



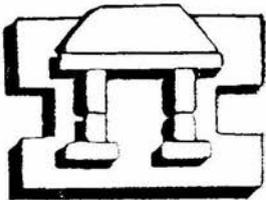
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
DE *Porophyllum tagetoides*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MARIA ELENA MARTINEZ JUAREZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. DAVID SEGURA COBOS.



IZTACALA

2002



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.



U.N.A.M. CAMPUS

AGRADECIMIENTO:

Mi gratitud al Maestro en Ciencias David Segura Cobos por la asesoría del presente trabajo así como todo el apoyo brindado durante la realización del mismo.

A los revisores de tesis M en C. María del Socorro Sánchez Correa, M en C. Ma. del Rocío Bautista Pérez, M en C. Eduardo Barrera Escorcía y M en C. Cesar M Flores Ortiz por las revisiones y sugerencias de este trabajo

DEDICATORIA

A mis padres Silvia Juárez Fragoso y Aniceto Martínez Salgado por darme todo su apoyo y cariño.

A mi hermano Luis, porque gracias a su apoyo he logrado realizar mi más grande meta, y a todos mis hermanos Moisés, Guadalupe, Josefina, Juanita, Ma. Asunción, Nora y Fátima quienes siempre me impulsaron para seguir adelante.

A mis mejores y únicas amigas: Ángeles (gracias por todo tu comprensión y apoyo pero sobre todo por la gran amistad que espero que perdure mucho tiempo más) y Guille (Gracias por tus consejos y el apoyo que han sido muy valiosos para mí y recuerda que siempre contarás con mi amistad.)

A Javier: Gracias por todo tu apoyo y comprensión que siempre he recibido de ti y sobre todo gracias por tu gran cariño el cual es muy significativo para mí y recuerda que siempre contarás conmigo.....☺.K

INDICE

IZT.

I.- Introducción -----	1
1.- Proceso inflamatorio-----	1
2.- Funciones principales de la respuesta inflamatoria-----	2
3.- Efectos clínicos de la inflamación aguda-----	2
4.- Composición del exudado inflamatorio agudo-----	3
5.- Principales acontecimientos celulares de la inflamación aguda-----	6
6.- Características principales de los neutrófilos-----	7
7.- Activación endotelial en la inflamación aguda-----	9
8.- Movimiento de los neutrófilos-----	11
9.- Mediadores químicos de la inflamación aguda-----	14
10.- Principales datos clínicos del proceso inflamatorio agudo-----	18
11.- Fármacos antiinflamatorios-----	19
12.- Medicina tradicional-----	20
13.- Sinonimia popular-----	21
14.- Taxonomía-----	21
15.- Descripción botánica-----	21
16.- Distribución geográfica-----	22
17.- Usos medicinales-----	22
II.- ANTECEDENTES -----	23
III.- JUSTIFICACION -----	23
IV.- OBJETIVO -----	24

V.-MATERIAL Y METODOS -----	25
1.- Obtención del material biológico-----	25
2.- Preparación del extracto acuoso-----	25
3.- Investigación de la actividad antiinflamatoria-----	26
3.1.- Edema inducido con carragenina-----	26
3.2.- Migración celular-----	27
4.- Prueba de analgesia-----	28
5.- Toxicidad aguda-----	28
6.- Análisis estadístico-----	29
VI.-RESULTADOS -----	30
1.- Rendimiento de las extracciones-----	30
2.- Formación de edema-----	31
3.- Actividad antiedema del extracto acuoso de <i>Porophyllum tagetoides</i> -----	32
4.- Migración celular-----	33
5.- Efecto analgésico de <i>Porophyllum tagetoides</i> -----	35
6.- Toxicidad-----	36
7.- Fraccionamiento químico del extracto acuoso-----	37
7.1.- Edema-----	38
7.2.- Efecto de <i>Porophyllum tagetoides</i> sobre la migración celular-----	39
VII.-DISCUSION -----	40
1.- Efecto del extracto acuoso de la parte aérea de <i>Poropyllum tagetoides</i> sobre el edema-----	40
2.- Efecto del extracto acuoso sobre migración celular-----	40
3.- Efecto analgésico del extracto acuoso de la parte aérea de <i>Porophyllum tagetoides</i> -----	41

4.- Efecto tóxico del extracto acuoso de la parte aérea de <i>Porophyllum tagetoides</i> --	41
5.- Fraccionamiento del extracto acuosos de <i>Porophyllum tagetoides</i> -----	41
6.- Actividad antiedema de la fracción metanólica de <i>Porophyllum tagetoides</i> -----	42
7.- Efecto de la fracción metanólica de <i>Porophyllum tagetoides</i> sobre la migración celular-----	42
VIII.-CONCLUSIONES -----	43
IX.-BIBLIOGRAFIA -----	44

FIGURAS

- FIGURA 1. Formación de un exudado inflamatorio agudo----- 5
- FIGURA 2. Emigración de neutrófilos en la inflamación aguda----- 8
- FIGURA 3. Moléculas de adhesión celular implicados en la adhesión del neutrófilo
----- 11
- FIGURA 4. Fagocitosis por neutrófilos----- 13
- FIGURA 5. *Porophyllum tagetoides*----- 22
- FIGURA 6. Efecto de la indometacina 10 mg/kg y solución salina, administrados por vía oral sobre el edema inducido por 0.1 ml de carragenina (1%) en la extremidad posterior de la rata ----- 31
- FIGURA 7.- Efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 200 y 300 mg/kg, indometacina 10 mg/kg y solución salina, administrados por vía oral, sobre el edema inducido por 0.1 ml de carragenina al 1% en la extremidad posterior de la rata ----- 33
- FIGURA 8.- Efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 300mg/kg, solución salina y dexametaxona, por vía oral, sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal irritada con carragenina ----- 34
- FIGURA 9.- Efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 300mg/kg, indometacina 10mg/kg y solución salina, administrados por vía oral sobre las contorsiones inducidas por la administración intraperitoneal de ácido acético ----- 36
- FIGURA 10.- Efecto de la fracción metanólica y el residuo del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* ambos en la dosis de 200mg/kg y solución salina, administrados por vía oral, sobre el edema inducido por 0.1 ml de carragenina al 1% en la extremidad posterior de la rata ----- 38
- FIGURA 11.-Efecto de la fracción metanólica de *Porophyllum tagetoides* (200 mg/kg), dexametasona(1mg/kg) y solución salina(1ml), por vía oral, sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal irritada con carragenina ----- 39

