (Robbins, 1990).

1.2.3. Quimiotaxis y Conglomeración.

La concentración de sustancias químicas en el sitio de la lesión, provocan que los leucocitos migren hacia la fuente de las mismas, fenómeno que se conoce como quimiotaxis (figura 3).

La quimiotaxis depende del gradiente de concentración de la sustancia quimiotáctica. La concentración de la sustancia es mayor cerca de su origen, lo que provoca el movimiento unidireccional de los leucocitos. Los factores del complemento (C5, C6, C7, C3a, C5a), endotoxinas, restos necróticos de los neutrófilos, la trombina, la caseína, la calicreína, prostaglandinas E_2 , leucotrienos (LTB_4), interleucinas (IL-8), factor quimiotáctico neutrofilico (NCF), fibrinopéptidos

y productos de degradación de la fibrina entre otros, son sustancias consideradas como factores quimiotácticos para los leucocitos (Deuel, 1982; Robbins. 1990).

La conglomeración de leucocitos en el foco inflamatorio es primeramente de neutrofilos y progresivamente son reemplazados por monocitos, los cuales entran en el tejido inflamado y aumentan de tamaño hasta convertirse en macrófagos, tras varios días o semanas los macrófagos llegan a dominar finalmente. Boyden demostro (1972) in vitro que los neutrofilos responden al estímulo quimiotáctico aproximadamente a los 90 minutos, los monocitos necesitan cinco horas, o más.

Se han implicado numerosos factores en el control de la respuesta de macrófagos-neutrófilos en la inflamación, se cree que cinco de ellos desempeñan papeles dominantes : 1) El factor de necrosis tumoral (TNF), 2) La interleucina-1 (IL-1), 3) El factor estimulante de colonias de granulocitos monocitos (GM-CSF), 4) El factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y 5) El factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF). Factores que son formados activamente por los macrófagos y las células T en los tejidos inflamados y en pequeñas cantidades otras células de estos tejidos.(Guyton-Hall, 1997). La combinación de estos factores proporciona un potente mecanismo de retroacción que comienza con la inflamación del tejido, sigue después con la formación de

leucocitos defensivos y finalmente con la eliminación de la causa de la inflamación.

1.2.4. Fagocitosis.

La función de los neutrófilos y fagocitos mononucleares (macrófagos) en el sitio de la inflamación, es la ingestión y digestión de partículas extrañas y restos celulares, proceso conocido como fagocitosis.

Los macrófagos y los neutrófilos tienen abundantes lisosomas llenos de enzimas proteolíticas especialmente para digerir bacterias y otras sustancias proteicas, los macrófagos también contienen lipasas que digieren las membranas lipídicas de algunas bacterias. además son células de mayor tamaño que los neutrófilos, lo que les da un poder fagocítico mayor. (Baumann y col., 1994).

La fagocitosis es altamente selectiva y específica y depende de tres procesos: (Guyton, 1997).

1° Superficie de los tejidos. La mayor parte de los tejidos tienen superficie lisa, por lo que una superficie rugosa aumenta la probabilidad de ser fagocitada.

2° Repulsión de cargas. La mayor parte de las sustancias naturales del cuerpo tienen cubiertas proteicas protectoras que repelen a los fagocitos, por lo que tejidos muertos y la mayor parte de partículas extrañas carecen de cubiertas protectoras, lo que les hace objeto de ser fagocitadas.

3º Oponización. El sistema inmunitario produce anticuerpos contra agentes infecciosos como las bacterias, los cuales se adhieren a la membrana bacteriana, para hacerla más susceptible de ser fagocitada, el anticuerpo se combina también con el producto C3b de la cascada del complemento; C3b se une a los receptores de membrana de los fagocitos e inicia la fagocitosis. En ocasiones, los leucocitos y macrófagos engloban bacterias o materiales no membranosos en ausencia de suero, pero la mayoría de los microorganismos no son reconocidos si no están revestidos de factores séricos denominados opsoninas, de las cuales las dos principales son: la IgG (subtipos 1 y 3) y C3b denominado fragmento opsónico de C3 como ya se menciono anteriormente. (Unkeless, 1989).

La fagocitosis consiste de tres fases (Stassel T.P. 1974):

- a) Adhesión de partículas a la superficie celular.
- b) Ingestión de partículas (formación de fagosomas y degranulación)
- c) Muerte del agente agresor.

La adhesión de partículas, es la unión del leucocito a la partícula, posteriormente la célula proyecta pseudopodos alrededor de la partícula, los pseudopodos se unen y se funden, creando una vacuola con la partícula fagocitada, la vacuola se invagina hacia el interior de la membrana citoplasmática

y se desprende de la membrana celular externa y forma una vesícula fagocítica. (llamada fagosoma). Los lisosomas se unen a la vesícula formando el fagolisosoma y por fusión las enzimas digestivas y agentes bactericidas destruyen al agente agresor (degranulación). La muerte del agente agresor puede ser atribuida a: pH ácido dentro de la vacuola, proteínas catiónicas, lisozima (enzima láctica), lactoferrina (bacteriostático), formación de agentes oxidantes que contienen grandes cantidades de superóxido, peróxido de hidrógeno e iones hidroxilo, todos los cuales son mortales para la mayor parte de las bacterias incluso en pequeñas cantidades. La mieloperoxidasa, cataliza la reacción entre el peróxido de hidrógeno y los iones cloro para formar hipoclorito, que es extremadamente bactericida.

1.3. Mediadores químicos de la inflamación.

Los signos y síntomas involucrados en el proceso inflamatorio son atribuidos a los mediadores químicos de la inflamación.

En las siguientes tablas (2 y 3) se muestra una serie de mediadores químicos de origen plasmático y celular. (Dray Andy, Bevan Stuart., 1993).

Tabla 2. Mediadores quimicos de origen celular
(Modificado de Dray A., Bevan S., 1993).

Mediadores quimicos+	Actividad Biológica en el proceso inflamatorio
Aminas vasoactivas: Histamina 5-Hidroxitriptamina	Vasodilatación y Aumento de la permeabilidad vascular
Factor activador de las plaquetas (FAP)	Agregación plaquetaria Libera Histamina y 5-Hidroxitriptamina Produce vasoconstricción y broncoconstricción A concentraciones bajas produce vasodilatación y aumento de la permeabilidad venular Estimula la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos.
Citocinas: Interleucina-1 (IL-1) Factor de la necrosis tumoral (TNF) 0	Estímula la síntesis de moléculas de adherencia, PG12, del factor activador de plaquetas (FAP) Inducen las respuestas generales de la fase aguda.
Constituyentes de los lisosomas: Lactoferrina Lisozima Fosfatasa alcalina Proteínas catiónicas Hidrolasas ácidas Proteasa neutra (elastasa, colagenasa, catepsina)	Aumento de la permeabilidad vascular Quimiotactismo (monocitos) Inhiben el movimiento de los neutrófilos y eosinófilos. Atacan al colágeno, membranas basales, fibrina, elastina y cartílago, dando lugar a la destrucción tisular
Metabolitos del ácido araquidónico Prostaglandinas (PGE, PGD2, PGF2) Prostaciclina (PGI2) Tromboxanos (TXA2) Leucotrienos (LTB4) LTC 4 LTD4 LTE4	Vasodilatación y protección del edema, dolor y fiebre. Inhibidor de la agregación plaquetaria Produce vasoconstricción y agregación plaquetaria. Quimiotactismo Aumento de la permeabilidad vascular

Tabla 3 Mediadores químicos de origen plasmático

Mediadores Químicos	Actividad Biológica en la Inflamación
Proteasa plasmáticas: El sistema del complemento: C3a, C5a, C3b, C3bi, C5b-9	Aumento de la permeabilidad vascular Aumenta la adhesividad de los leucocitos al endotelio. Quimiotactismo Oponisación Desgranulación de mastocitos Activan a la lipooxigenasa
El sistema de las Cininas: Bradicinina Calidina	Aumento de la permeabilidad vascular Produce vasodilatación Dolor Actividad quimiotáctica
El sistema de la coagulación: Fibrinopéptidos Factor Hageman (factor XIIA)	Aumento de la permeabilidad vascular Quimiotactismo Inicia los sistemas de la coagulación fibrinolítico y de las cininas.

1.3.1. Mediadores químicos de origen celular.

1.3.1.1. Aminas vasoactivas:

- a) Histamina
- b) 5-Hidroxitriptamina.

a) La histamina es 2-(4-imidazolil) etilamina (o beta-aminoetilimidazol) según Windaus y Vogt 1907. (Beauen 1976). Se forma por descarboxilación del aminoácido histidina (Figura 4). (William 1972).

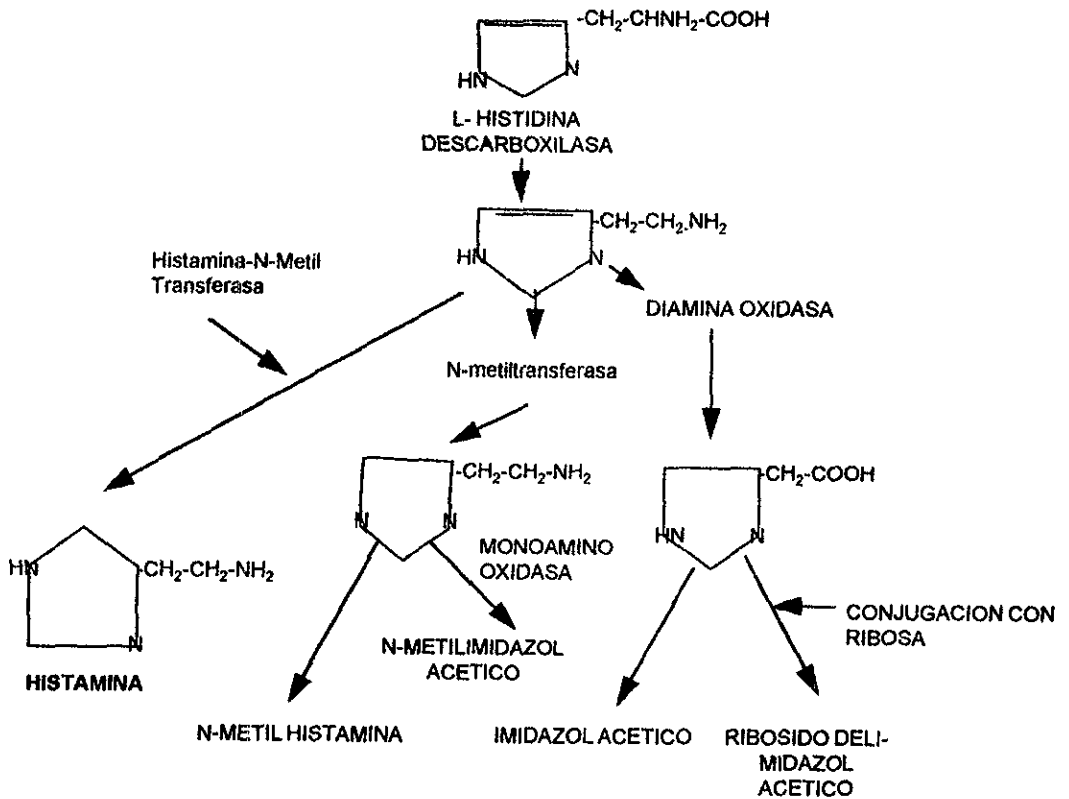


Figura 4 Síntesis de histamina
(William, 1972)

La histamina está distribuida en todo el reino animal además forma parte de bacterias y plantas (Reite, 1972). Casi todos los tejidos contienen histamina, las concentraciones en plasma y otros líquidos corporales son pequeñas, pero en líquido cefalorraquídeo se encuentra en cantidades mayores (Khandelwal y col., 1982). La concentración de histamina es abundante en células cebadas, piel y mucosa del árbol bronquial y de los intestinos, también se encuentra en menor cantidad en los basófilos. Dentro de los gránulos secretorios de estas células, la histamina se almacena formando un complejo heparina proteína (Bach 1978).

La liberación de histamina se produce por desgranulación de las células cebadas y/o de los basófilos, existen diversos estímulos que producen su liberación, como se muestra en el siguiente listado (William 1972).

1. Interacción del antígeno con los anticuerpos IgE
2. Las anafilotoxinas C3a y C5a
3. Liberadores de histamina
 - a) Compuesto 48/80
 - b) Concanavalina A
4. Químicos y drogas
 - a) Dextran
 - b) Enzimas (Quimiotripsina, fosfolipasa A)
 - c) Componentes activos (sales biliares)

- d) Morfina, codeína, d-tubocurarina
- e) Antibióticos básicos
- f) Medios de contraste radiopacos.
- g) Expansores plasmáticos tipo carbohidrato.

5.Físicos

- a) Calor
- b) Vibración

Con la desgranulación de las células cebadas, también se liberan otros mediadores de la inflamación. (tabla 4).

Tabla 4 Mediadores del proceso inflamatorio provenientes de células cebadas. (Hardman Joel y col., 1996).

Clases	Mediador	Efectos
Preformados	Histamina	Vasodilatación, permeabilidad vascular, prurito, tos, broncoconstricción, rinorrea.
	TNF- α	Regulación de moléculas de adherencia.
	Proteasas	Vasodilatación, permeabilidad vascular broncoconstricción.
	Heparina	?
Derivados de lípidos	LTC4	Broncoconstricción, vasodilatación, permeabilidad vascular
	LTB4	Quimiotaxia de leucocitos
	PGD2	Vasodilatación, permeabilidad vascular, broncoconstricción, secreción de moco.
Citocinas	PAF	Broncoconstricción, quimiotaxia de leucocitos
	TNF - α	Regulación de moléculas de adherencia
	IL-1	Estimulación amplia de la inflamación
	IL-3	División de células cebadas
	IL-4	División de células cebadas, cambio en la clase de inmunoglobulina de linfocitos B para la producción de IgE
	IL-5	Diferenciación y quimiotaxia de eosinófilos
	IL-6	Crecimiento y diferenciación de linfocitos
	IL-8	Quimiotaxia de leucocitos
	GM-CSF	Estimulación de neutrófilos, eosinófilos y macrófagos
MIP-1 α	Quimiotaxia de monocitos, linfocitos T y eosinófilos	

La histamina ejerce sus acciones biológicas combinándose con receptores específicos localizados en la superficie de la membrana, los cuales son de tres tipos de receptores H₁, H₂ y H₃. (tabla 5).

Tabla 5 Distribución de los receptores de Histamina
(Modificado de Katzung, 1996)

Receptores a Histamina	Distribución
H ₁	Músculo liso, endotelio, encéfalo
H ₂	Mucosa gástrica, músculo cardíaco, células cebadas, encéfalo
H ₃	Presináptica: encéfalo, plexo mientérico, otras neuronas

Los efectos de la histamina están determinados dependiendo del receptor con el cual actúe.

La activación de los receptores H₁ y H₂ causa vasodilatación, con lo cual hay rubor, hiperemia y disminución de la resistencia periférica total lo cual produce hipotensión arterial e intensifica la permeabilidad capilar con el consecuente edema. El aumento de la frecuencia cardíaca, se produce por la activación de los receptores H₂, mientras que, la estimulación de los receptores H₁, disminuyen la conducción auriculoventricular. El efecto de la histamina en músculo liso de estómago, bronquios e intestino, se debe a la activación de los receptores H₁ que estimulan la contracción y H₂ la relajación.

La histamina es un potente estimulante de las terminaciones nerviosas sensoriales, en especial las que modulan el dolor y el prurito por medio de los receptores H₁, estos receptores también se localizan en el SNC, su activación intensifica el estado de vigilia e inhibe el apetito.(Ookuma y col., 1993).

La histamina. se puede aislar de los sitios de inflamación poco después de la lesión, su concentración disminuye rápidamente en los primeros 60 min., de tal forma que sólo participa en la etapa temprana de la respuesta inflamatoria aguda. (Ward P. A: 1966).

b) La serotonina se forma enzimáticamente a partir del aminoácido L-triptofano por hidroxilación del anillo indol seguida de descarboxilación del aminoácido (Figura 5)

Los efectos de la serotonina al igual que los de la histamina, están mediados por una diversidad de receptores de membrana celular, produce contracción del músculo liso, es un vasoconstrictor potente excepto en músculo esquelético y corazón, donde dilata los vasos sanguíneos, produce agregación plaquetaria; y al igual que la histamina tiene acción sobre las terminales nerviosas sensoriales del dolor y la comezón.

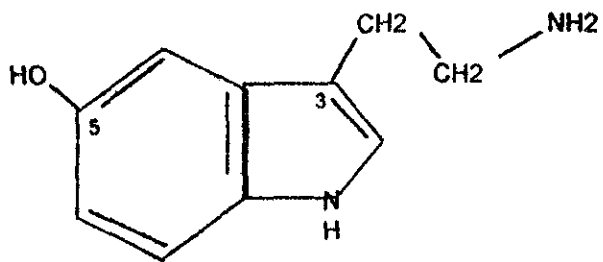


Figura 5 Estructura Química de la Serotonina
(Katzung, 1996)

1 3.1.2. Prostaglandinas.

Las prostaglandinas (PGs) son ácidos carboxílicos insaturados de 20 carbonos con un anillo de ciclopéntano. Estos compuestos han sido llamados eicosanoides junto con leucotrienos y compuestos similares derivan del ácido araquidónico, el cual es un ácido graso esencial; existen varias clases de PGs diferentes químicamente por sustitución en el anillo de ciclopentano. Las PGs de las series E y D son hidroxicetonas en tanto que las F α son 1,3-dioles y constituyen productos del metabolismo de los endoperóxidos cíclicos . Las PGs A, B, y C son cetonas insaturadas obtenidas por mecanismos no enzimáticos a partir de PGE₂, mediante métodos químicos y es poco probable que surjan como productos biológicos naturales. La PGE₂ tiene una estructura anular doble; dos ciclopentanos unidos por un puente de oxígeno entre los carbonos 6 y 9. Los tromboxanos contienen un anillo de oxano en lugar del ciclopentano. La PGI₂ y los tromboxanos también se obtienen de los endoperóxidos cíclicos (PGG₂ y PGH₂) mediante la acción enzimática de la prostaciclina sintasa y tromboxano sintasa respectivamente. (Figura 6) (Moncada 1980).

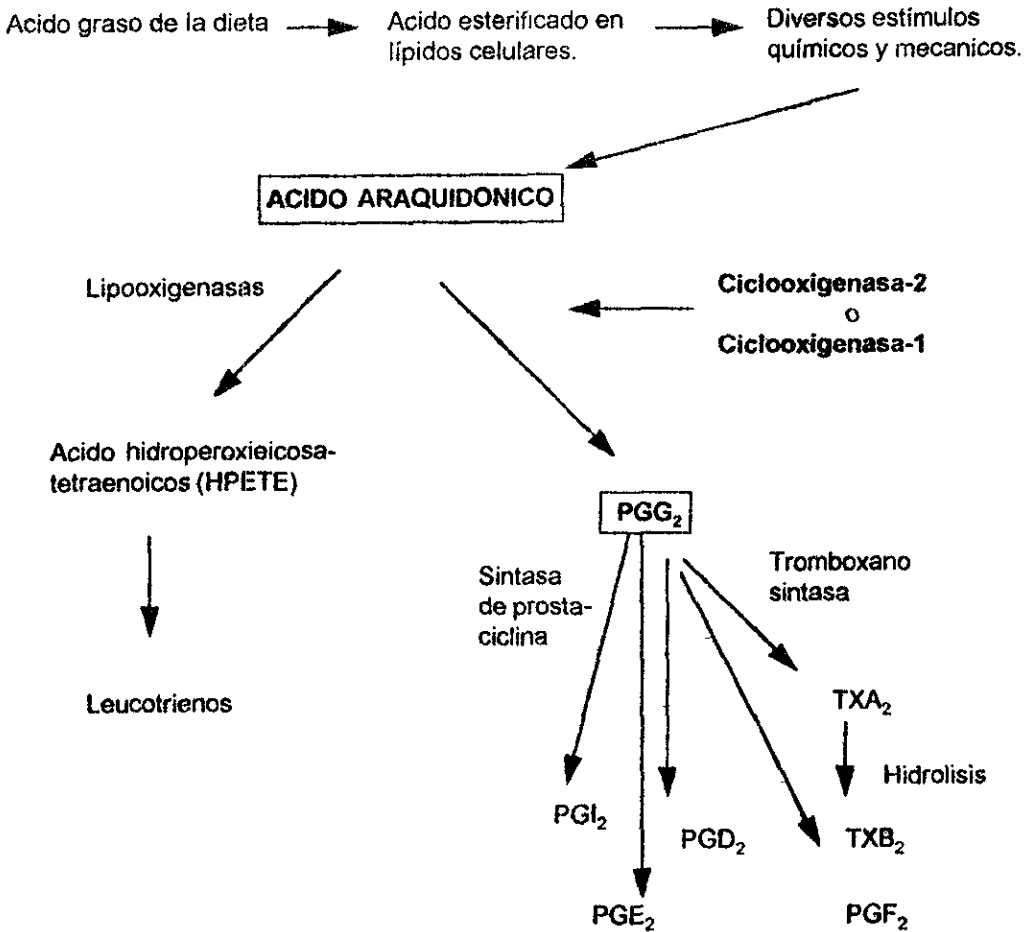


Figura 6 Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico vía ciclooxigenasa (Modificado de Griswold, 1996)

Las prostaglandinas se han detectado en casi todos los tejidos y líquidos corporales, su producción, aumenta en respuesta a diferentes estímulos, mecánicos, térmicos, químicos y bacterianos. Están relacionadas con la aparición de los signos y síntomas de la inflamación (Willis 1969) Así tenemos que la PGE₂ y PGI₂, aumentan la sensibilidad de los receptores al dolor (hiperalgesia) cuando son inyectadas en la piel de humanos, aún a dosis bajas (Ferreira 1972). la PGE₂ provoca dilatación arteriolar en mesenterio de rata y hamster (Messina 1974), PGE₁ también se relaciona con el aumento de temperatura corporal (fiebre), se han detectado altas concentraciones de ellas en el líquido cerebroespinal de gatos, junto con pirógenos que producen fiebre (Feldberg 1973), las PGE₁ y PGE₂ producen un potente edema, como consecuencia del incremento de la permeabilidad vascular (Crunkhorn 1971). Sin embargo la PGE₂ suprime la secreción de mediadores de la inflamación por células cebadas (histamina y serotonina) en las reacciones anafilácticas e inhiben la liberación de las hidrolasas y enzimas lisosomales de los neutrófilos humanos así como los macrófagos peritoneales del ratón (Moncada 1978).

Biosíntesis de las prostaglandinas:

Los eicosanoides no se almacenan en las células su biosíntesis está limitada por la disponibilidad del ácido graso precursor libre. El ácido araquidónico es liberado desde los lípidos de la membrana celular por

fosfolipasas, que son activadas por estímulos diversos y por la entrada de calcio a la célula, en respuesta la fosfolipasa A₂ se activa e hidroliza los fosfolípidos de la membrana y libera el ácido araquidónico; posteriormente el ácido es metabolizado a productos oxigenados, por las ciclooxigenasas y lipooxigenasas.

Existen dos isoformas de la ciclooxigenasa son la Cox-1 y la Cox-2, (Smith, 1992), con distinta función natural y patológica, la Cox-1 o constitutiva se encuentra en casi todos los tejidos incluyendo cerebro, bazo, riñón, hígado, pulmón, estómago y otros tejidos del tracto gastrointestinal. El nivel de Cox-1 en los tejidos es constante y particularmente alto en plaquetas (Funk y col., 1991) y células endoteliales (De Witt y col., 1983), y juega un papel importante en el mantenimiento de la homeostásis, por lo cual se le conoce como Cox constitutiva. Cox-1 participa en las funciones: vascular gástrica y renal, Cox-2 o inducida, no se encuentra normalmente en los tejidos, y es inducida por algunos factores séricos, citocinas, factores de crecimiento, hormonas y oncogenes y esta involucrada en procesos patológicos específicamente en los procesos inflamatorios. (Wiley John, 1996).

La actividad de la Cox-1 se localiza en el retículo endoplásmico, observándose poca actividad alrededor del núcleo, en contraste con ello la actividad de Cox-2 predomina alrededor del núcleo, con huellas en el citoplasma. Se ha observado que la Cox-2 in vivo puede ser sintetizada por días y hasta

semanas mientras persista el estímulo inflamatorio, por ejemplo en el daño vascular la síntesis de Cox-2 es por varios días después de iniciado el daño (Rimarachin y col.,1994). Diversos modelos de inflamación demuestran que predomina la actividad de la Cox-2.

Las ciclooxigenasas tienen dos funciones enzimáticas: una de sintetasa de endoperóxido que oxigena y produce una estructura en anillo en el ácido araquidónico libre para formar el endoperóxido cíclico de PGG₂ y PGH₂, y otra actividad de peroxidasa que transforma PGG₂ en PGH₂ (Appleton y col., 1994). Estas dos reacciones son realizadas por la misma enzima pero son activadas en sitios catalíticos diferentes. La actividad de la Cox puede ser modulada por productos del metabolismo del ácido araquidónico, el hidroperóxido 15-HPETE puede estimular la Cox a bajas concentraciones e inhibirla a altas concentraciones (Warso y Lands, 1983).

A diferencia de la ciclooxigenasa de los ácidos grasos, que tienen amplia distribución, las lipoxigenasas sólo se han encontrado en el pulmón, plaquetas y glóbulos blancos. Los compuestos formados por estas enzimas incluyen: ácido 12 hidroperoxiaraquidónico (HPETE) y su producto, ácido 12 hidroxiaquidónico (HETE) (Figura 6) que es quimiotáctico para leucocitos polimorfonucleares macrófagos alveolares, como son compuestos que se han identificado en exudados inflamatorios, se cree que participan en el proceso de invasión celular durante la inflamación. Otro producto del metabolismo del ácido araquidónico

puede ser la sustancia lenta de la anafilaxia, que se forma por adición de glutatión a un epóxido intermediario inestable (leucotrieno A) durante la formación de los metabolitos dihidroxilados del ácido araquidónico. Por lo antes mencionado, se considera a las prostaglandinas como potentes mediadores químicos de la inflamación aún cuando algunas de ellas ejercen efectos antiinflamatorios, como PG E₂ y PG A₂ que inhiben la liberación de enzimas lisosómicas de los leucocitos y PG E₁ y PG E₂ inhiben la liberación de histamina por antígeno de los basófilos asociada con IgE.

1.3.1.3. Componentes lisosomales:

Los efectos inflamatorios causados por productos lisosomales se resumen en la siguiente lista:

Proteínas catiónicas:

- Incremento de la permeabilidad vascular
- Factores independientes de la liberación de histamina
- Factores dependientes sobre la degranulación celular
- Quimiotaxis de fagocitos mononucleares
- Factor de inmovilización de neutrofilos , proteasa ácidas
- Degradación de membrana basal etc. (pH ácido)
- Liberación de leucoquinina del plasma, proteasa neutrales
- Degradación de colágeno, elastina, cartílago y fibrina
- Generación de fragmentos quimiotácticos de C3 y C5
- Liberación de cinina a partir de cininógeno del plasma
- SH- dependiente de proteasas
- Incremento en la permeabilidad vascular
- Liberación de leucogresina de IgG

Como se puede observar en la lista anterior los productos lisosómicos de los neutrófilos participan en la respuesta inflamatoria de diversas maneras. Sea como sea el contenido de los lisosomas contribuye a la evolución de la reacción ya que los neutrófilos se acumulan en etapa muy temprana en los focos de inflamación.

En las tablas 2 y 3 se mencionan otros factores que intervienen en el proceso inflamatorio, algunos como factores quimiotácticos específicos de linfocitos, que como ya he mencionado son las células protectoras del organismo, por otro lado entre los mediadores químicos los más importantes son las prostaglandinas ya que son las responsables de mantener el proceso inflamatorio, por lo que el estudio de nuevos principios activos están encaminados a encontrar fármacos antiinflamatorios que actúen a nivel de las PGs, los fármacos antiinflamatorios en uso actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, sin embargo tienen diversos efectos adversos, (como se explica posteriormente),

1 3.2. Mediadores químicos de origen plasmático

Este grupo incluye mediadores químicos tales como: los del sistema del complemento, el sistema de las cininas y el sistema de la coagulación, como se muestra en la tabla 3.

Las lesiones tisulares, reacciones alérgicas, infecciones por virus y otros trastornos inflamatorios activan una serie de reacciones proteolíticas que generan polipéptidos que contienen de 8 a 12 unidades de aminoácidos en secuencia lineal, como son la bradicinina que es un nonapéptido y la calidina que es un decapeptido (figura 7) (Wachtfogel y col., 1993). El endotelio de los vasos se ve modificado por el daño tisular, provocando que la colágena quede expuesta, esto es suficiente para activar el factor XII (Factor Hageman), éste también se activa por la acción de la precalicreína y del cininógeno de alto peso molecular.

Una vez activado el factor Hageman participa en: la coagulación (activación del factor XI), en el sistema fibrinolítico (activación del plasminógeno) y en la activación de la precalicreína. La precalicreína se convierte en calicreína plasmática la que a su vez actúa como una cininogenasa sobre los cininógenos de alto peso molecular (HMWK), mientras que la calicreína tisular actúa sobre ambos cininógenos bajo (LMWK) y alto peso molecular, liberándose así bradicinina y calidina, las cininas son rápidamente degradadas por cininasas a péptidos inactivos (figura 5) (Proud y Kaplan, 1988).

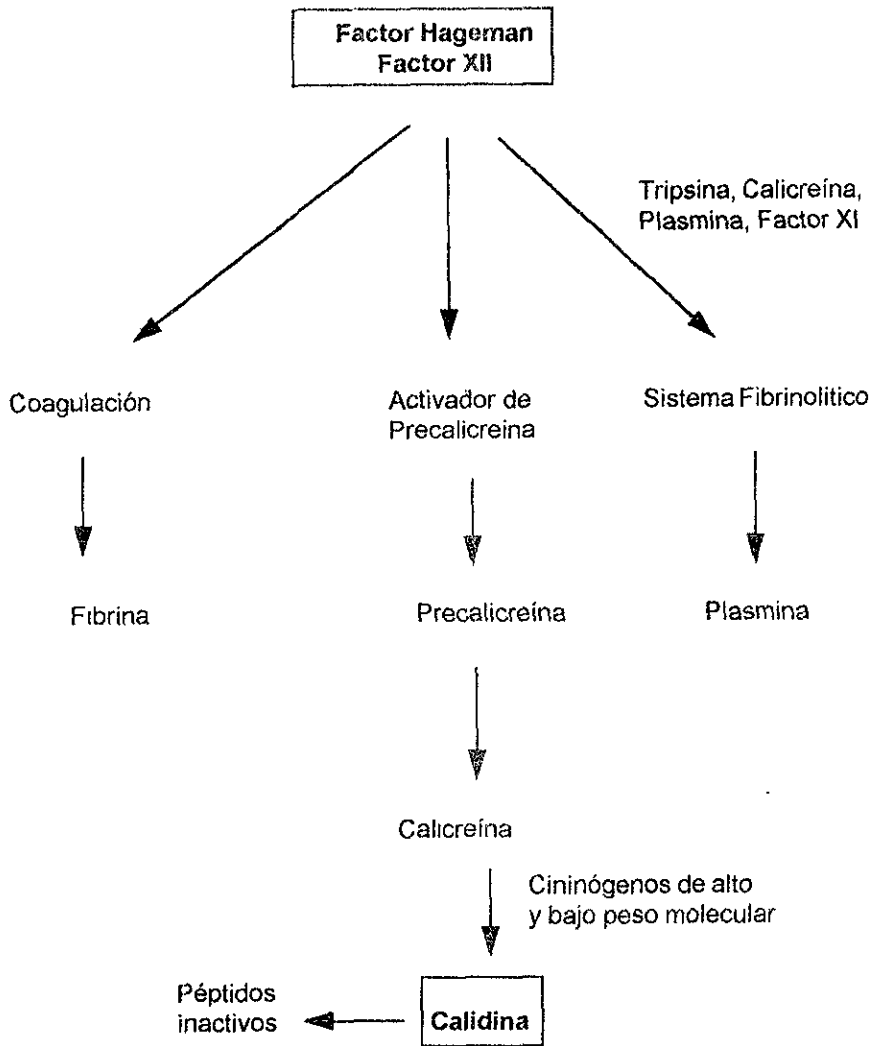


Figura 7 Formación de las cininas
(Modificado de Kiluepper, 1970)

La bradicinina en muy bajas dosis causa:

- a) Contracción lenta del músculo liso intestinal, uterino y bronquial.
- b) Dilatación de vasos sanguíneos sistémicos.
- c) Dolor en el sitio de la inflamación o cuando son administradas por vía parenteral.
- d) Aumento de la permeabilidad vascular.
- e) Eritema y pápula en el sitio de la inflamación o cuando se administran por vía intradérmica.

Se conocen dos receptores de las cininas: los B₁ y B₂. Los receptores B₁ regulan la contracción del músculo liso vascular, (Dray, 1993). Durante situaciones de estrés, como traumatismos, presión tisular o inflamación pueden predominar los efectos sobre los receptores B₁, que en células de inflamación, como macrófagos, pueden desencadenar la producción de los mediadores inflamatorios como la interleucina (IL-1) y el factor alfa de necrosis tumoral (TNF).

Los receptores B₂ modulan la contracción del músculo liso (útero de rata, íleon de cobayo, músculo traqueobronquial); la vasodilatación, el aumento de la permeabilidad capilar, promoción de la acumulación y migración de leucocitos, producción del dolor y estimulación de la síntesis de prostaglandinas.(Dray, 1993)

Sistema del complemento.

El complemento está formado por un sistema de 20 proteínas, algunas son precursores enzimáticos, las principales son 11 proteínas denominadas C1 a C9, B y D, todas están presentes en el plasma, son solubles cuando están inactivas y son moléculas sólidas al adherirse a las membranas de gérmenes o células que deben atacar, se activan de tres formas:

1) vía clásica 2) vía alternativa y 3) vía plaquetaria.