TABLA 1.Principales grupos de mediadores implicados en la inflamación aguda

----- 15

TABLA 2.Rendimiento de los extractos de *Porophyllum tagetoides*

----- 30

TABLA 3.Toxicidad aguda del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides*

----- 37

A.-RESUMEN

En nuestro país existe una gran variedad de plantas que se utilizan para el tratamiento de padecimientos inflamatorios. El objetivo de este trabajo fue evaluar las actividades antiinflamatoria y analgésica de los extractos acuoso y metanólico de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides* (cuyo nombre común es pipicha) en modelos experimentales de inflamación aguda y dolor en roedores. Los extractos se administraron por la vía oral en las dosis de 200 y 300 mg/kg de peso corporal. El extracto acuoso redujo en un 23% y 41% la formación del edema causado a las 4 horas posteriores a la aplicación subcutánea de 1 mg del agente flogístico carragenina en las extremidades inferiores de las ratas, mientras que el extracto metanólico inhibió este proceso en un 34.5%. El extracto acuoso tuvo un efecto sobre la migración celular a la cavidad peritoneal presente a las 4 horas de su inducción por la administración de 300 µg de carragenina de un 40%, mientras que el extracto metanólico no presentó efecto. El extracto acuoso redujo en un 50% las contorsiones causadas por la administración intraperitoneal de ácido acético (60 mg/kg) a ratones de la cepa CD1 de 20-25 g de peso. El análisis de los resultados de los diferentes ensayos realizados permiten deducir que el extracto acuoso de las partes aéreas de *Porophyllum tagetoides* tiene efecto antiinflamatorio y analgésico, lo cual permite corroborar el empleo que se le da en la medicina tradicional en el tratamiento de padecimientos que involucran procesos inflamatorios. Por último se corroboró la toxicidad aguda del extracto en dosis de 3, 000, 5, 000 y 1, 500 mg/kg de peso, observándose la aparición de organismos muertos a las 5 horas.

I. INTRODUCCIÓN.

1.- Proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio es una reacción local inespecífica del tejido conjuntivo ante una lesión. Entre los agentes que desencadenan este proceso mencionaremos los siguientes: a) físicos (calor, radiaciones etc.); b) mecánicos (aplastamiento); c) biológicos (bacterias, hongos y virus), d) químicos (toxinas y sustancias caústicas) y e) inmunológicos (interacción antígeno-anticuerpo). La naturaleza del agente lesivo define en gran parte las características de la evolución del proceso inflamatorio así como su intensidad y duración lo que permite clasificarla en aguda y crónica (Robbins, 1997).

Cuando un tejido es lesionado y hay muerte celular es posible más de una respuesta.

La zona lesionada puede ser sustituida por un tejido organizado de estructura y función idénticas a las originales. Este es el desenlace ideal y se denomina restitución, pero sólo puede darse si desaparece el agente lesivo, los detritus celulares se eliminan de la zona y las células especializadas destruidas poseen capacidad para volver a crecer o regenerarse.

Si las células lesionadas no pueden regenerarse ó la lesión local es tan intensa que ha destruido la arquitectura tisular, la restitución completa del tejido no siempre será posible. En tal caso, la respuesta tisular consiste en reparar la zona lesionada sustituyéndola por un tejido de cicatrización no especializado; proceso denominado reparación fibrosa. Este, es el final más frecuente de una lesión tisular importante.

Si el agente lesivo persiste (sobre todo si se trata de una infección) y la destrucción tisular continúa, los intentos de reparación fibrosa y las respuestas

inmunitarias se producen al mismo tiempo; proceso conocido como inflamación crónica.

Sea cual sea la evolución final de la lesión tisular, la respuesta inicial se denomina inflamación aguda o reacción inflamatoria aguda. Esta respuesta es relativamente inespecífica y sus funciones principales son las de eliminar los tejidos muertos, proteger frente a la infección local y facilitar el acceso del sistema inmunitario a la zona afectada (Stevens, 1996).

2.-Funciones principales de la respuesta inflamatoria aguda.

La respuesta inflamatoria aguda posee tres funciones principales que son:

1. La zona afectada es ocupada por un material transitorio denominado exudado inflamatorio agudo. Este exudado aporta proteínas, líquido y células de los vasos sanguíneos a la zona lesionada para poner en marcha las defensas locales.
2. Si existe un agente infeccioso (p. Ej. una bacteria) en la zona lesionada, los componentes del exudado pueden destruirlo y eliminarlo.
3. El tejido lesionado puede ser desintegrado y parcialmente licuado, y los detritus eliminados de la zona lesionada.

La respuesta inflamatoria aguda es controlada por la producción y difusión de mensajeros químicos derivados tanto de los tejidos lesionados como del exudado inflamatorio agudo (Stevens , op.cit).

3.-Efectos clínicos de la inflamación aguda.

Celso describió los cuatro signos cardinales de la inflamación aguda hace casi 2000 años.

Rubor (enrojecimiento)	Dolor
Calor	Tumor (hinchazón)

El enrojecimiento y el calor de la inflamación aguda son consecuencia de la vasodilatación y el aumento del flujo sanguíneo en la parte inflamada, y el edema se debe a la acumulación de exudado, especialmente a un componente líquido. El dolor se debe a varios factores, entre ellos la presión sobre las terminaciones nerviosas por la hinchazón y al efecto directo de ciertos factores químicos liberados para mediar en la respuesta.