Vía clásica:

La vía clásica se activa por la reacción antígeno-anticuerpo, es decir cuando un anticuerpo se une a un antígeno se activa un lugar reactivo específico de la porción constante del anticuerpo y esto lo une directamente con la molécula de C1 del sistema del complemento, dando la cascada de reacciones secuenciales, (figura 8), comenzando con la activación de la proenzima C1. Se forman múltiples productos finales, varios de los cuales provocan importantes efectos que ayudan a evitar que el microorganismo invasor o la toxina causen lesiones; entre los efectos más importantes se encuentran los siguientes:

a) Opsonización y fagocitosis. El C3b activa la fagocitosis de neutrófilos y macrófagos.

b) Lisis. Otro producto de la cascada del complemento es el complejo lítico que se designa como C5b6789, tiene efecto directo de romper las membranas celulares de las bacterias o de otros microorganismos celulares.

c) Aglutinación. Otros productos alteran la superficie de los microorganismos haciendo que se adhieran entre sí.

d) Neutralización de los virus. Las enzimas del complemento y otros productos de éste pueden atacar las estructuras de algunos virus, haciéndoles perder su virulencia.

e) Quimiotaxis. El fragmento C5a provoca la quimiotaxis de los neutrófilos y de los macrófagos provocando así su migración.

f) Activación de mastocitos y de los basófilos. Los fragmentos C3a, C4a y C5a activan a los mastocitos y a los basófilos haciéndoles liberar histamina, heparina y otras sustancias a los líquidos locales.

g) Efectos inflamatorios. Varios productos del complemento contribuyen a la inflamación local. Hacen que el flujo sanguíneo aumente todavía más, incrementando la pérdida de proteínas por los capilares, y se coagulan las proteínas en los espacios tisulares, evitando así el movimiento de microorganismos invasores a través de los tejidos.

VIA CLASICA

VIA ALTERNA

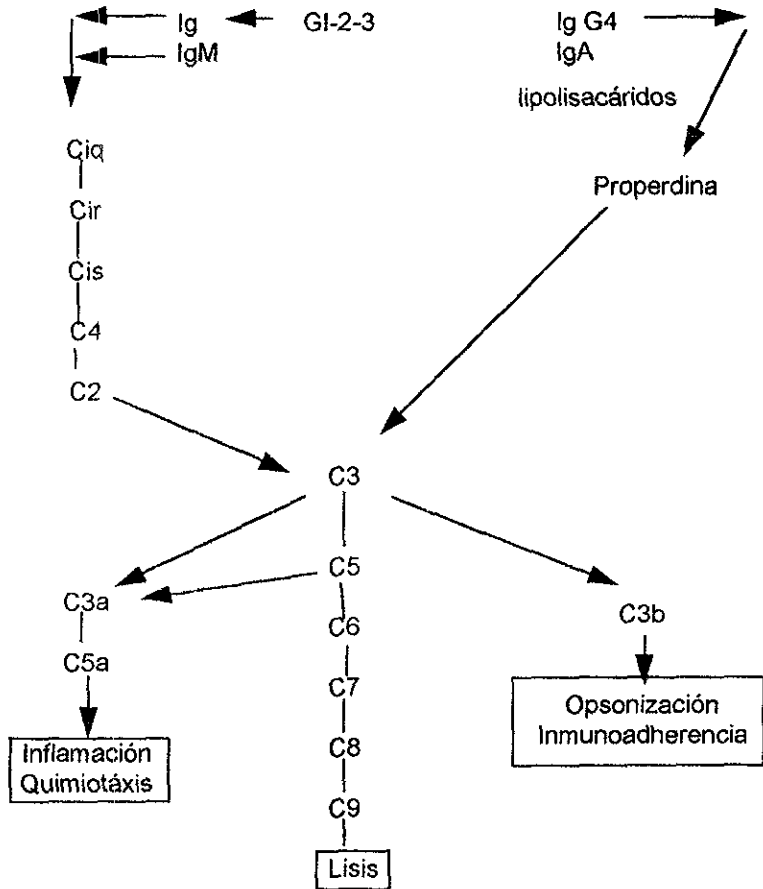


Figura 8 Sistema del Complemento. El C3 constituye el núcleo de la llamada activación. De C5 a C9 se integra la unidad de ataque que perfora la membrana celular y produce lisis de la célula o germen (Rojas, 1996)

Vía alterna.

La vía alternativa se activa en respuesta a moléculas grandes de polisacáridos en las membranas celulares de algunos microorganismos invasores. Estas moléculas reaccionan con los factores B y D del complemento, formando un producto que activa al factor C3, activando el resto de la cascada del complemento. De este modo se forman casi todos los productos finales del sistema de la vía clásica, provocando así los mismos efectos antes mencionados para proteger el organismo frente a cualquier invasor.

Vía plaquetaria.

La tercera vía de activación del sistema del complemento es la de más reciente descubrimiento, su importancia radica en que acelera el proceso de coagulación, e incrementa la liberación de mediadores de la inflamación almacenados en las plaquetas (figura 9), en la activación del sistema de la coagulación se produce trombina, ésta se une a las plaquetas, el complejo así formado trombina-plaquetas genera una actividad de esterase para el factor C3, que al ser activado actúa sobre C5 y de ahí en adelante sobre los otros factores hasta C9, de esta forma resulta lesión en plaquetas, que facilitan la liberación de otros factores necesarios para la coagulación y para los procesos de inflamación.

Las funciones del complemento se pueden resumir como sigue: La C2 cinina induce la liberación de histamina por parte de las células cebadas y tiene acción vasodilatadora. Las fracciones C3a y C5a promueven también la liberación de histamina, poseen una acción quimiotáctica para los neutrófilos, eosinófilos y monocitos, aumentan la permeabilidad vascular. El complejo C 567 tiene acción quimiotáctica sólo para neutrófilos, y la función final de la activación de complemento es la lisis de la bacteria o célula sobre la cual se activo el sistema.

El sistema de coagulación: los fibrinopéptidos (liberados de moléculas de fibrina por acción de la trombina (durante la coagulación) son potentes mediadores inflamatorios, aumentan el efecto de la bradicinina sobre el músculo liso, inducen filtrado vascular y causan quimiotaxis de neutrófilos (Stecher1972). Durante la proteólisis de la fibrina por plasmina se liberan fragmentos plasmáticos, llamados productos de degradación de fibrina; los cuales aumentan la permeabilidad vascular en piel y son quimiotácticos para neutrófilos (Stecher 1972). La formación de mediadores como los fibrinopéptidos y degradación de productos de fibrina, contribuyen a la inflamación en ciertas enfermedades que son inhibidas por el uso de anticoagulantes, por ejemplo ciertos daños glomerulares (Cohen 1967).

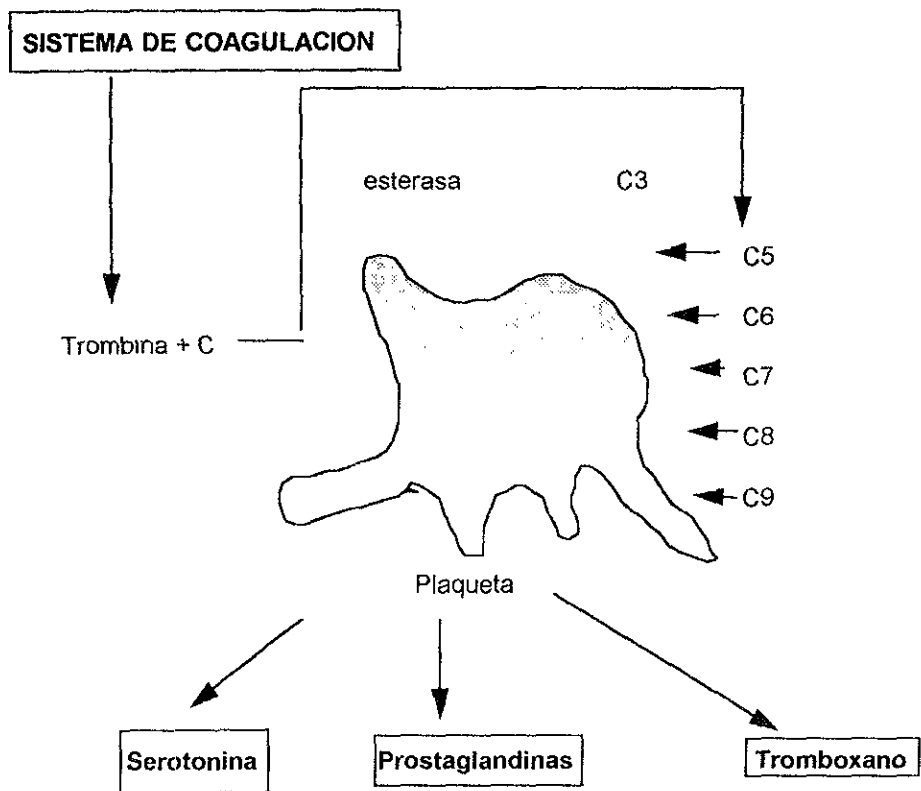


Figura 9 Activación del sistema de coagulación por la vía plaquetaria

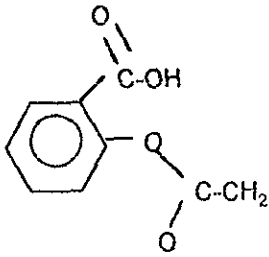
2 FARMACOS ANTIINFLAMATORIOS

Como se ha mencionado en la reacción inflamatoria se ponen en movimiento una serie de mecanismos que en medida de lo posible eliminan el agente agresor y reconstituyen el tejido dañado, la intensidad de la reacción inflamatoria va a depender de las características del agente y del estado reaccional del organismo, sin embargo, en algunas ocasiones los mecanismos homeostáticos del organismo para protegerse pueden llegar a alterarse, transformándose en una respuesta inflamatoria desmedida, lo cual ocasiona que los signos y síntomas sean muy intensos y en estos casos hay necesidad de atenuar o evitar estos síntomas y para ello se utilizan los fármacos antiinflamatorios, el tratamiento de los pacientes con fármacos antiinflamatorios incluye dos objetivos principales: el alivio del dolor, el cual constituye el síntoma de queja continua del paciente y la disminución o suspensión del proceso lesivo tisular

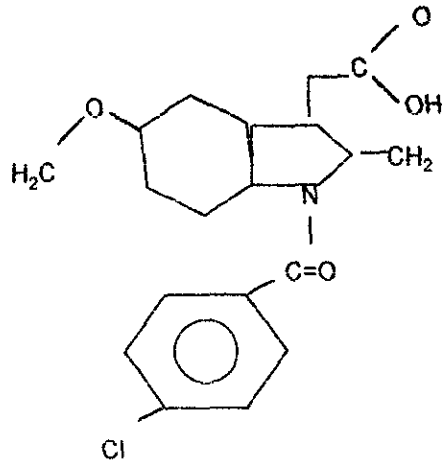
Los fármacos antiinflamatorios más utilizados se clasifican en dos grandes grupos químicos:

A) No. esteroidales como son: el ácido acetil salicílico, ibuprofén, indometacina, naproxen, diclofenac, keterolac, oxicam, etc.(Figura 10) (Hardman Joel y col., 1996)

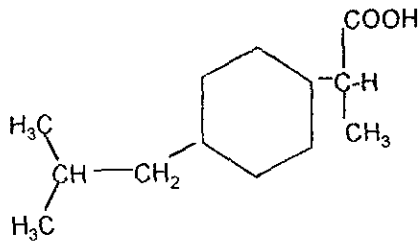
B) Esteroidales: dexametasona, cortisona, hidrocortisona, prednisona y prednisolona (Hardman Joel y col. 1996).



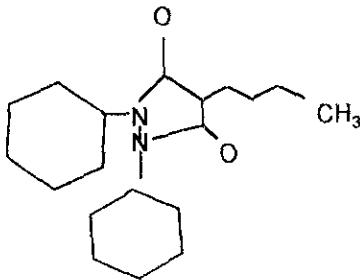
ACIDO ACETISALICILICO



INDOMETACINA



IBUPROFEN



FENILBUTAZONA

Figurta 10 Antiinflamatorios no esteroides
(Hardman, 1996)

2.1. Antiinflamatorios no esteroideos.

Esté grupo incluye diversos compuestos con poca relación química aunque casi todos son ácidos orgánicos, sin embargo comparten, mecanismos de acción, usos terapéuticos y efectos colaterales. El compuesto prototipo es el ácido acetil salicílico (aspirina) (tabla 6). A este grupo también se le conoce como analgésicos antipiréticos.

Tabla 6 Clasificación química de los antiinflamatorios no esteroideos.
(Katzung, 1996)

Derivados del ácido salicílico	Ac. acetil salicílico, salicilato de sodio, trisalicilato de magnesio y colina, salsalato, diflunisal, sulfasalazina, olsalazina
Derivados del para-aminofenol	Acetaminofén
Indol y ácidos indenacéticos	Indometacina, sulindac, etodolac
Acidos heteroarilacéticos	Tolmetin, diclofenac, keterolac.
Acidos arilpropiónicos	Ibuprofeno, naproxeno, flurbiprofeno, ketoprofeno, fenoprofeno, oxaprozina
Acidos antranílicos(fenamatos)	Acido mefenámico, ácido meclofenámico
Acidos enólicos	Oxicam (piroxicam, tenoxicam), pirozalidindionas(fenilbutazona, oxifenbutazona)
Alcanonas	Nabumetona

Mecanismo de acción:

Tienen un mecanismo de acción semejante, se considera que está estrechamente relacionado con la inhibición de la biosíntesis y liberación de prostaglandinas, que como ya se mencionó participan como mediadores químicos del proceso inflamatorio.

En 1971. Vane y col. y Smith y Willis, demostraron que concentraciones bajas de aspirina y/o indometacina inhibían la producción enzimática de las prostaglandinas lo cual se demostró simultáneamente en tres sistemas diferentes: homogenizados libres de células de pulmón de cobayo, bazo de perro perfundido y plaquetas humanas. (Ferreira y col, 1971, Smith y Willis, 1971 y Vane 1971).

Existen actualmente numerosos sistemas in vivo e in vitro en los que se ha demostrado la inhibición de la biosíntesis de las prostaglandinas por los antiinflamatorios no esteroideos, sin embargo no inhiben la formación de leucotrienos los cuales también contribuyen a la inflamación. El principal efecto terapéutico de los fármacos no esteroideos está relacionado con su capacidad para inhibir a la Cox, que como ya se mencionó es la enzima que cataliza la conversión del ácido araquidónico en prostaglandinas, también inhiben la adherencia de granulocitos a la vasculatura dañada, estabilizan los lisosomas e inhiben la migración de polimorfonucleares y macrófagos hacia el sitio lesionado e inhiben la agregación plaquetaria secundaria a la inhibición de la síntesis de tromboxano.

Los fármacos no esteroideos inhiben de manera no selectiva las isoformas de Cox-1 y Cox-2 o poseen una pequeña selectividad por la isoforma Cox-1, una excepción es la nabumetona, que inhibe sobre todo a Cox-2.(figura 11)

Cuando se emplean como analgésicos estas drogas sólo son efectivas contra el dolor de intensidad baja a moderada, generalmente el asociado con la inflamación, ya que al inhibir la síntesis y la liberación de prostaglandinas en el sitio de inflamación, evitan la sensibilización de los nociceptores a la estimulación mecánica de otros mediadores, lo cual explica porqué las drogas tipo aspirina son poco eficaces como analgésicos en tejidos no inflamados

El efecto antipirético se presenta porque la fiebre es consecuencia de la producción de PGS (PGE₂) en el hipotálamo en respuesta a pirógenos bacterianos. (interleucina-1) y pirógenos exógenos producto de los macrófagos durante la inflamación. Los antiinflamatorios tipo aspirina bloquean la producción de PGS inducida por pirógenos como la respuesta del sistema nervioso central a la interleucina-1, y de aquí que se pueda restituir el control de la temperatura en el hipotálamo.(Katzung, 1995).

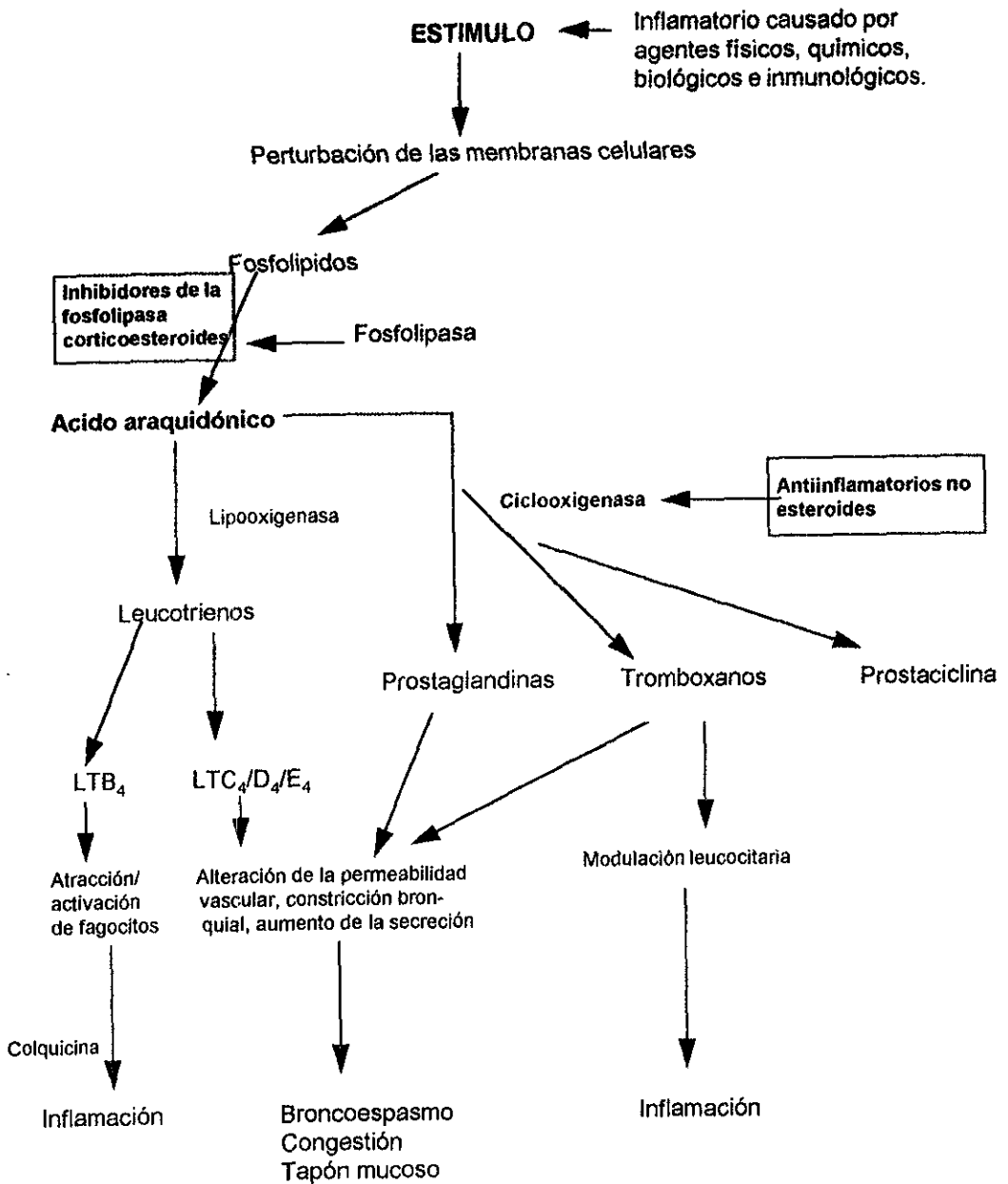


Figura 11 Medidores derivados del ácido araquidónico y sitios de acción de los fármacos (katzung, 1996)

Efectos adversos.