Cuando la hinchazón y el dolor son importantes, se produce una impotencia funcional parcial o completa de la estructura inflamada (Pardo, 1991).

4.-Composición del exudado inflamatorio agudo.

El exudado inflamatorio agudo está formado por:

1. Líquido con sales y una elevada concentración de proteínas, incluidas inmunoglobulinas.
2. Fibrina, una proteína filamentososa insoluble de alto peso molecular.
3. Muchos neutrófilos polimorfonucleares derivados de leucocitos sanguíneos.
4. Algunos macrófagos, células fagocitarias que derivan de los monocitos sanguíneos.
5. Algunos linfocitos.

Todos estos componentes salen de la sangre a consecuencia de los cambios que se producen en los vasos sanguíneos de los tejidos supervivientes alrededor de la zona lesionada. Estos cambios y las respuestas vascular y celular de la inflamación aguda se muestran esquemáticamente en la figura 1. En resumen las fases son:

- Pequeños vasos sanguíneos adyacentes a la zona de tejido lesionada se dilatan inicialmente, con aumento del flujo sanguíneo, por lo que éste se hace más lento.
- Las células endoteliales se hinchan y se retraen parcialmente, con lo que ya no forman un revestimiento interno completamente intacto.

- Los vasos pierden líquido, permitiendo la salida de agua, sales y algunas proteínas de pequeño tamaño del plasma a la zona lesionada (exudado). Una de las principales proteínas que escapan es el fibrinógeno, que es una pequeña molécula soluble.
- Los neutrófilos polimorfonucleares circulantes inicialmente se adhieren a las células endoteliales hinchadas (marginación) y luego emigran activamente a través de la membrana basal vascular (emigración), pasando a la zona tisular lesionada.
- Más tarde, un pequeño número de monocitos sanguíneos(macrófagos) emigran de forma similar, al igual que lo hacen algunos linfocitos ((Stevens, op.cit).

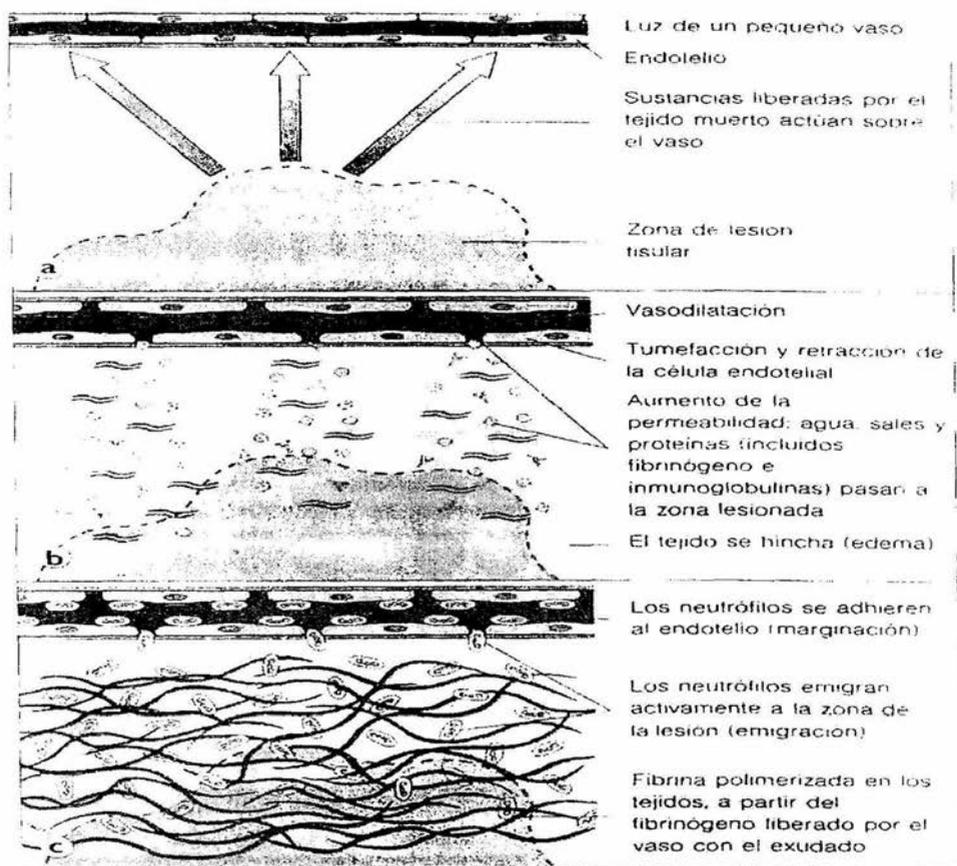


FIGURA1.- Formación de un exudado inflamatorio agudo.

- a) La muerte tisular provoca la liberación de sustancias(mediadores químicos) que actúan sobre los vasos sanguíneos cercanos.
- b) Los mediadores producen: (i) vasodilatación persistente y pérdida de flujo axial; (ii) tumefacción y separación de las células endoteliales; (iii) aumento de la permeabilidad , con exudación de agua, sales y pequeñas proteínas, entre ellas, fibrinógeno. El fibrinogeno se convierte en fibrina.
- c) Los mediadores hacen que los neutrófilos se adhieran al endotelio (marginación) y atraviesen las paredes vasculares hacia el tejido lesionado (emigración). Los monolitos/macrófagos sanguíneos también emigran por un mecanismo similar algo más tarde. La zona lesionada es sustituida progresivamente por los componentes del exudado.

Los principales cambios vasculares en la inflamación aguda son el resultado del flujo y la dilatación de los vasos, así como el aumento de la permeabilidad de sus paredes, que permite la difusión de proteínas grandes y líquido (Martínez, 1998).

La fibrina es una proteína filamentososa larga e insoluble, formada por la polimerización de numerosas moléculas de fibrinógeno, una proteína plasmática precursora, soluble y de menor tamaño. El fibrinógeno sale de los vasos junto con el líquido y las sales, polimerizándose en filamentos de fibrina insolubles una vez fuera de la luz vascular, debido a la activación de la cascada de la coagulación.

Se piensa, en general, que la red de filamentos de fibrina impediría la emigración de microorganismos y formaría un armazón que puede ayudar a la emigración de neutrófilos y macrófagos por la zona lesionada.

No obstante, no existe ninguna prueba real de que esas sean las funciones precisas de la red (Stevens, op.cit).

5.-Principales acontecimientos celulares de la inflamación aguda.

Los principales acontecimientos celulares de la inflamación aguda, todos ellos provocados por los mediadores químicos, son los siguientes:

- El endotelio normalmente inactivo tiene que ser activado para posibilitar la adherencia de los neutrófilos.
- Los neutrófilos normalmente inactivos deben ser activados a fin de que desarrollen su capacidad para matar y fagocitar bacterias y para generar mediadores inflamatorios.
- Los neutrófilos tienen que desarrollar la capacidad de moverse activamente de forma rígida, desde los vasos hasta la zona de lesión tisular.

Los neutrófilos son las principales células mediadoras de los efectos de la inflamación aguda. Si la lesión tisular es leve, basta con los neutrófilos circundantes de la sangre. Si la lesión tisular es extensa, se liberan neutrófilos,

incluidas algunas formas inmaduras, de la médula ósea para aumentar el número total de neutrófilos sanguíneos. Para que se mantenga el aporte de neutrófilos, factores de crecimiento producidos por el proceso inflamatorio estimulan la división de precursores mieloides en la médula ósea, aumentando así la producción de esas células (Stevens, op.cit).

6.-Características principales de los neutrófilos .

- Se producen a partir de la maduración de células precursoras en la médula ósea.
- Son los leucocitos más numerosos de la sangre, y su número aumenta en la inflamación aguda.
- Tiene una corta vida media una vez activados en los tejidos.
- Son móviles (ameboides) y capaces de pasar de los vasos a los tejidos.
- Sus movimientos pueden ser rígidos, atraídos por quimiotaxis.
- Fagocitan de forma activa.
- Contienen gránulos ricos en diversas proteasas.
- Generan radicales libres para matar a las bacterias fagocitadas.
- Son una fuente de ácido araquidónico para facilitar la producción de prostaglandinas.
- La producción de neutrófilos en la médula ósea es estimulada por citocinas generadas en la respuesta inflamatoria (Geneser, 2000 y Don, 1999).

La adhesión de los neutrófilos al endotelio los hace agregarse a lo largo de las paredes vasculares en un proceso denominado marginación. Tras la marginación, los neutrófilos emigran a través de las paredes vasculares hacia los tejidos circundantes en un proceso denominado emigración, como se muestra en la figura 2 (Roit, et al, 1998).

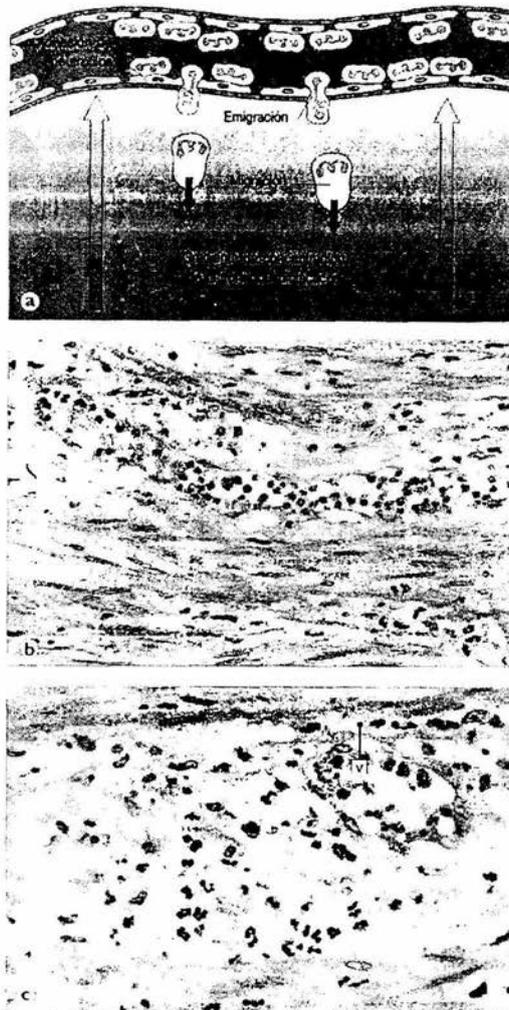


Fig. 5.3 Emigración de neutrófilos en la inflamación aguda.
 (a) Marginación, emigración y migración de neutrófilos.
 (b) Neutrófilos marginados a lo largo de la pared vascular.
 (c) Neutrófilos emigrando del vaso (V) al tejido lesionado.

FIGURA 2.-Emigración de neutrófilos en la inflamación aguda.

- a) Marginación, emigración y migración de neutrófilos .
- b) Neutrófilos marginados a lo largo de la pared vascular.
- c) Neutrófilos emigrando del vaso (V) al tejido lesionado.

7.-Activación endotelial en la inflamación aguda.

Los productos de la lesión tisular y las citocinas activan el endotelio de los vasos locales. Esto induce la expresión de moléculas de adhesión celular de superficie, que interactúan con moléculas complementarias en la membrana celular de los neutrófilos.

El endotelio juega un papel vital como barrera física frente a la difusión del plasma fuera de los vasos, además de ser fuente de muchas moléculas reguladoras. Debido a su extensión y a la constante secreción de sustancias mensajeras, el endotelio ha sido denominado el mayor órgano endocrino del cuerpo.