Todos los analgésicos no esteroideos con excepción de los derivados del para-aminofenol causan efectos colaterales en vías gastrointestinales. que van desde dispepsia leve y pirosis hasta úlceras de estómago y duodeno, que a veces puede acompañarse de anemia secundaria por la pérdida de sangre por el tubo digestivo. Otros efectos adversos son: alteran la función plaquetaria debido a que estos fármacos evitan la formación de tromboxano A₂ por parte de las plaquetas por lo cual resulta un aumento en el tiempo de sangrado; disminuyen la corriente sanguínea por riñones y la filtración glomerular en pacientes con insuficiencia congestiva cardiaca, cirrosis hepática y ascitis, con nefropatías crónicas y en pacientes hipovolémicos, también estimulan la retención de sodio y agua lo cual puede originar edema en el paciente; por otro lado estimulan la resorción de potasio como consecuencia de la menor disponibilidad de sodio en las zonas distales de los túbulos.

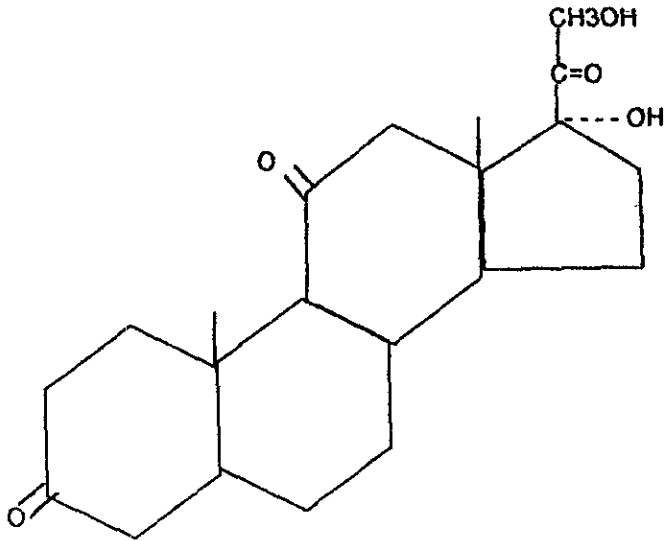
Del 20 al 25% de los pacientes de edad media que reciben tratamiento con analgésicos no esteroideos, manifiestan síntomas que van desde rinitis vasomotora con abundante rinorrea, edema angioneurótico, urticaria generalizada y asma bronquial, hasta edema laríngeo y broncoconstricción, hipotensión y choque, éste síndrome no es frecuente en niños y puede surgir en los pacientes aún cuando reciben dosis pequeñas (menos de 80 mg) de aspirina.

2.2. Antiinflamatorios esteroidales

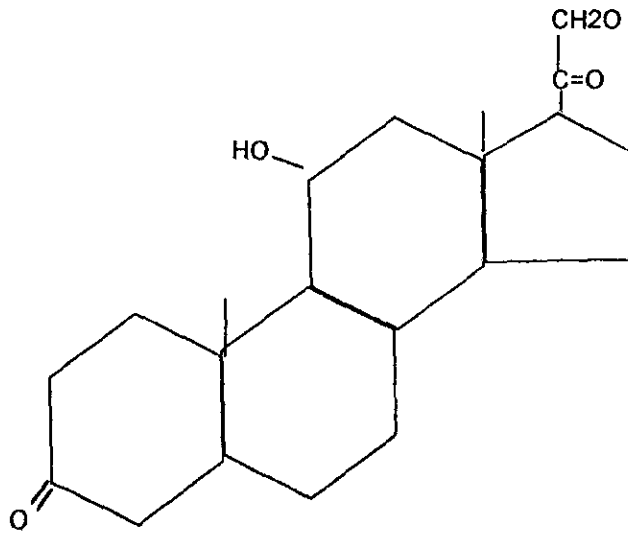
Los fármacos esteroidales más utilizados son: Dexametasona, Cortisona, Hidrocortisona, Prednisona y Prednisolona (Figura 12 y 13) Goodman y Gilman, 1996).

Mecanismo de acción:

Los corticoesteroides, como otras hormonas esteroides, actúan controlando la síntesis de proteínas, reaccionan con proteínas receptoras en el citoplasma de las células sensibles formando un complejo esteroide-receptor, que sufre un cambio de conformación, después el complejo se traslada al núcleo, donde se une a la cromatina. La información transportada por la proteína receptora, dirige al aparato genético hacia la transcripción del ácido ribonucleico, en esta forma las hormonas esteroides estimulan la transcripción y en último término la síntesis de proteínas específicas.

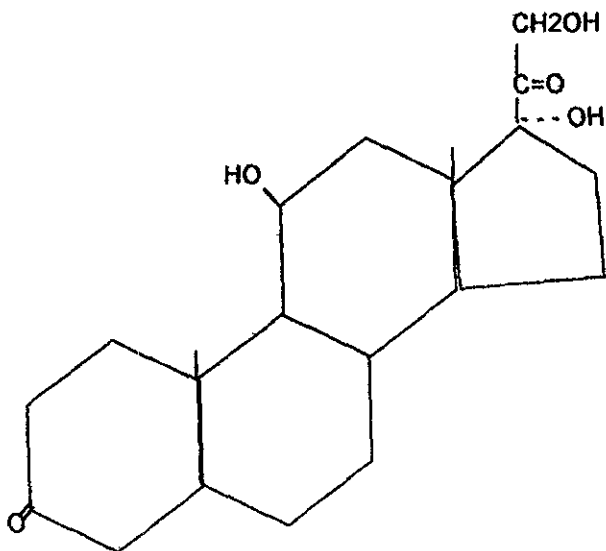


CORTISONA

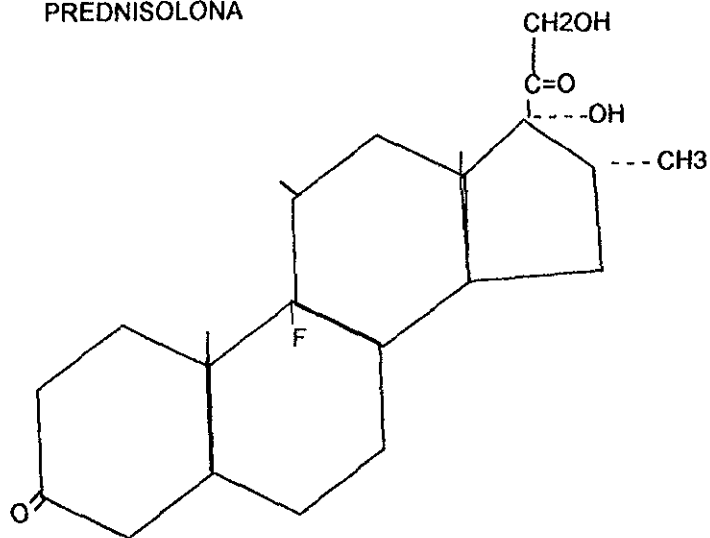


HIDROCORTISONA

Figura 12 Estructura química de algunos fármacos esteroidales (Hardman, 1996)



PREDNISOLONA



DEXAMETASONA

Figura 13 Estructura química de algunos fármacos esteroidales (Hardman, 1996)

La corticotropina, el cortisol y los análogos sintéticos del cortisol impiden o reprimen la producción de calor local, enrojecimiento, tumefacción e hipersensibilidad, signos con los que se manifiesta la inflamación a la observación microscópica (edema, depósito de fibrina, dilatación capilar, inmigración de fagocitos en el área inflamada y actividad fagocítica) y también las manifestaciones finales (proliferación capilar, proliferación de fibroblastos, depósitos de colágena y aún cicatrización). Además es inhibida la síntesis de algunos mediadores químicos como la histamina; por otro lado el número de linfocitos T y B se ve disminuido. En concentraciones farmacológicas estabilizan por acción directa las membranas de los lisosomas impidiendo la destrucción y con ello la liberación de fermentos líticos que serían los factores responsables para la reacción inflamatoria o lisis celular, también inhiben la generación de cininas, inhiben la respuesta leucocitaria y la respuesta inmunitaria.

La actividad antiinflamatoria de los fármacos esteroidales se debe a que:

1. Inhibe los fenómenos vasculares: vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular.
2. Inhibe la diapédesis y la quimiotaxis.
3. Disminuye o aumenta el daño tisular, esto depende de la naturaleza del agente causal, así como la intensidad de la inflamación.

4. Estimulan la síntesis de lipocortina, proteína que inhibe a la fosfolipasa A2, esto disminuye la liberación de ácido araquidónico y la síntesis de sus metabolitos: prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos.
5. Inhiben a la sintasa de óxido nítrico.
6. Inhiben la transcripción de las citocinas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8 y TNF; esto a su vez inhibe la expresión de moléculas de adhesión como: ICAM-1 y E-selectinas (Barnes, 1993).

Toxicidad de los antiinflamatorios esteroidales.

Los efectos tóxicos se deben a su: supresión y al uso continuo de grandes dosis, las reglas para suspender la terapia corticoesteroides en pacientes sujetos a terapéutica supresiva han sido descritos por Harter y col. 1963 y Byny 1976, existe un síndrome característico por retiro de corticoesteroides que consiste en fiebre, mialgia, artralgia y malestar general, también se puede presentar, aunque rara vez el pseudo tumor cerebral con papiledema (Levine y Leopold, 1973), el uso continuo durante días o semanas no produce insuficiencia adrenal al cesar el tratamiento, pero el tratamiento prolongado con corticoesteroides puede provocar supresión de la función hipofis - suprarrenal con lento retorno a la normalidad, trastornos de balance hídrico y de electrolitos, hiperglucemia y glucosuria, mayor susceptibilidad a las infecciones, incluso la tuberculosis, úlceras pépticas que pueden sangrar o perforarse, osteoporosis, una miopatía característica, disturbios

de la conducta, cataratas subcapsulares posteriores, detención del crecimiento y síndrome de Cushing, que consiste en "cara de luna llena", "cuello de búfalo" agrandamiento de almohadillas adiposassupraclaviculares, " obesidad central", estrias, equimosis, acné e hirsutismo, este síndrome también se presenta cuando hay una hiperfunción de las glándulas suprarrenales, La alcalosis hipopotasémica y el edema se presentan con poca frecuencia en pacientes tratados con corticoesteroides sintéticos, la glucosuria puede tratarse, generalmente con dieta y/o insulina, y su aparición no debe ser un factor importante en la decisión de continuar con el tratamiento de corticoesteroides o de iniciarlos en los pacientes diabéticos; la úlcera péptica es una complicación ocasional del tratamiento con corticoesteroides, la frecuencia de la hemorragia y de perforación en estas úlceras las convierten en graves problemas terapéuticos, Fenster 1973, la miopatía, caracterizada por la debilidad de la musculatura proximal de brazos y piernas y de músculos asociados a la pelvis, se vé ocasionalmente en pacientes que toman grandes dosis de corticoesteroides, puede producirse poco después de comenzar el tratamiento y ser suficientemente severa para impedir la deambulaci3n, no es específica de los análogos sintéticos porque se presenta en el síndrome end3geno de Cushing, sin embargo, es una complicaci3n seria y una indicaci3n para el retiro del tratamiento, la recuperaci3n puede ser lenta o incompleta. Los trastornos de conducta pueden tomar diferentes formas, por

ejemplo nerviosismo, insomnio, cambios del estado de ánimo o del psiquismo y psicopatologías del tipo maniaco-depresivas o esquizofrenia.

Se han observado cataratas subcapsulares posteriores en niños que reciben tratamiento con corticoesteroides, de igual forma se presenta en pacientes con artritis reumatoidea que reciben 20 mg. de prednisona por día durante 4 años según lo investigado por Levine y Leopold 1973; los glucocorticoides parecen inhibir las actividades de los osteoblastos en forma directa y por su inhibición de la absorción de calcio por el intestino, aumenta la secreción de hormona paratoidea, que estimula la actividad de los osteoclastos, resultando así la osteoporosis, la cual es una indicación para el retiro del tratamiento, una consideración importante al iniciar y continuar el tratamiento con corticoesteroides es la posibilidad de osteoporosis especialmente en mujeres postmenopáusicas.

Usos terapéuticos.

Los glucocorticoides se emplean: en el tratamiento de insuficiencia suprarrenal aguda y crónica hiperplasia suprarrenal congénita (la actividad de una entre varias enzimas requeridas para la síntesis de corticoesteroides es deficiente) y en estados inflamatorios y alérgicos como son en : artritis reumatoide, carditis reumática, poliartritis nodosa y granulomatosa, fiebre del

heno, enfermedad del sueño. urticaria, dermatitis por contacto, reacciones a drogas, picaduras de avispa, edema anginourótico, anafilaxia, asma bronquial, enfermedades oculares (inflamación del ojo), edema cerebral.

No es posible definir la dosis exacta de glucocorticoides que puede producir supresión hipofisaria y adrenocortical en un paciente dado, pues las variaciones son considerables; en general cuanto mayor es la dosis y más prolongado el tratamiento, mayor es la posibilidad de supresión.

En el caso de hipofunción, padecimiento conocido como enfermedad de Addison, se caracteriza por síntomas gastrointestinales, anemia, debilidad, piel bronceada e hipotensión los cuales se presentan también cuando se retiran bruscamente altas dosis de corticoesteroides.

En base a lo anterior nos podemos dar cuenta que, los fármacos antiinflamatorios utilizados en clínica, tienen su utilidad terapéutica limitada, por sus efectos adversos, principalmente los observados sobre el aparato gastrointestinal, además de ocasionar lesiones severas, como erosiones gástricas y pérdida de sangre, así mismo sabemos que la inhibición de la COX-1 ocasiona efectos colaterales no deseados; por tal motivo se justifica el estudio para

descubrir nuevos fármacos que sean más selectivos en su acción antiinflamatoria con menos efectos secundarios.

Actualmente tiene un gran auge la "Fitoterapia"; tratar diversas enfermedades a través de las partes activas de las plantas, como anteriormente he descrito los efectos secundarios que traen consigo la toma sistemática de medicamentos son los que han hecho que la gente se incline más por el uso de plantas, que desde siempre se han utilizado. Por ejemplo para evitar el insomnio se utiliza la valeriana y espinos albar, para la falta de apetito la espirulina, para las hemorroides y várices el castaño de indias, como diurético el diente de león; en padecimientos inflamatorios han sido utilizadas diversas plantas como son: el tejocote, linaza, capulín, ciprés, vid coral y varias especies de áloe (sábila).

Las investigaciones actualmente están encaminadas a encontrar nuevos antiinflamatorios con efectividad terapéutica y menores efectos colaterales. La planta que ocupó nuestro interés es el Aloe variegata conocida como sábila. En México y en otros países se extrae el gel del aloe para la preparación de pomadas y cremas que ayudan a cicatrizar heridas, quemaduras y en general ulceraciones de la piel, ronchas, acné y otras afecciones cutáneas. (Reynolds, 1986).

3 ALOE

3.1 Historia.

Se dá el nombre de áloe o acíbar, a la sustancia de la evaporación del jugo concentrado de varias plantas del género *Alce*, tal nombre deriva del árabe *alloe* o del hebreo *halal* que significa sustancia brillante y amarga; el áloe es conocido desde hace siglos en la época de los griegos hacia el siglo IV A.C.; los reportes señalan que fué Alejandro Magno quien ordenó a los colonos griegos preservar y cultivar la planta. Los griegos y los romanos usaban el áloe mezclándolo con cardenillo, azafrán y otras sustancias, en forma de colirios, que entonces eran masas sólidas destinadas a ser introducidas en alguna cavidad, posteriormente fue conocido en Inglaterra en el siglo X. Los acíbares socotrina y de zanzibar fuerón durante muchos años los únicos comerciales, pero en la actualidad han sido reemplazados por las variedades del Cabo y Curacao que son las principales zonas de producción, sumándose a ellos Venezuela y Curacao.

En zonas rurales de México se utiliza el áloe en el tratamiento de: heridas de la piel, inflamaciones, paperas, dolor de muelas erisipela y laxante, en algunos casos se utiliza la hoja abierta de áloe asada y en otros se extrae la pulpa.

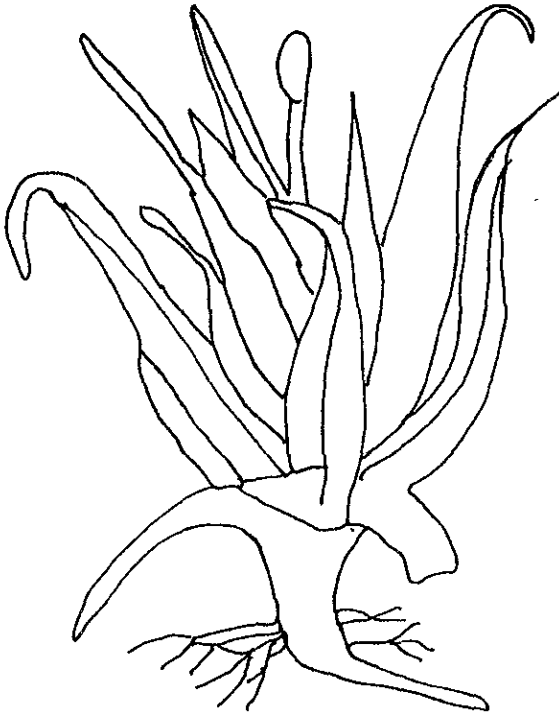


Figura 14 *Aloe variegata* (Miller 1980).

3.2 Clasificación y origen de la planta

El Aloe sp. comunmente es llamado sábila, se clasifica dentro de la familia de las lileaceas, su género es Aloe, del cual se conocen aproximadamente de 150 a 170 especies, es originaria de Africa Meridional y Oriental, actualmente su cultivo se ha esparcido por el resto del continente Africano, Europa, Asia y América, por lo que es una planta cosmopolita aclimatada a regiones cálidas y templadas

3.3. Descripción botánica.

El Aloe es una planta que llega a medir hasta 80 cm. de alto, sus hojas son carnosas, alternas, colocadas como rosetas, mucilaginosas, espinudas dentadas en los bordes, de color verde que cambia a rojizo en los últimos periodos de vida, tienen manchas blancas colocadas paralelamente en dirección del eje de la hoja, las cuales desaparecen cuando la hoja ha llegado a su completo desarrollo y las espinas de la base se atrofian. mientras que las demás se endurecen y toman un tamaño considerable (figura 14)).(Grindlay y Reynolds, 1986).

Las flores se presentan en racimos o paniculos axilares, con seis pétalos unidos a un tubo, de color verde amarillento, seis estambres, ovario trilocular con

varios ovulos en cada celda y fruto capsulado. La raíz es cilíndrica, fibrosa e insípida, está provista de numerosas raicillas que se introducen profundamente en el suelo. La planta es recolectada en marzo y abril, son colocadas con el extremo cortado hacia abajo en un cajón de madera en forma de "V", inclinada de manera que el zumo se evapora y cuando tiene la consistencia adecuada, se vierte en latas, en donde se deja endurecer y de esta forma es como se expende en el comercio.

3.4. Composición Química.

Los compuestos químicos que se han aislado son:

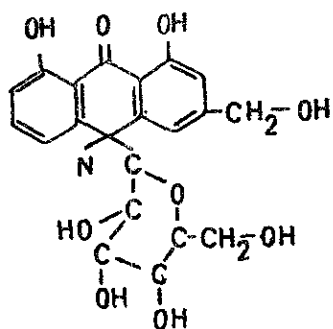
- 1) Glucósidos antraquinónicos llamados aloinas, como: barbaloina, isobarbaloina y nataloina. (figura 15).
- 2) Esencia
- 3) Resina

Las aloinas fueron obtenidas principalmente por T. y H. Smith de Edimburgo a partir de acíbar de los Barbados, en 1957. La barbaloina el principal glucósido cristalizado, se encuentra en todas las variedades comerciales. Leger 1907 demostró que por calentamiento a unos 160° C se convierte parcialmente en beta barbaloina amorfa. De esta sustancia se ha afirmado que no existe en la

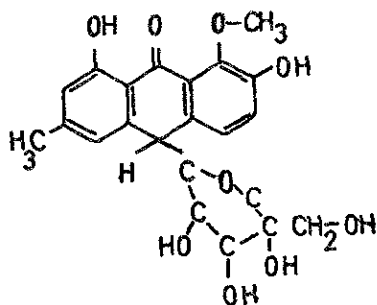
variedad de Curacao, pero que se halla a la concentración de alrededor del 8 % en el acíbar del cabo. Un tercer glucósido, la isobarbaloina, se encuentra en el acíbar de Curacao, en menores cantidades en el de el Cabo y no lo contienen los acíbares del este de Africa. Los ensayos de la isobarbaloina son por ello frecuentes para la distinción de una variedad a otra.

Las variedades de acíbar dan una fuerte fluorescencia verdosa con bórax y con un pH ácido, que es una característica de los antranoles, que se forman a partir de las antronas por cambio isomérico. Este ha sido muy utilizado como ensayo general para los acíbares.

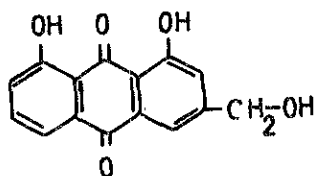
Al igual que en otras plantas productoras de antraquinonas, en las especies de Aloe el contenido de antraquinonas están implicados en el metabolismo activo de la planta. Mc. Carthy y col. en Sudáfrica, han demostrado que derivados antraquinónicos están solo en los zumos de las hojas y que la aloina alcanza una concentración máxima en los zumos desecados a de las hojas de Aloe ferox y Aloe vera en el verano (24.1 % en julio) y mínima en invierno (14.8 % en julio).



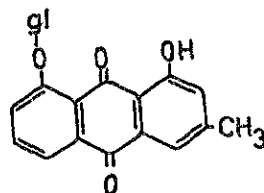
ALOINA



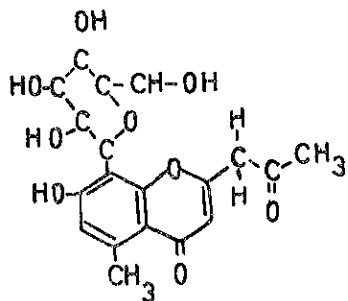
HOMONATALOINA



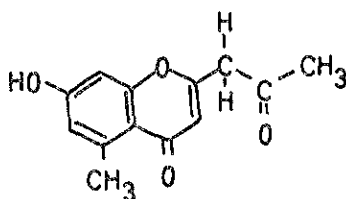
EMODINA



CRISOFANOL



ALOESINA



ALOESONA

Figura 15 Algunos componentes químicos del áloe

(Hutter A. John, 1995)

3.5. Propiedades y usos.

Son varios los usos que se le han dado al *áloe*, la mayoría son de uso popular y algunos tienen fundamento médico. Se ha utilizado el jugo y la pulpa de las hojas aplicando sobre la piel, para: disminuir la transpiración, como repelente contra los insectos, para destetar a los infantes, para tratar conjuntivitis crónica y otras enfermedades de los ojos; también ha sido utilizado contra algunas infecciones e inflamaciones de heridas superficiales y mezclado con huevo como purgante. *Aloe vera* es usado junto con otras especies de *áloe* para uso médico y popular en la cosmetología (Morton 1951 y Díez Martínez 1981), en la cosmetología para la preparación de cremas, cosméticos, lociones, shampoos y acondicionador para el cabello.

Los usos del *áloe* que actualmente prevalecen son como laxante y antiinflamatorio.

El efecto laxante de los preparados de *áloe*; se ha demostrado que este efecto radica en sus componentes químicos derivados de la 1, 8 dihidroxiantraquinona. Este efecto al parecer es ejercido por acción directa en el colon, por inhibición de la reabsorción activa de electrolitos y agua, por la inhibición de la bomba de sodio y potasio. En otros reportes se ha mencionado que el efecto laxante de estos compuestos se debe a su estimulación del plexo de Auerbach, lo cual produce aumento del peristaltismo intestinal.

Sobre su efecto antiinflamatorio, no se tienen estudios farmacológicos, sólo existen reportes clínicos como los de: Foster (1966), quien reportó que las hojas frescas de Aloe vera aplicadas directamente sobre la piel aliviaban las quemaduras de primer grado, como las ocasionadas por el trabajo doméstico.

Loverman (1937) reportó dos casos de quemaduras por rayos ultravioleta, en los cuáles menciona que durante el tratamiento de los pacientes, con hojas frescas de áloe, aplicadas directamente sobre el área dañada, produjo una completa restauración celular en pocos meses.

Collins y Collins (1937) mencionan que la aplicación directa de las hojas de áloe sobre la piel alivia la dermatitis severa por exposición a rayos X en humanos. También existen observaciones populares que mencionan que estas plantas alivian gran variedad de padecimientos por quemaduras.

4.JUSTIFICACION

Estos antecedentes muestran que el áloe empíricamente se ha usado como antiinflamatorio y como analgésico, sin embargo no existen evidencias farmacológicas que justifiquen su uso como tal; los antiinflamatorios conocidos como ya se menciono tienen importantes efectos secundarios por lo que se decidió investigar otros antiinflamatorios con menos efectos adversos.

5. Objetivo

1. Estudiar si los efectos de los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico de áloe administrado a ratas son capaces de inhibir los signos del proceso inflamatorio.

6. Hipótesis

Los extractos de áloe son capaces de producir un efecto antiinflamatorio, produciendo un decremento de algunos de los eventos del proceso inflamatorio como: migración de leucocitos, permeabilidad, dolor y edema.

II. Material y Métodos

1. Extracción del material.

1.1. Preparación del gel:

La planta se colectó en el municipio de Apaxco en el estado de México en los meses de octubre y noviembre. Cada hoja se abrió longitudinalmente para obtener el gel, el cual se seco totalmente en placas de vidrio a temperatura ambiente, posteriormente se pulverizó y se guardó en un frasco ámbar hasta ser utilizado.

1.2 Preparación del extracto acuoso:

Se pesó 1g de polvo seco de áloe, se disolvió en 20 ml de solución salina al 0.45%, mezclando con un agitador magnético a 37°C por 30 minutos.

Se centrifugó (Centrífuga Solbat modelo J12) a 2500 rpm durante 10 min; se tomó el sobrenadante y se ajustó el pH a 7.4 con hidróxido de sodio 0.1N.

1.3 Preparación del extracto clorofórmico y etanólico:

Del pulverizado se peso 1Kg y se fraccionó con etanol al 96% y cloroformo en un extractor Soxhlet (Pyrex) durante 2 días por 8 hrs continuas y obteniendo 12 g de extracto clorofórmico y 282 g de extracto etanólico, el solvente se evaporó a bajas temperaturas y se obtuvo un extracto seco el cual fué disuelto en solución salina para administrarlo.

2 Animales:

Se utilizaron ratas Wistar del mismo sexo, de 200-250 g. de peso, se mantuvieron en cautiverio, bajo dieta estándar y toma libre de agua, se formaron grupos de 5 ratas cada uno manteniéndolas a una temperatura entre 20-25°C

3 Preparación de las esponjas:

Se usarón esponjas de poliuretano de 1.5 cm de ancho por 3.5 cm de largo y 0.5 cm de grosor con un peso aproximado de $0.55 \text{ gr} \pm 0.012$.

Las esponjas se lavaron con alcohol al 70% por 30 minutos, se enjuagaron con agua destilada, se secaron a 80°C en estufa (Ríos Rocha S.A.) por 2 horas y se esterilizaron en el autoclave.

4 Actividad Antiinflamatoria.

4.1 Implantación de esponjas.

Se formaron 3 grupos de 5 ratas cada uno y se les administró por vía intraperitoneal las siguientes sustancias:

Gpo. 1- Indometacina (Merk-Sharp) 8mg/Kg de peso.

Gpo. 2 - Extracto acuoso de áloe 1ml.

Gpo. 3 - Solución salina 1 ml.

Gpo. 4 -Maleato de clorfeniramina (presentación comercial clorotrimetrón) 12 mg/Kg.

Después de 30 minutos se anestesiaron a las ratas con una mezcla de aire-éter y se procedió a la implantación de las esponjas.

Para lo cual se les hizo una incisión subcutánea transversal en el vientre de aproximadamente 2 cm, con las pinzas rombas se separó la piel del músculo procurando no romper los capilares circunvecinos, y se implantaron las esponjas, que previamente se habían impregnado con carragenina al 1% en solución salina estéril (tipo II, Sigma, St Louis, MO), se suturó a las ratas dejándolas así durante 4 hrs, 6hrs. y 8hrs.

A los animales tratados con el antihistaminico, se les implantaron esponjas impregnadas con dextran (Merck - Sharp and Dohme).

Después del tiempo señalado las ratas se sacrificaron, para lo cual se durmieron con éter hasta provocarles paro cardiorrespiratorio, se realizó una incisión y se retiraron las esponjas, se exprimieron con una jeringa, se midió el volumen del exudado y posteriormente se realizaron diferentes diluciones con solución salina 0.9% hasta obtener las más adecuadas, para realizar la cuenta total de leucocitos y la determinación de proteínas.

Una vez encontrada la dilución correcta se tomó una muestra de la dilución con un capilar y se puso en la cámara de Neubauer y se procedió a contar las células de la siguiente forma:

Con un tubo capilar se tomó una muestra de la dilución del exudado y se colocó la gota en el borde del cubre objetos de la cámara de Neubauer, para que por capilaridad se distribuyera en toda la cámara, se esperó un minuto para que sedimentaran los leucocitos y se procedió a realizar la lectura en un microscopio de luz, se contaron los cuadros de las cuatro esquinas de la cámara.

Para obtener el número total de leucocitos/mm³ se emplea la fórmula siguiente:

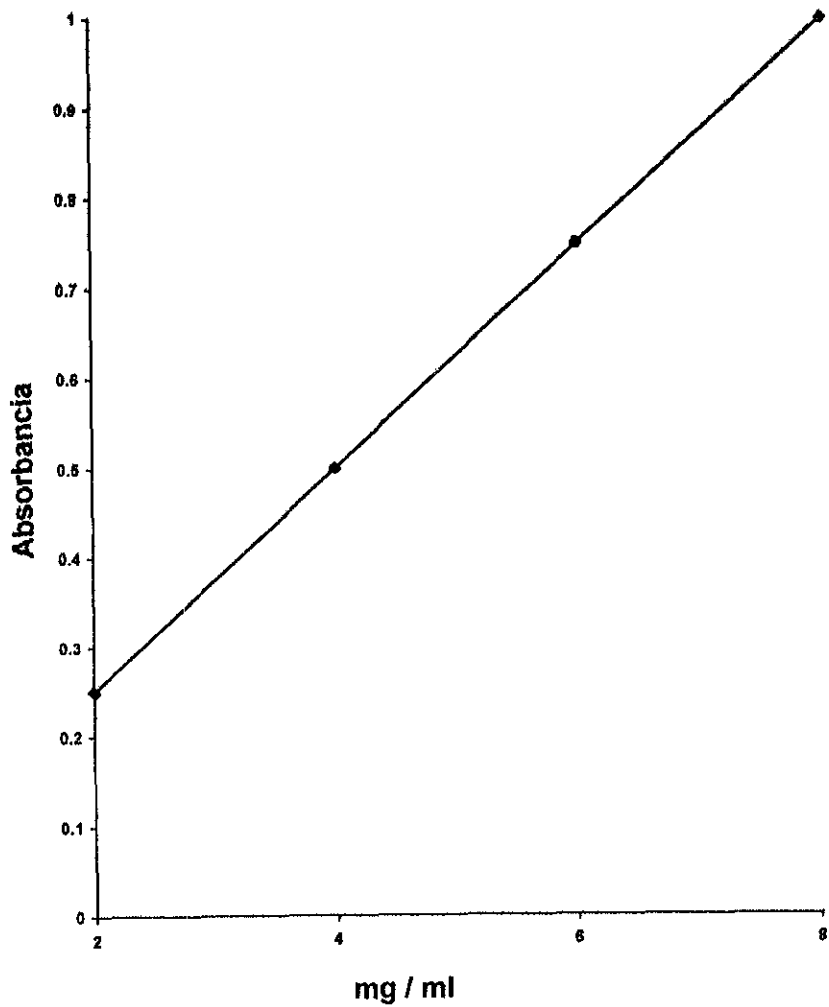
$$\text{Leucocitos / mm}^3 = \frac{\text{No. de células contadas} \times \text{dilución} \times 10}{\text{No. de cuadros contados}}$$

La determinación de proteínas se realizó con el método de Biuret. El exudado se diluyó con solución salina al 0.9%, con el cual se hicieron diferentes ensayos hasta encontrar el más adecuado para la determinación. Las lecturas de absorbancia de las muestras se intercalaron en una curva estandar, la cual se hizo con una solución de proteína (albúmina Sigma St. Louis M.O.) de 8mg/ml, se tomaron alícuotas de 0.25, 0.50, 0.75 y 1.0 ml, para obtener por tubo de reacción 2, 4, 6 y 8 mg de proteína respectivamente.