Los principales factores segregados por el endotelio son:

- Oxido nítrico y prostaciclina, que inducen la relajación vascular e inhiben la agregación plaquetaria.
- Endotelina, tromboxano A₂ y angiotensina II, que producen constricción vascular.

El factor de crecimiento PDGF estimula la formación de inhibidores por ejemplo, sustancias similares a la heparina.

- En su estado normal, el endotelio proporciona una superficie que impide la agregación y la desgranulación plaquetaria. El equilibrio de factores segregados es uno de los principales determinantes del control de flujo sanguíneo regional. En la inflamación aguda este equilibrio se modifica y aumenta la síntesis de una molécula derivada de lípidos conocida como factor de activación plaquetaria (PAF), que aumenta la permeabilidad vascular, así como la síntesis de óxido nítrico, que estimula la vasodilatación, también hace que se expresen más moléculas de adherencia celular, lo que permite la adherencia de los neutrófilos.

Además de modular los factores segregados, las propiedades de la superficie del endotelio se ven modificadas en la inflamación aguda (figura 3).

- IL-1 y TNF aumentan la expresión de moléculas de adherencia en el endotelio, especialmente de P-selectina.
- La molécula de adhesión endotelial leucocitaria 1 (ELAM-1 o E-selectina) estimula la adhesión de los neutrófilos.
- La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) estimula la adhesión de los neutrófilos y las células linfoides.
- La molécula de adherencia celular vascular 1 (VCAM-1) estimula la adherencia de las células linfoides y monocíticas.

Al mismo tiempo, otros mediadores de la inflamación, especialmente el fragmento C5a del complemento, inducen una mayor expresión de moléculas de adherencia celular complementarias en los neutrófilos (complejo CD11/CD18).

Por tanto, en la inflamación aguda el endotelio se ve modificado metabólicamente para producir factores vasoactivos (sobre todo PAF y óxido nítrico), así como para hacerse pegajoso para los neutrófilos (Contran, et al, 1995).

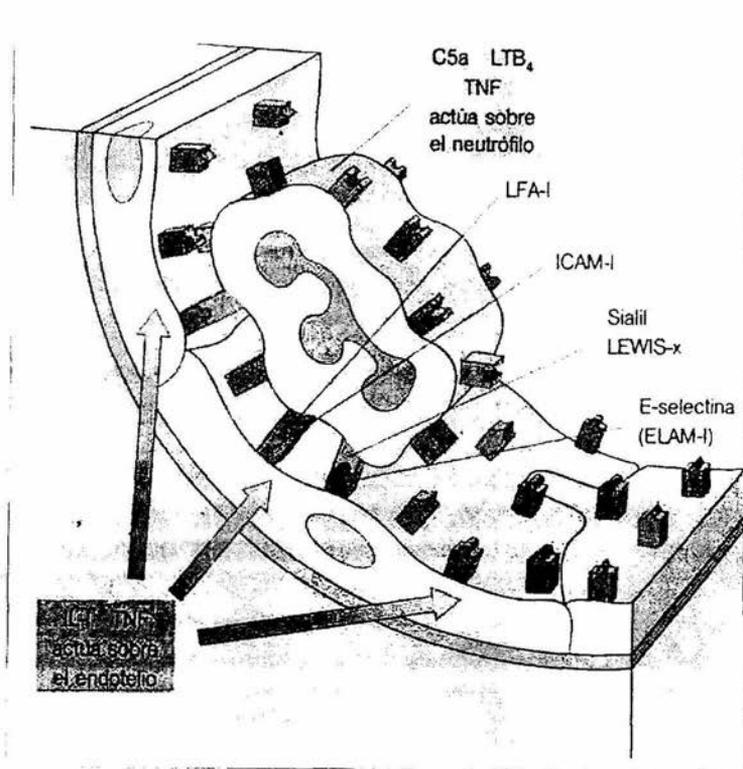


Fig. 5.4 Moléculas de adhesión celular implicadas en la adhesión del neutrófilo.

IL-1 interleuquina 1, TNF factor de necrosis tumoral, LTB₄ leucotrieno B₄.

FIGURA 3.-Moléculas de adhesión celular implicados en la adhesión del neutrófilo.

IL-1 interleucina 1, TNF factor de necrosis tumoral, LTB₄ leucotrieno B₄.

8.-Movimiento de los neutrófilos.

El movimiento de los neutrófilos desde la luz vascular hasta la zona lesionada es mediado por sustancias conocidas como factores quimiotácticos,

que difunden a partir de la zona de lesión tisular. Los principales factores quimiotácticos para neutrófilos son:

Para la adhesión de los neutrófilos: IL-1, $TNF\alpha$, PAF, LTB₄, C5a.

Para la quimiotaxia de los neutrófilos: C5a, LTB₄, componentes bacterianos.

Estos factores se unen a receptores en la superficie de los neutrófilos y activan sistemas de segundos mensajeros, estimulando un aumento de calcio citosólico, con el consiguiente montaje de las especializaciones citoesqueléticas implicadas en la motilidad (Stevens, 1996).

El leucocito polimorfonuclear neutrófilo está dotado de un gran número de gránulos citoplasmáticos lisosómicos ricos en enzimas proteolíticas capaces de destruir células y materiales de la matriz extracelular. Los neutrófilos poseen también un gran potencial fagocitario y pueden ingerir activamente gérmenes patógenos, que después serán destruidos por las enzimas lisosómicas y por mecanismos que generan radicales libres tóxicos. La figura 4 muestra la fagocitosis por neutrófilos. (Pardo, 1991 y Ross, 1997).