Reactivo de Biuret.:

Pesar 1.5g de sulfato cúprico y 6g de tartrato de sodio y potasio, transferir a un matraz volumétrico de 1lt. y disolver en aproximadamente 500ml. de agua, agregar 300ml. de hidróxido de sodio al 10% agitando constantemente, completar a 1lt con agua destilada, mezclar y almacenar en frasco ambar. Los resultados se expresan en g de proteína por 100 ml.

Los tubos se calentaron a 50°C en baño maría durante 10min. después se enfriaron en agua corriente y se determinó su absorbancia a 540 nm ó con filtro verde, usando el tubo 1 como blanco (gráfica A).



**Gráfica "A" Curva
Estandar**

4.2 Edema inducido por carragenina en la extremidad inferior de la rata:

Se formaron grupos de 5 animales cada uno y se les administró las siguientes sustancias por vía subcutánea:

Gpo. 1 indometacina (Sigma, St Louis, MO) 10mg/Kg de peso

Gpo. 2 dexametasona (Merck-Sharp y Dohme) 0.5mg/Kg de peso

Gpo 3 solución salina 0.1 ml/Kg de peso

Por vía intraperitoneal:

Gpo. 3 extracto acuoso 100 mg/Kg

Gpo. 4 extracto clorofórmico 100 mg/Kg

Transcurridos 60 min. se les administró carragenina 0.1 ml al 1% en solución salina esteril (tipo II, Sigma, St Louis, MO) en la aponeurosis plantar, y un volumen igual de solución salina en la otra extremidad.

Cada grupo estuvo formado por 6 a 8 ratas, el aumento de volumen se midió por el método de desplazamiento de mercurio (Método de Van Arman, 1965), que consiste en medir la presión que ejerce el mercurio contenido en un recipiente al introducir la pata de la rata, hasta una marca en el extremo posterior del tarso, en el recipiente que está conectado a un transductor de presión P-1000 B (Narco Bio Systems), éste a un amplificador y al sistema de registro; el volumen se midió antes y después de la administración de la carragenina y de la solución salina durante 8 hrs.

Los calculos se hicieron de la siguiente forma: el incremento de volumen de la pata de la rata tratada con solución salina, se resto el incremento de volumen de la pata a la que se le administró carragenina, obteniendo así el incremento (Δ_1), a este incremento se resto el obtenido por cada grupo al que se le administró las sustancias ensayadas (Δ_2) y de esta forma nos dio el incremento real (Δ_r)

4.3. Inhibición de la migración de neutrófilos en la cavidad peritoneal.

A otros grupos de ratas se les administraron por vía subcutánea las siguientes sustancias:

Grupo1 extracto clorofórmico. 200 mg/Kg de peso.

Grupo2l extracto acuoso 400 mg/Kg de peso.

Grupo 3 extracto etanolico 50, 200 y 600 mg/Kg de peso.

Grupo 4 indometacina 10 mg/Kg de peso

Grupo 5 dexametasona 0.5 mg/Kg de peso.

Grupo 6 Solución salina 1ml.

Una hora más tarde las ratas fueron inyectadas con 3 ml de carragenina (100 μ g/ml preparados en solución salina estéril 0.9 %) en la cavidad peritoneal, después de 4 horas, las ratas se sacrificarón por dislocación cervical y se lavó la cavidad peritoneal con 10 ml de solución buffer de fosfatos conteniendo 5 u/ml de heparina (Sigma St Louis, MO) y 5 % de albúmina sérica bovina (Sigma Chemical Company) y se dió masaje a la cavidad peritoneal por 2 minutos, y se recuperaron

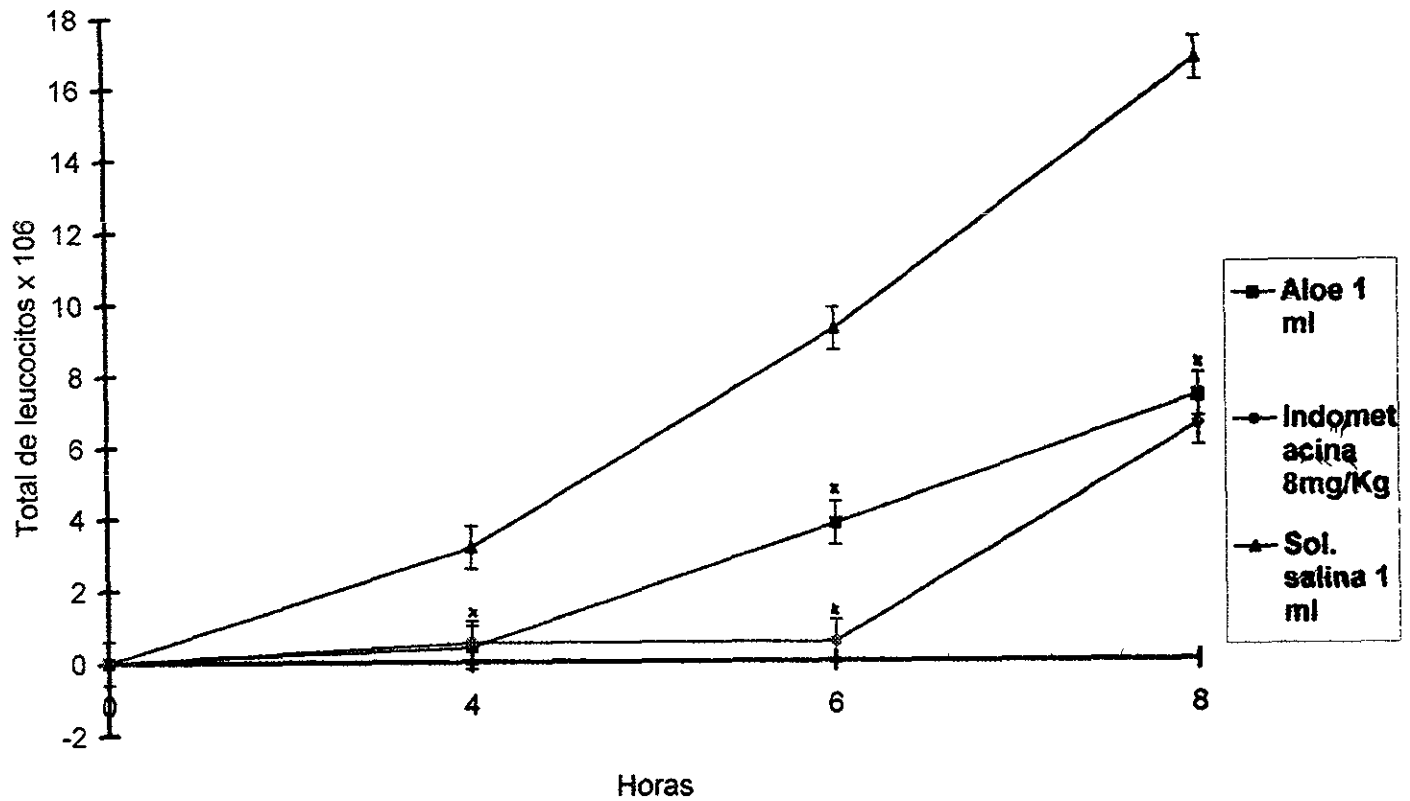
5 ml del lavado peritoneal y se tomaron muestras para conteo de leucocitos totales en la cámara de Neubauer. El volumen restante de células se centrifugó por 5 min. a 1000 rpm. Se desecho el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en 0.4 ml de solución de albumina al 3% en sol. salina 0.9%. De esta suspensión se aplicaron de 1 a 2 gotas sobre portaobjetos cubiertos con papel filtro con 2 perforaciones para su fijación y preparación para realizar la cuenta diferencial de células blancas. (Técnica de Souza y Ferreira 1985).

IV RESULTADOS

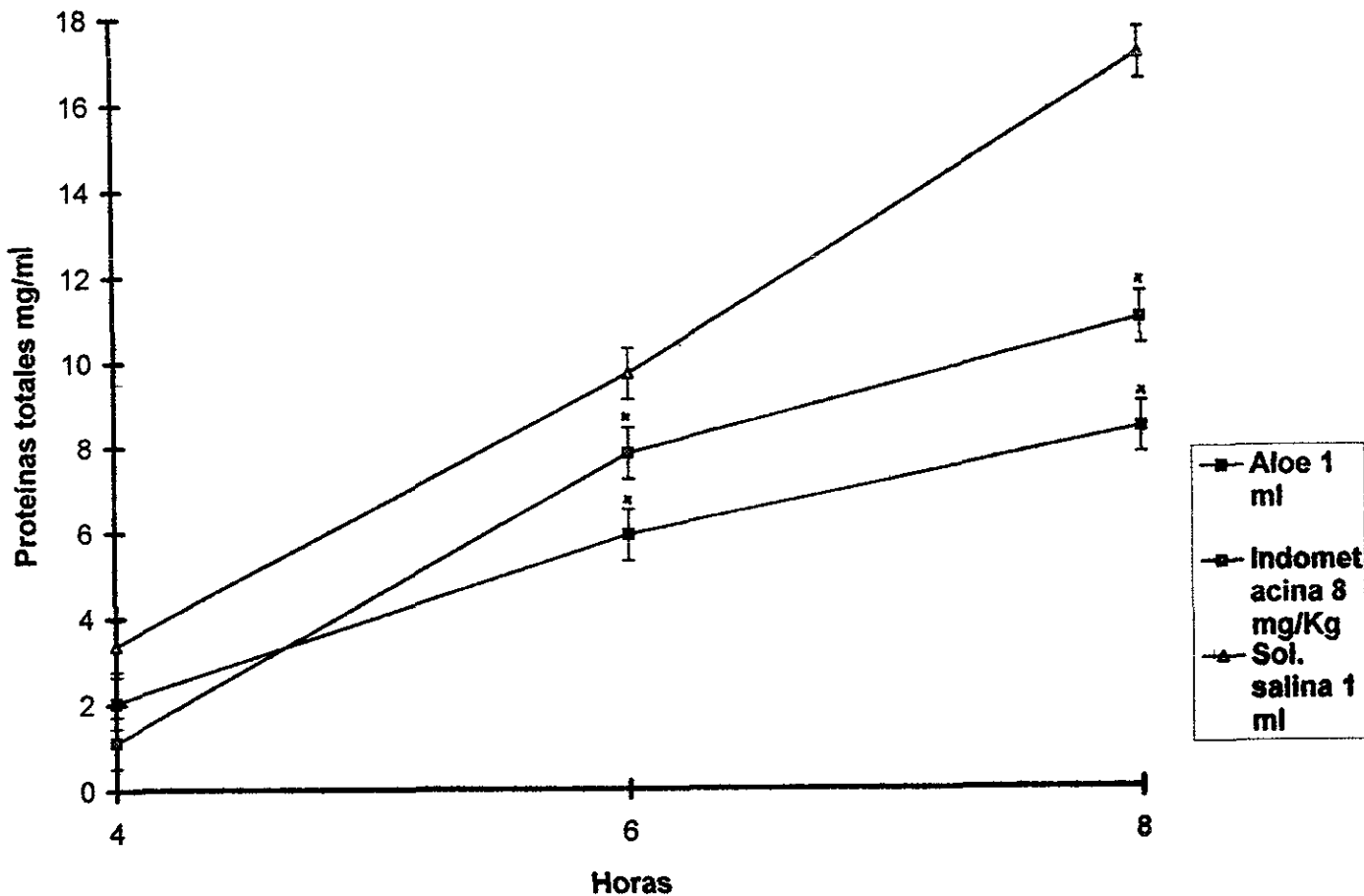
4.1 Los resultados obtenidos en el edema producido por la implantación de esponjas impregnadas con carragenina fueron:

En el grupo control tratado con solución salina, se obtuvo a las 4hrs. un total de leucocitos de $3.17 \pm 0.84 \times 10^6$ mg/ml y de proteínas plasmáticas 3.36 ± 1.26 mg/ml⁻¹, en el grupo tratado con la indometacina se obtuvo una cuenta total de leucocitos de $0.53 \pm 0.19 \times 10^6$ mg/ml y de proteína plasmática de 1.11 ± 0.79 mg/ml⁻¹ y con el extracto acuoso de áloe los resultados fueron de $0.402 \pm 0.89 \times 10^6$ mg/ml y de proteínas plasmáticas de $2.04 + 0.90$ mg/ml⁻¹ los cuales fueron significativos (gráfica 1 y 2).

Con estos resultados podemos decir que el extracto acuoso de Aloe variegata en el edema inducido por carragenina tiene la capacidad de inhibir algunos mecanismos del proceso inflamatorio, como son la migración de leucocitos y la permeabilidad a las proteínas plasmáticas. Di Rosa (1971) reportó que el edema inducido por carragenina presenta dos fases, la 1ª producida por la liberación de histamina en los primeros minutos y la 2ª mediada por cininas, es de breve duración (90 a 150 min.) y es donde las Pgs son liberadas; como ya he mencionado los fármacos no esteroideos actúan inhibiendo la síntesis de Pgs (Figura 11) como la indometacina. Como podemos observar en las gráficas 1 y 2 el extracto acuoso de áloe se comportó de una forma muy semejante a la indometacina.



Gráfica 1 Efecto del extracto acuoso de áloe e indometacina sobre la migración de leucocitos por el método de esponjas implantadas, n=5, *P < 0.05

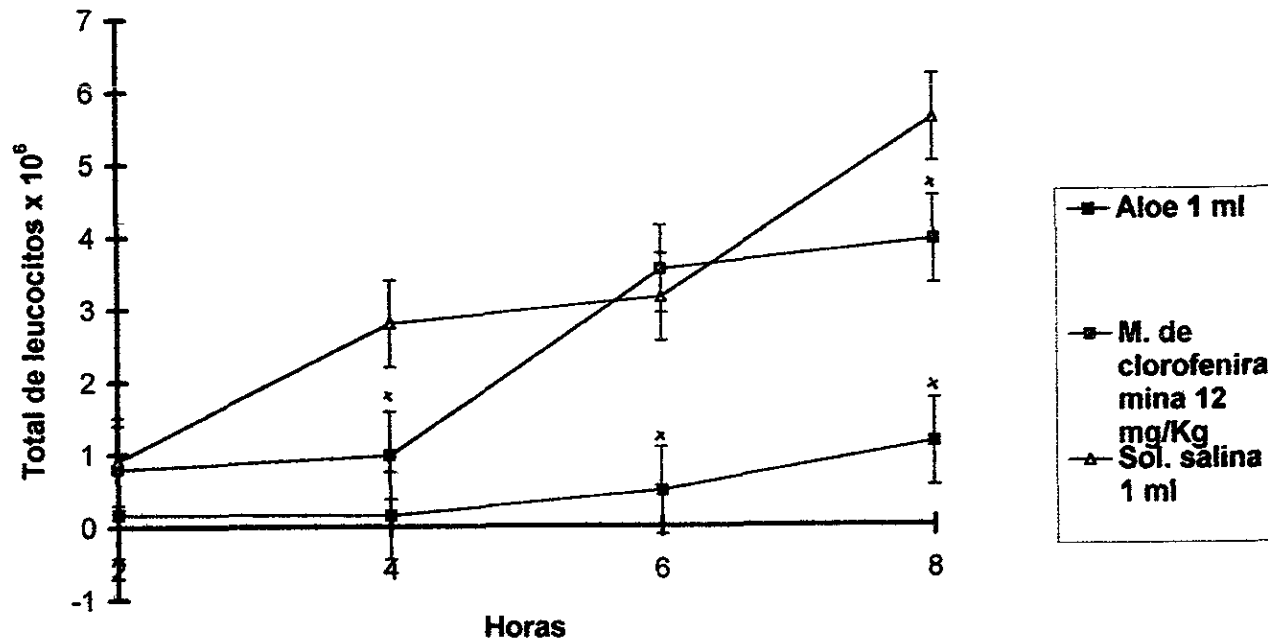


Gráfica 2 Efecto de la administración I. P. de áloe e indometacina sobre la inhibición de la permeabilidad a las proteínas. n=5, *P < 0.05