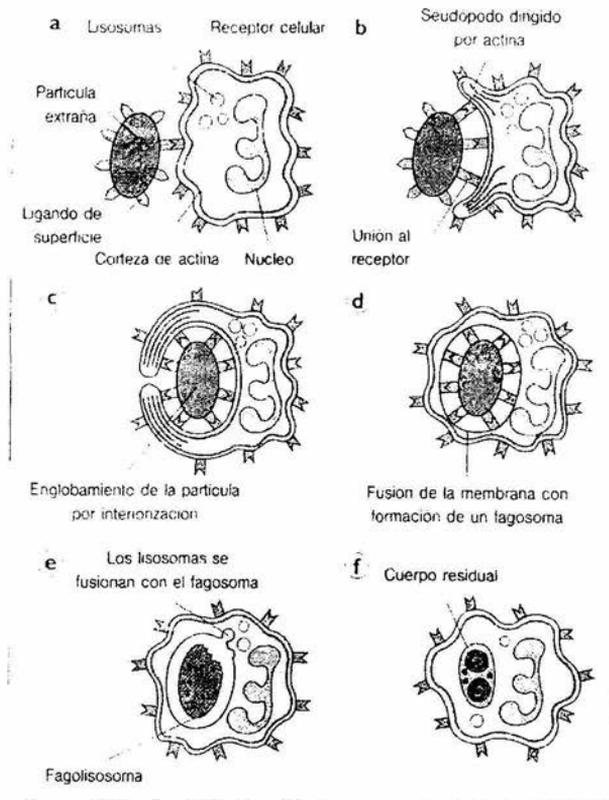


FIGURA 4.-Fagocitosis por neutrófilos.

- Los neutrófilos poseen receptores de membrana principalmente para la porción Fc de los anticuerpos, los factores del complemento unidos a partículas extrañas y los polisacáridos bacterianos.
- Como primer paso para la fagocitosis, el neutrófilo se une a la partícula anormal a través de sus receptores específicos. La célula rodea la partícula con pseudópodos dirigidos por el ensamblaje y desensamblaje de filamentos de actina.
- Los pseudópodos se fusionan para incluir totalmente la partícula anormal, y forman una vesícula endocítica.
- La partícula interior en la vesícula endocítica se denomina fagosoma.
- El fagosoma se fusiona con gránulos de neutrófilos, sobre todo gránulos primarios, que vierten su contenido, y exponen la partícula a una poderosa mezcla de enzimas lisosómicas.
- La destrucción de partículas extrañas se asocia a la formación de un cuerpo residual que contienen material degradado.

La desventaja de los neutrófilos es que su vida es corta y sobreviven sólo unas pocas horas en los tejidos. Por tanto, el aporte de neutrófilos a una zona lesionada debe ser mantenido constantemente.

Cualquier zona de lesión tisular contiene gran número de neutrófilos con actividad fagocitaria, mezclados con restos de neutrófilos, al morir, liberan algunas de sus enzimas lisosómicas en el tejido circundante, y estas enzimas pueden continuar actuando fuera de la célula, destruyendo proteínas estructurales y licuando parcialmente el tejido.

Los neutrófilos son estimulados para emigrar en mayor número cuando la lesión tisular se debe a una invasión bacteriana, ya que muchos productos bacterianos son poderosas sustancias quimiotácticas. Esta emigración a gran escala es especialmente beneficiosa porque los neutrófilos no sólo destruyen el tejido lesionado, sino que también facilitan y matan las bacterias causales. Cuando se produce una emigración masiva asociada a destrucción celular se forma una sustancia líquida densa denominada pus, que contiene detritus celulares necróticos, neutrófilos vivos y muertos y, a veces, microorganismos (Pardo, op.cit).

9.-Mediadores Químicos de la inflamación aguda.

Se han reconocido muchos factores que median y dirigen los fenómenos de la inflamación aguda. Estos mediadores químicos de la inflamación son importantes, ya que el proceso puede modificarse con tratamiento farmacológico para reducir al mínimo sus efectos no deseados y potencialmente perjudiciales. Los mediadores proceden de células o del plasma (figura 5). Los derivados del plasma llegan a la zona lesionada con el exudado inflamatorio. Son principalmente proteínas precursoras que son activadas por enzimas proteolíticas y que una vez activadas suelen tener una vida media corta. En los tejidos son rápidamente inactivadas por diversos sistemas enzimáticos o de limpieza.

Mediadores celulares de la inflamación aguda	
Almacenados	Síntesis activa
Histamina	Prostaglandinas Leucotrienos Factor activador de las plaquetas Citocinas Óxido nítrico
Mediadores de la inflamación aguda derivados del plasma.	
Sistema de las cininas Vía de la coagulación Sistema trombolítico Vía del complemento	Bradicinina Factor de Hageman activado Plasmina C3a, C3b, y C5a

TABLA 1.-Principales grupos de mediadores implicados en la inflamación aguda.

La histamina es el principal mediador preformado de la inflamación. Liberada por los mastocitos, basófilos y plaquetas, provoca una dilatación transitoria de las arteriolas, aumenta la permeabilidad de las vénulas y es la causa primera del aumento de la permeabilidad vascular en la primera hora que sigue a la lesión.

Las prostaglandinas y los leucotrienos derivan del ácido araquidónico por síntesis local. Este ácido graso de cadena larga es liberado de las membranas celulares por la activación de la enzima fosfolipasa A₂(Garther, 1997) .

El ácido araquidónico se metaboliza siguiendo dos vías principales:

1. La vía de la ciclooxigenasa produce: tromboxano A₂ (TXA₂), que agrega a las plaquetas y produce vasoconstricción; prostaciclina (PGI₂), que inhibe la agregación plaquetaria y dilata los vasos, y prostaglandinas estables (PGE₂, PGF_α, PGD₂) que producen vasodilatación y aumentan la permeabilidad vascular. La PGE₂ produce también dolor.

2. La vía de la lipoxigenasa produce leucotrienos (LTC₄, LTD₄, LTE₄) que producen vasoconstricción y aumentan la permeabilidad de las vénulas. El leucotrieno LTB₄ estimula la adhesión de los leucocitos al endotelio.

Los mastocitos/basófilos sintetizan el factor activador de las plaquetas (PAF) y la IgE puede estimular su liberación. También lo sintetizan plaquetas, neutrófilos, monocitos y células endoteliales. Se trata de un compuesto fosfolípido especializado que produce vasoconstricción, aumento de la permeabilidad vascular y agregación plaquetaria y es, por lo menos, mil veces más potente que la histamina. También estimula la síntesis de metabolitos del ácido araquidónico.

Las citocinas son polipéptidos producidos por linfocitos y monocitos activados. Las principales citocinas que participan en la inflamación aguda son interleucina-1 (IL1), interleucina-8 (IL-8) y factor alfa de la necrosis tumoral (TNF α). Son responsables de:

- Inducción de moléculas de adhesión celular en el endotelio.
- Inducción de síntesis de PGI₂ (prostaciclina).
- Inducción de síntesis de PAF.
- Fiebre, anorexia y estimulación de la síntesis hepática de proteínas de fase aguda.
- Estimulación de la proliferación y actividad secretora de los fibroblastos.
- Atracción de neutrófilos a la zona lesionada (IL-8).

El óxido nítrico es una pequeña molécula sintetizada localmente por el endotelio y los macrófagos a través de la actividad de una enzima, la sintetasa del óxido nítrico. Es un potente vasodilatador y aumenta la permeabilidad

vascular. Como importantes intermediarios de oxígeno reactivo, también puede mediar en la muerte de células y bacterias(Suites, 1995).

El sistema del complemento agrupa a una serie de proteínas plasmáticas con funciones importantes en la inmunidad y la inflamación. Existe una cascada de activación, produciéndose numerosos péptidos intermedios activados. Los principales productos que participan en la inflamación aguda son:

- C3a, que aumenta la permeabilidad vascular al liberar histamina de mastocitos/plaquetas.
- C5a, que aumenta la permeabilidad vascular al liberar histamina de mastocitos/plaquetas, es quimiotáctico para los neutrófilos e induce moléculas de adherencia de las células endoteliales.
- C3a5, que es quimiotáctico para los neutrófilos.
- C3b, que opsoniza bacterias y facilita su fagocitosis por neutrófilos.

Las cininas son pequeños péptidos derivados de precursores plasmáticos mediante división proteolítica. Una de las proteínas de la coagulación, el factor de Hageman (factor XII) activa el sistema; éste divide al péptido precalicreína. Esta estimula la formación, a partir de un cininógeno de alto peso molecular, de bradisinina que, además de ser un potente mediador del aumento de la permeabilidad vascular, produce dolor y activa el sistema del complemento.

La vía de la coagulación es la responsable de la coagulación sanguínea a través de la formación de fibrina a partir de fibrinógeno. El factor XII (factor de Hageman) es activado en el exudado inflamatorio cuando entra en contacto con el colágeno fuera de los vasos. Entonces estimula el depósito de fibrina, activa el sistema de las cininas y estimula también el sistema trombolítico. Cuando el fibrinógeno se convierte en fibrina, se forman fibrinopéptidos; éstos aumentan la permeabilidad vascular, además de ser quimiotácticos para los neutrófilos(Mc Cance y Huether, 1998).

La vía trombolítica, la plasmina (enzima generada por el activador del plasminógeno derivado del endotelio por acción de la bradicinina) es una enzima proteolítica con varias funciones en la inflamación:

- Activa el sistema de complemento.
- Activa el factor Hageman.
- Liza la fibrina para formar productos de degradación de la fibrina, que aumenta la permeabilidad vascular.

En la inflamación aguda estos factores actúan de forma concertada para producir los cambios estructurales y funcionales de la misma (Stites, 1995).

10.-Principales datos clínicos del proceso inflamatorio agudo.

Los principales datos clínicos del proceso inflamatorio agudo son:

- Malestar general.
- Fiebre.
- Dolor, generalmente localizado en la zona inflamada, por ejemplo, la fosa ilíaca derecha en la apendicitis aguda.
- Pulso rápido.

Los análisis de laboratorio suelen mostrar:

1. Aumento del recuento de neutrófilos en la sangre periférica.
2. Aumento de la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSE).
3. Aumento de la concentración de proteínas de fase aguda en sangre. Normalmente existen en pequeña concentración, pero ésta aumenta enormemente en respuesta a una inflamación aguda. Son producidas por el hígado e inducidas por IL-1 circulante. Algunas de ellas, principalmente la proteína C reactiva, pueden ser medidas en sangre para el seguimiento del proceso inflamatorio (Stevens, op.cit).



U.N.A.M. CAMPUS

11.-Fármacos antiinflamatorios.

La respuesta inflamatoria aguda puede tratarse con fármacos antiinflamatorios, que impiden la producción de los mediadores fundamentales de la inflamación.

IZT.

Estos fármacos pueden ser de dos tipos:

I.- **Los fármacos esteroides**, entre los más utilizados son: Dexametasona, Cortisona, Hidrocortisona, Prednisona y Prednisolona (Goodman , et al, 1996).

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

a) Estimulan la síntesis de la lipocortina, proteína que inhibe a la fosfolipasa A2, esto disminuye la liberación del ácido araquidónico y la síntesis de sus metabolitos.

b) Inhiben a la óxido nítrico sintetasa y la transcripción de las citocinas: IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-8 y TNF- α ; ésto a su vez inhibe la expresión de moléculas de adhesión de las células endoteliales (Barnes, 1993).

El uso continuo de fármacos de tipo esteroideal causa los siguientes efectos colaterales indeseables: mayor susceptibilidad a la infección, úlcera péptica, miopatía, nerviosismo, insomnio, cambios del estado de ánimo, se han observado cataratas subcapsulares posteriores en niños, osteoporosis y fracturas vertebrales por compresión, inhibición del crecimiento en niños (Goodman, op.cit).