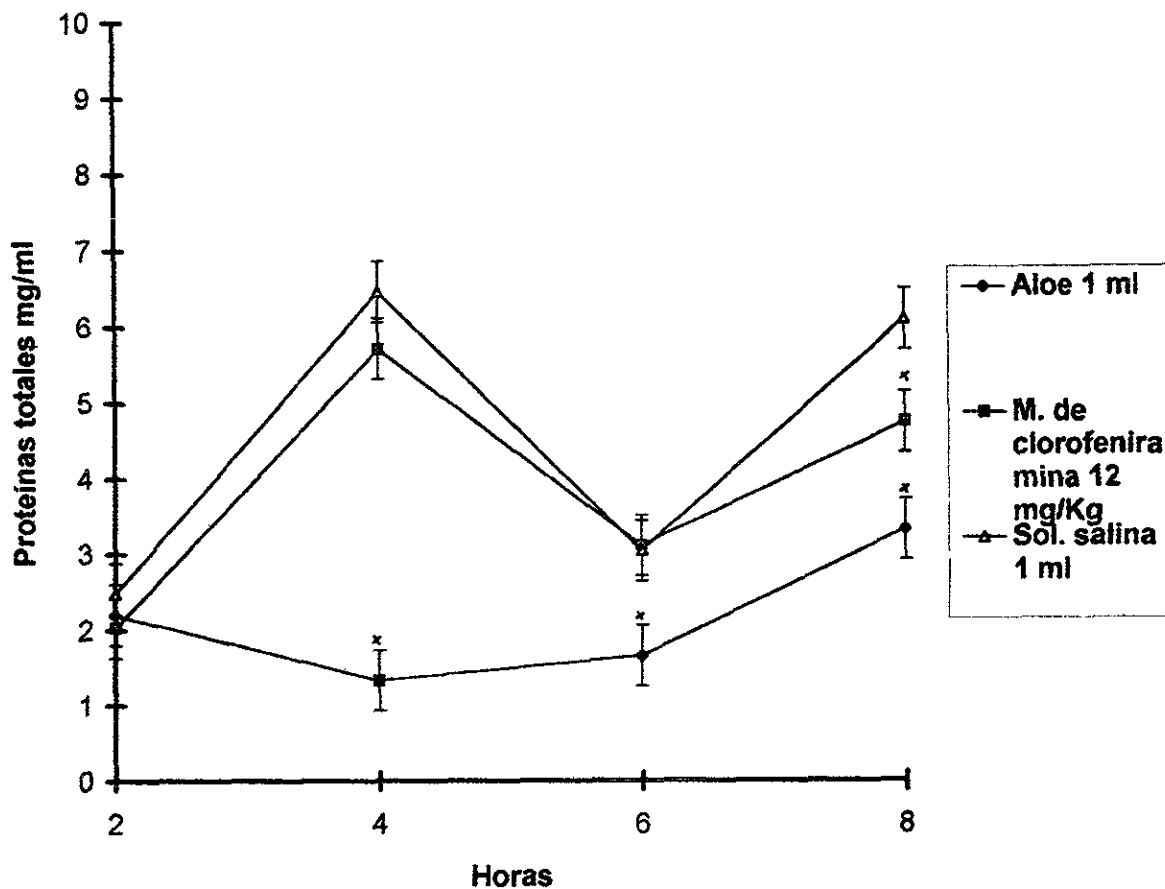
En el edema producido por la implantación de esponjas impregnadas con dextrán tenemos que:

En el grupo control tratado con solución salina se obtuvo a las 4 hrs un total de leucocitos de $2.800 \pm 0.15 \times 10^6$ mg/ml y de proteínas plasmáticas de 6.45 ± 1.04 mg/ml⁻¹. En el grupo tratado con el antihistamínico (m. de clorfeniramina) el máximo efecto se obtuvo a las 2hrs, obteniéndose una cuenta total de leucocitos de $0.790 \pm 0.17 \times 10^6$ mg/ml y de proteínas plasmáticas de 2.03 ± 0.86 mg/ml⁻¹, comparando estos resultados con los del extracto acuoso de áloe tenemos que los resultados fueron significativos, el máximo efecto fue a las 4 hrs. dando un total de leucocitos de $0.150 \pm 0.03 \times 10^6$ mg/ml y de proteínas plasmáticas de 1.33 ± 0.30 mg/ml⁻¹ (gráficas 3 y 4).

El edema producido por dextrán es mediado principalmente por desgranulación de las células cebadas liberando la histamina, el efecto máximo del extracto acuoso de áloe fue a las 4 hrs. no siendo así el efecto del m. de clorfeniramina que fue a las 2 hrs., esto es porque su efecto lo realiza inhibiendo la liberación de histamina y que como ya mencione es el primer mediador químico que se libra en el proceso inflamatorio. Sin embargo el extracto acuoso de áloe tuvo su máximo efecto a las 4 hrs. lo cual apoya los resultados anteriores, que su efecto posiblemente es por inhibición de la síntesis de Pgs.



Gráfica 3 Efecto del extracto acuoso de áloe y del m. de clorofeniramina sobre la migración de leucocitos por el método de esponjas implantadas. n=5, *P < 0.05

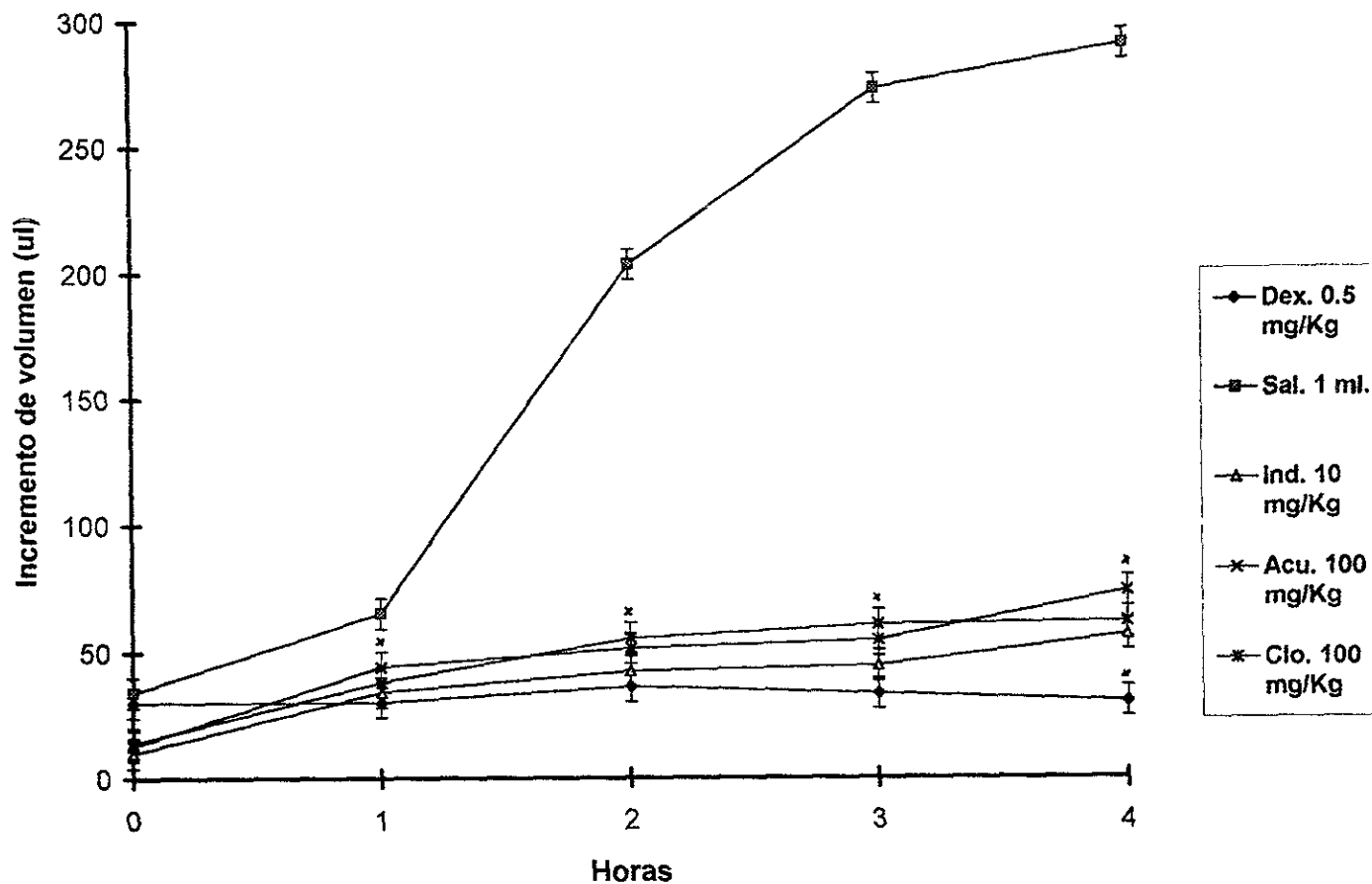


Gráfica 4 Efecto de la administración I.P. de áloe y del maleato de clorofeniramina sobre la inhibición de la permeabilidad a las proteínas. n=5, *P < 0.05

4.2 Edema inducido por carragenina en la extremidad posterior de la rata.

En los animales del grupo control el edema inducido por carragenina en la extremidad posterior se mantuvo por más de 8 hrs, observándose el efecto máximo de los diferentes tratamientos a las 4hrs.

El incremento de volumen de la extremidad posterior de la rata con carragenina fue de 160 μ l, mientras que en las extremidades a las que se les administró los extractos acuoso y clorofórmico por vía subcutánea y 60 minutos después carragenina, el incremento de volumen fue de 75 y 62 μ l respectivamente, del mismo modo podemos observar el efecto anti edema de dos fármacos conocidos, uno de tipo no esteroide como la indometacina en donde el incremento a las 4 hrs. fue de 56 μ l y otro de tipo esteroide como la dexametasona en la que su efecto máximo fue a las 2 hrs dando un incremento de 36 μ l. (gráfica 5).



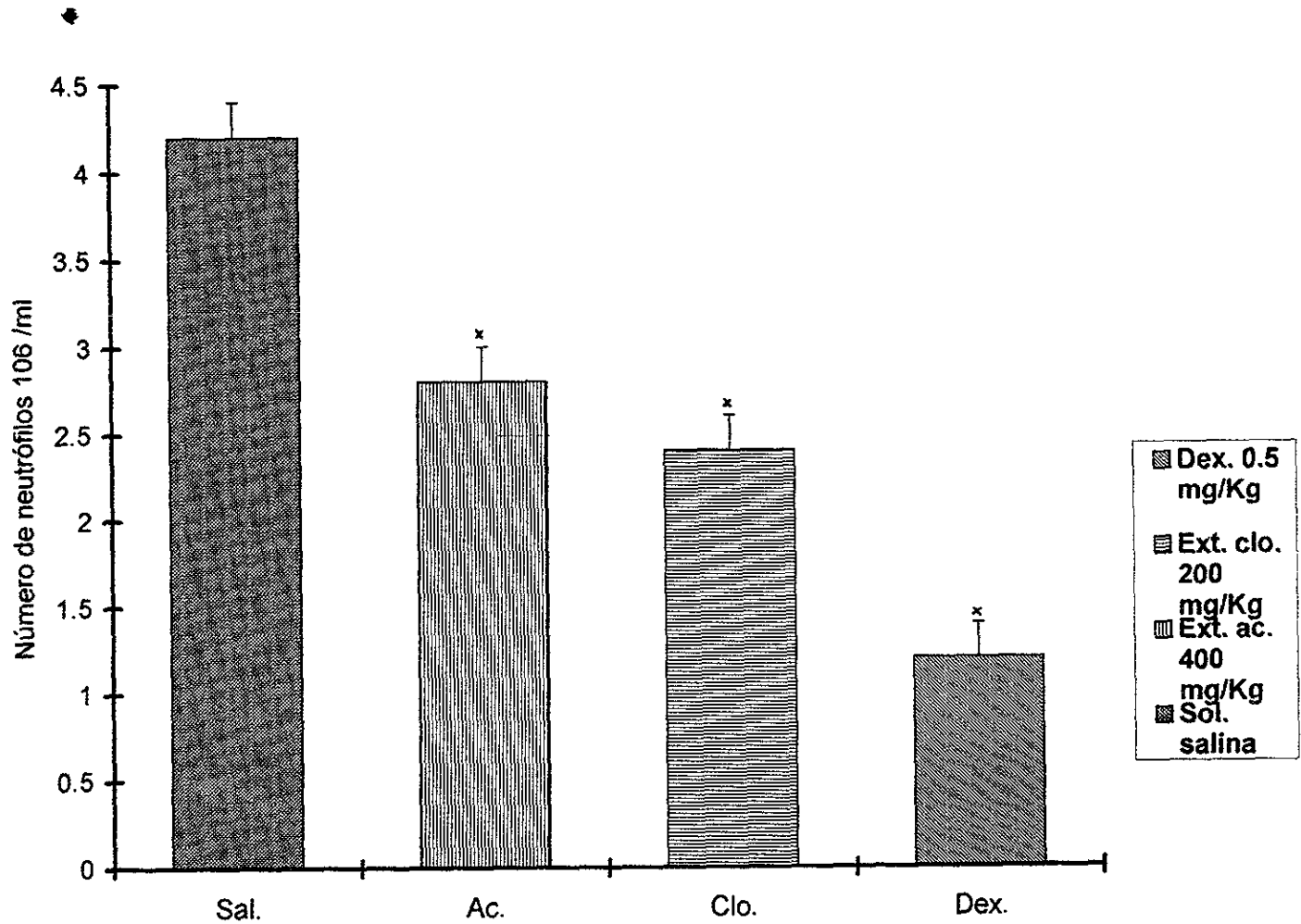
Gráfica 5 Efecto del extracto acuoso y clorofórmico de áloe sobre el edema inducido por carragenina administrada por vía I.P. n=5, *P < 0.05

4.3 Inhibición de la migración de neutrófilos en la cavidad peritoneal de la rata.

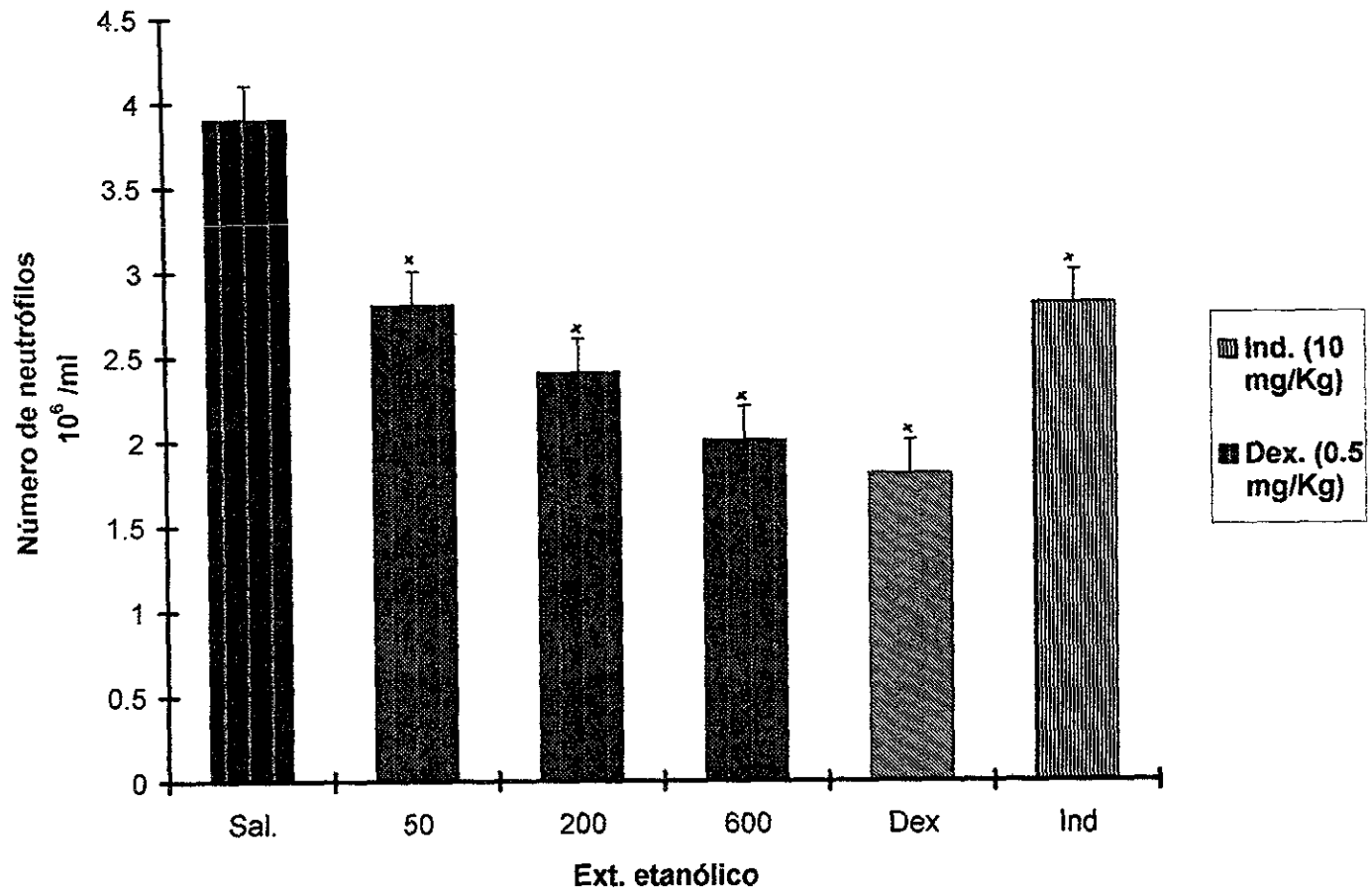
El extracto acuoso, clorofórmico y etanólico disminuyeron el número de migración de neutrófilos en la cavidad peritoneal (gráfica 6), con el extracto acuoso se observó un 28% y con el extracto clorofórmico un 42.9% de inhibición. El extracto etanólico disminuyó también la migración de neutrófilos, en dosis dependiente el efecto máximo se observó con una dosis de 600 mg/Kg dando un 48% de inhibición (gráfica 7); Del mismo modo los antiinflamatorios usados disminuyeron la migración de neutrófilos, como la indometacina que inhibe en un 36% y la dexametasona en un 71.4%.

Los agentes antiinflamatorios no esteroides como la indometacina, como ya he mencionado actúan inhibiendo la síntesis de Pgs a nivel de la Cox-1, este efecto explica su acción como antiinflamatorio en el edema inducido por carragenina (Higgs y col. 1979). Por otro lado la dexametasona (antiinflamatorio tipo esteroide) inhibe la fosfolipasa A2 la cual libera al ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana y por lo tanto de la producción de Pgs (Blackuell y col., 1980). De este modo la acción antiinflamatoria de estos agentes está relacionada con la inhibición de Pgs y la síntesis de leucotrienos. lo cual se demuestra con la dosis de dexametasona usada ya que produce una alta inhibición de la migración de neutrófilos tanto como el efecto producido por la indometacina (gráfica 6), del

mismo modo el efecto antiedema de los dos extractos está relacionado con su capacidad de disminuir el número de migración de neutrófilos dentro de la cavidad peritoneal, lo que sugiere que su posible acción sea por el camino de leucotrienos, ya que son estos los que tienen un efecto quimiotáctico potente sobre eosinófilos, neutrófilos y macrófagos. El extracto etanólico no mostro efecto antiedema pero redujo la migración de neutrófilos (gráfica 7), lo cual sugiere, que en el extracto de etanol no hay componentes involucrados en el efecto antiinflamatorio.



Gráfica 6 Efecto de los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico de áloe, sobre la migración de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal. $n=5$ * $P < 0.05$



Gráfica 7 Efecto del ext. etanólico de aloe sobre la migración de neutrófilos. n=5, *P < 0.05

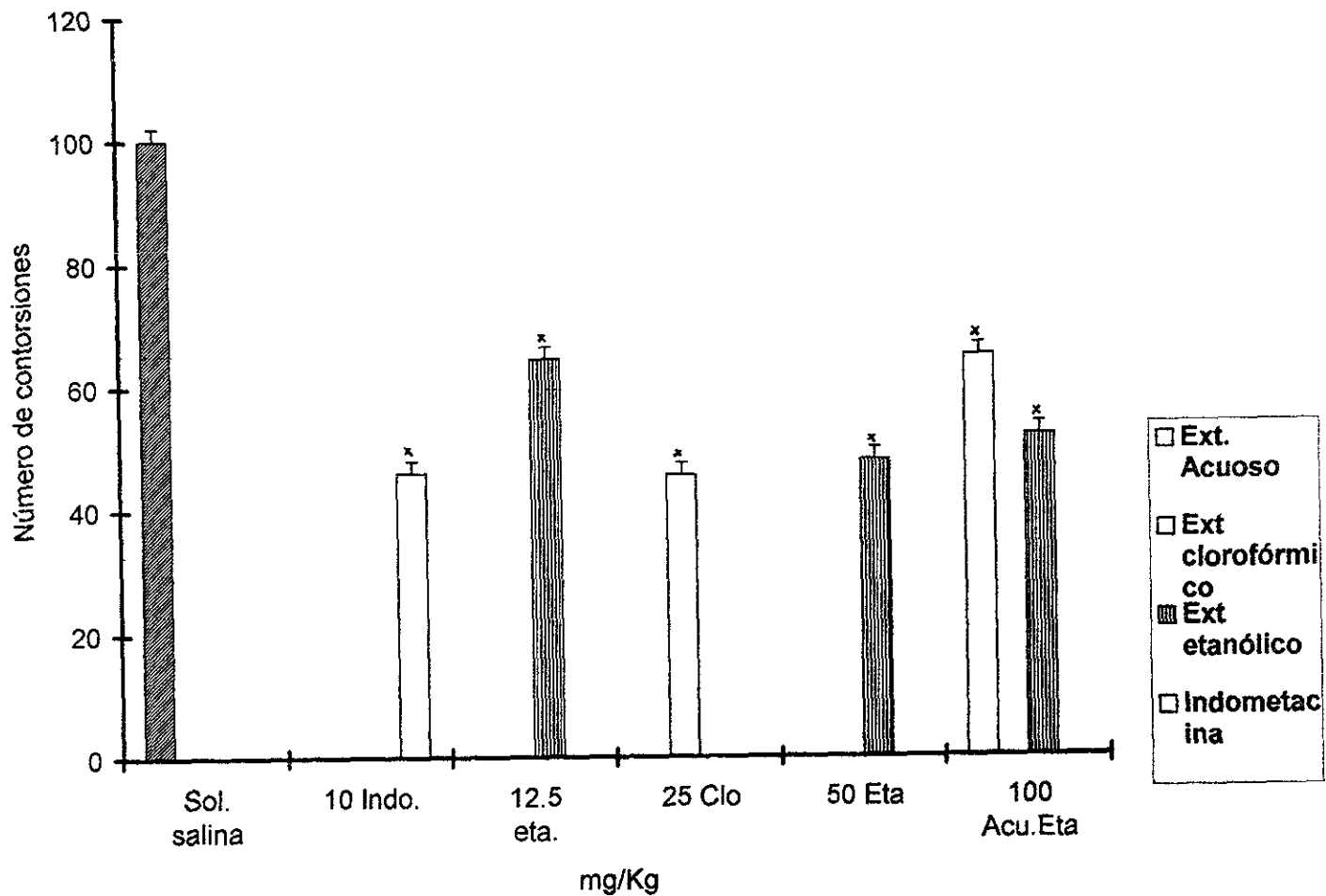
4.4 Contorsión:

La prueba de contorsión la utilizamos para saber si el extracto acuoso de áloe tenía efectos para suprimir el dolor, que es otro de los signos del proceso inflamatorio, los resultados obtenidos fueron:

El grupo control tratado con solución salina y 60 minutos después con ácido acético administrado por vía intraperitoneal no inhibió las contorsiones, la indometacina con una dosis de 10 mg/Kg inhibió un 44%, siendo mayor el efecto con el extracto acuoso de áloe con las dosis de 100 y 200 mg/Kg las cuales inhibieron en un 64.9% y 59.4% respectivamente y con el extracto etanólico el efecto mayor se obtuvo con la dosis de 12.5 mg/Kg dando un 64.5 % de inhibición. (gráfica 8).

Como sabemos la prueba de contorsión es utilizada para determinar el poder analgésico de los fármacos tipo aspirina, en donde las contorsiones son inducidas al ser administrado un agente nociceptivo, que en este caso fue el ácido acético, el cual lesiona el peritoneo y produce un estado inflamatorio agudo por la liberación de mediadores químicos como las Pgs e histamina, que a la vez su síntesis es estimulada por la producción de bradicinina, las que al interaccionar desencadenan el dolor que en el ratón se manifiesta a través de las contorsiones. (Collier, 1964). Como ya mencioné el dolor es otro de los signos del proceso inflamatorio, es de gran importancia ya que al manifestarse en un

paciente hace que este recurra al médico. Los resultados obtenidos demuestran que los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico tienen poder analgésico, estos apoyan los reportes de la medicina popular en los que se menciona que las hojas frescas ó el gel de áloe han sido utilizados para la reparación de piel lesionada ya sea por exposición a rayos x (Collins y Collins, 1937), por úlceras en la piel (Crewe, 1937) etc, en los que después de seguir un tratatamiento continuo la piel se restableció completamente y consecuentemente disminuyó el dolor.



Gráfica 8 Efecto de los extractos: acuoso, etanólico y clorofórmico de áloe y de la indometacina en las contracciones inducidas por ácido acético. n=5 *P < 0.05

V CONCLUSIONES

1. El extracto acuoso de *áloe variegata* administrado por vía intraperitoneal inhibió la migración de leucocitos y la permeabilidad a las proteínas en el edema producido por el método de esponjas implantadas, impregnadas con carragenina y/o con dextrán, sin embargo se observó un efecto menor con el dextrán, ya que este es un antihistamínico que actúa en la primera fase del proceso inflamatorio inhibiendo la liberación de histamina.

2. Los extractos acuoso y clorofórmico del gel de *áloe variegata* administrados por vía subcutánea, fueron capaces de disminuir el edema inducido con carragenina en la extremidad posterior de la rata.

3. Los extractos acuoso, clorofórmico y etanólico inhibieron significativamente la migración celular hacia la cavidad peritoneal, lo cual corrobora los resultados obtenidos con el método de implantación de esponjas.

4. Los extractos etanólico, acuoso y clorofórmico del gel de *áloe* fueron capaces de producir analgesia, lo cual se observó por la disminución de las contorsiones inducidas con el ácido acético de forma semejante a la acción de la indometacina; sin embargo con las dosis administradas de estos extractos no se observó una relación dosis-respuesta ya que las dosis altas aumentaron las contorsiones esto probablemente debido a que al aumentar las dosis aumentaron otras sustancias que irritaron el peritoneo.

En el proceso inflamatorio intervienen diferentes mediadores químicos y la secuencia de aparición es más o menos ordenada, pero no así su desaparición, de tal manera que en determinado momento son varios los mediadores químicos, esta es una razón por la cual no existe un fármaco tipo aspirina que inhiba completamente un proceso inflamatorio, por ejemplo los antihistamínicos tienen efecto importante en la fase donde la histamina es el principal causante del edema, como es el caso del maleato de clorfeniramina, a la vez los compuestos como la indometacina tienen efecto para bloquear el edema producido por las Pgs. ya que estos compuestos inhiben su síntesis de y es en esta inhibición en la que radica su importancia como antiinflamatorio y analgésico y en relación a los antiinflamatorios tipo esteroide sus efectos colaterales son muy severos, como ya se menciono.

Lo anterior nos lleva a concluir que el extracto acuoso de Aloe variegata contiene componentes que tienen efecto antiinflamatorio y analgésico, ya que inhibe los eventos importantes del proceso inflamatorio, como son la migración celular, la permeabilidad, y como consecuencia de ello suprime el dolor, y al parecer estos efectos son debidos a que probablemente inhiben la síntesis de Pgs, ya que tienen un efecto parecido al de la indometacina y ala dexametasona, las cuales como mencione inhiben la síntesis de Pgs (figura 11). Para saber si el extracto acuoso de áloe tiene efectivamente acción sobre la síntesis de Pgs se

tendría que medir la cantidad de Pgs en el exudado inflamatorio lo cual es una posibilidad para continuar el estudio sobre el efecto de los componentes del extracto acuoso de áloe.

VI BIBLIOGRAFÍA

- Appleton Iau, Tmliuson A., Willoughby A. Derek (1995) Induction of Cyclooxygenase and nitric oxide synthase in inflammation *Advances in Pharmacology*. 35: 27-78.
- Barnes, P. J. and Adcock (1993). Antiinflammatory actions of steroids: molecular mechanism. *Tips*. 14: 436- 441.
- Brocklehurst W.E. (1960) The release of histamine and formation of a slow reacting substance (SRS-A) during anaphilactic shock. *J. Physiol* 151: 416-435
- Broum S. S., May S. A. (1991) The use of botanicals for health purposes by members of a prepaid health plan. *Res. Nurs. Health*. 14 (5): 339-50
- C. G. Van Arman, A. J. Begany, L. M. Miller (1965) Some details of inflammations caused by yeast and carrageeneen. *Exper. Therap*. 150: 328.
- Clark E, R., Clark E. L. (1936) Oservations on polymorphonuclear leucocytes in the living animal.
- Charles A. Winter, Edwin A. , (1962) Carrageenen induce edema in head paw on rat as on assay for antiinflamatory drugs. *Prac. Soc. Exp. Biol. Med*. 11: 544
- Cheney R. H. (1967) Aloe drug on human therapy. *Drug Res*. 10: 1523-1530.
- Davis R. H, Maro N. P. (1989) Aloe vera and giberellin. Anti-inflamatory activity in diabetes. *J. Am. Podiatr Med. Assoc*. 79(1): 24-26.
- Davis R. H. (1992) Aloe vera and the inflamed synovial pouch model. *J. Am. Podiatr. Med. Assoc*. 82(3): 140-8.

- Davis R. H. Stewart G. J.;(1992) Aloe vera and the inflamed synovial pouch model .J. Am. Podiatr Med Assoc. 82(3):140-148.
- Davis R. H., Parker W.L., (1991) The isolation of an active inhibitory system from an extract of aloe vera. J. Am. Podiatr Med. Assoc. 81(5): 258-61.
- Dominguez Soto (1992) Photodermatitis to aloe vera. Int. J. Dermatol. 31(5): 372.
- Doroty F. Bainton (1980) The cell biology of inflammation Biomedical Press 1: 1-24
- Douglas Grindlay, T. Reynolds. (1985). The Aloe vera phenomenon a review of the properties and modern uses of the leaf parenchyma gel. Elsevier Scientific Publishers. 120- 150.
- Dray A. and Bevan (1993) Inflammation and hyperalgesia: highlighting the team effort. Tips 14: 287- 290.
- Ferreira S. H. (1972) Prostaglandins, aspirin- like drugs and analgesia Nature New Biol. 240: 200-203.
- Ferreira S. H., Moncada and J. Vane (1974) Prostaglandins and Signs and Symptoms of inflammation. Institute of Basic Medical Sciences, pág 175-187.
- Ferreira S. H., S. Moncada and J. R. Vane (1971) Indometacin and aspirin abolish prostaglandin release from the spleen. Nature New. Biol. 231: 237-239.
- Ford-Hutchinson, J.R. Walker and M. S. Smith (1978) Assessment of Antiinflammatory Activity by sponge implantation technique. J. M. Pharmacol methods 1: 3-7
- Guyton C. Arthur. (1997) Tratado de fisiología médica. 9ª edc. Edt.

Interamericana. 477-497.

Haller s.s. (1990) A drug for all seasons. Medical and pharmacological history of aloe. Acad. Med. 66 (6): 647-59.

Hamawy M., Mergenhagen, S and Siragaman, R. (1994) Adhesion molecules as regulators of mast- cell and basophil function. Immunology Today. 15(2): 62-66.

Hanck C. John (1979) Chemical Messengers of the inflammatory agents. Ann Rev. Pharmacol toxicol. 19: 469- 490.

Hardman Joel G. y col.(1996) Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edc. Edt. Médica Panamericana. 1: 619-731.

Hutter a. John, Salman Mohammad. (1996) Antinflammatory C-Glucosyl Chromone from Aloe barbadiensis. J. Nat. Prod. 59: 541-543.

Hutter J. A., Salman M. (1996). Antiinflammatory C-glucosyl chromone from Aloe barbadiensis. J. Nat. Prod. 59(5): 541-543.

Kaplan A. P. (1974) The hageman factor dependent pathways of human plasma. Microvas. Res. 8: 97-111.

Kenneth K. Wu. (1995) Inducible cicloxygenase and nitric oxide synthase. Advances in Pharmacology. 33: 179-207.

Klein A. D., Penneys N. S.,(1988) Aloe vera. J. Am. Acad. Dermatol 18(4): 714-720.

Lee C. K, Hw S:s, Moyk. Prevention of ultraviolet radiation-induced suppression of accessory cell function of Langerhans cells. by Aloe vera gel components.

Inmunopharmacology. 37(2-3): 153-162.

Majno and Palade G. E. (1961) Studies on inflammation the effect of histamine and serotonin on vascular permeability, and electron microscopic study. J. Biophys. Biochem. Cytol. 11: 571.

Male D. K. (1991) Cell traffic and inflammation . In Advanced Immunology Edc. 16ª.

Medina Santillán Roberto, Reyes García Gerardo. (1996) Sobre el desarrollo de AINEs con actividad inhibitoria selectiva Cox-2: Meloxicam. Acta Méd. 31(122): 69-77.

Michander and Mc. Mahom (1979) Monosteroidal antiinflammatory agents. Ann Pen. Pharmacol. toxicol 19. 469-90

Miller Kint (1980) Aloe vera. Library of Congress 78: 115

Moncada S. (1980) Natural antraquinone. Drugs Pharmacol 20:1

Morton J. 1961. Folk uses and comercial explotation of áloe leaf pulp. Econ. Bot. 15:311-119

Mssimo Di Rosa (1972) Biological properties of carrageenan. J. Phamme. 24: 84-102.

Ristimaki A., Garfinkel S., Wessendorf. (1994) Induction of ciclooxigenase-2 by interleukyn-1a. J. Biol. Chem. 269: 11769-11775.

Robbins Stanley (1997)Patología Básica, 9ª edc. Edt. Interamericana.

Rott Ivan (1996) Inmunología 3ª edc. Edt. Salvat. 13: 1-8.

Rojas M. William. (1996) Inmunología. Interamericana. México. 29-69.

- Ryan and Majno (1977) *Actue Inflammation J. of Pathol.* 86: 185- 274.
- Ryan G. B. (1994) *Inflammation Mediators of inflammation.Bestr. Pthol.* 152: 272-291.
- Segura J. J Calvo J.R. (1997). EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages. *Endodontinc implications.* 23(4): 205-208
- Schmiat J.M., Grenspoon J.S. (1991) Aloe vera dermal wound healing. *Obstet Gynecol.* 78(1): 115-7.
- Smith W. L., Marnett L. J. (1990) Prostaglandin endoperoxide synthase: Structure and catalysis. *Biochim Biophys Acta* 1083: 1-17.
- Soto Y., Ohta S., Shinoda M.(1990). Study on chemical protectors against radiation. Protection effect of Aloe arborescens on skin injury induced by x-irradiation. *Index Medicus.* 110(11): 876-84.
- Spector Walter Graham. (1977) *An Introduction to general patholoys.* Cherrhill Livingstone Great Britan. 62-82
- Thompson J. E. (1991) Topical use of aloe vera derived allantoin gel in otolaryngology. *Ear. Nose Throat J.* 70(1): 56.
- Wiley J., Sons, Inc. (1996) Constitutive Cyclooxygenase (Cox-1) Inducible cyclooxygenase (Cox-2). Rationale for selective Inhybition and progress to date. *Medicinal Research Review.* 16(2): 181-206.
- Yagi A. Egusa T., Arase M. (1997) Isolation and caracterizacion of the glycoprotein fraction with a proliferation-promoting activity on human and hamster

cells in vitro from Aloe vera gel. *Planta Med.* 63(1): 18:21.

Zhang L., Tizard I. R. (1996) Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from Aloe vera gel. *Inmunopharmacology.* 35(2): 119- 128.