II.- **Los fármacos no esteroidales**, los más utilizados son: el ácido salicílico, ibuprofén, indometacina y fenilbutazona (Goodman et. al, 1996).

Los fármacos no esteroidales inhiben a la ciclooxigenasa, enzima que cataliza la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas (PGE2, PGF2, PGD2), tromboxanos y prostaciclina; además inhiben la migración de leucocitos y macrófagos hacia el sitio lesionado e inhibe la agregación plaquetaria (Higgs, 1987).

Los fármacos no esteroideos tienen en común varios efectos indeseables; el más frecuente es la propensión a inducir úlcera gástrica o intestinal que a veces puede acompañarse de anemia secundaria por la pérdida de sangre, disturbios en la función plaquetaria, reducen el flujo sanguíneo renal y la tasa de filtración glomerular en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva o cirrosis hepática (Goodman, et al, 1991).

12.-Medicina Tradicional.

Hoy en día la realización de investigaciones en busca de fármacos que presenten una mejor acción terapéutica y a su vez permitan disminuir los efectos colaterales ha sido poco satisfactoria, tal es el caso de los fármacos antiinflamatorios los cuales se sintetizan a partir de estructuras químicas ya existentes dando como resultado compuestos con mínimas diferencias farmacológicas.

Por lo que es necesaria la búsqueda de nuevas alternativas. Una fuente para tal búsqueda la constituyen las plantas, que tienen gran aceptación además de que son muy utilizadas en la medicina tradicional.

En México existe una gran variedad de plantas que se utilizan para el tratamiento de padecimientos inflamatorios. Algunas de las más destacadas, tomando como referencia la recomendación que de ellas hace la medicina tradicional popular son: Capulín (*Cerasus capuli.*) se usan las hojas y la corteza en infusión; linaza (*Linus usisatissimum*) se usan las hojas en cataplasma sobre la parte inflamada; tejocote (*Craetaegus mexicana*) se utiliza la raíz en infusión; vid coral (*Cissus cucurbitita*) se emplea como cataplasma tanto tallos como hojas; malva (*Malva silvestres*) se usan las flores en infusión; pipicha (*Porophyllum tagetoides*) se emplea la parte aérea en infusión, y varias especies de sábila (*Aloe*) (Sámamo,1995).

Para la realización de este trabajo se utilizó como objeto de estudio a la hierba *Porophyllum tagetoides*, especie conocida comúnmente como pipicha

y recomendada por la medicina tradicional popular en el tratamiento de algunos padecimientos que involucran estados inflamatorios.

***Porophyllum tagetoides* (HBK.) DC.**

13.-Sinonimia popular:

Porophyllum tagetoides recibe varios nombres de acuerdo al estado o región en que se encuentre por lo que en: Guerrero se le conoce como "Pipicha, Yiwandusurú cuali", en Oaxaca es llamada "Chepiche", en el Valle de México es conocida como "Papalo quilit" (Cabrera, et al, 1998).

14.-Taxonomía:

Porophyllum tagetoides común mente llamada pipicha, se clasifica dentro de la familia Compositae, su género es *Porophyllum*, y la especie *tagetoides* (Sánchez, 1980).

15.-Descripción Botánica:

Porophyllum tagetoides es una hierba anual ramosa procumbente con los tallos prismáticos que mide de 20 a 30 cm de altura, hojas angostas, elíptico-lineares de 10 a 12 mm de largo. Cabezuelas terminales sobre pedúnculos de 3 a 5 cm de alto. Aquenios con vilano de múltiples cerdas blancas. Muy aromática (Sánchez, op.cit).



FIGURA 5.- *Porophyllum tagetoides*.

16.-Distribución Geográfica:

Su distribución geográfica incluye: Guerrero (Alcozauca de Guerrero), Durango, Jalisco, Oaxaca, y en el Valle de México (en la sierra de Guadalupe y la Cañada de Contreras).

Crece en bosques de encino abiertos, también se le encuentra como ripario y arvense entre los 1200 y 2700 m.s.n.m (Cabrera, et al, 1998).

17.-Usos medicinales:

En la medicina tradicional popular se usa *Porophyllum tagetoides* para el tratamiento de algunos malestares y/o enfermedades tales como: angiocolitis

con ictericia, hipo, colelitiasis, pectoral, fetidez de los enfermos y heridos del rayo (Díaz, 1976 y Sámano, 1995).

II.- ANTECEDENTES.

Usos de *Porophyllum tagetoides*:

- Comestible: La parte aérea se consume en crudo y cocida como condimento de la sopa de alaches y de distintos chilates.
- Forrajero: el ganado en pastoreo consume la parte aérea.
- Medicinal: La infusión de las hojas se emplea para el dolor de estómago.
- Martínez (1961) menciona que *Porophyllum tagetoides* se recomienda por la medicina tradicional popular en el tratamiento de algunos padecimientos que involucran estados inflamatorios.

III.- JUSTIFICACIÓN.

La gran variedad de fármacos que se utilizan para el tratamiento de muchos padecimientos suelen presentar efectos colaterales (indeseables) tal como: náuseas, mareos, insomnio, entre otros, por lo que es necesario realizar una búsqueda de nuevos fármacos que presenten un mínimo efecto nocivo(colateral) y al mismo tiempo un buen efecto terapéutico. Para ello la medicina tradicional nos muestra una gran alternativa para tal búsqueda, "las plantas". Muchas de ellas son muy utilizadas para la cura de diversos malestares (enfermedades); tal es el caso de *Poropyllum tagetoides* la cual se recomienda a nivel empírico para la cura de algunos padecimientos que involucran estados inflamatorios; pero no se ha validado farmacológicamente dicha propiedad terapéutica con modelos experimentales de inflamación. Por este motivo en el presente trabajo nos propusimos los siguientes objetivos:

IV.- OBJETIVOS

Objetivo General:

Corroborar las propiedades antiinflamatoria y analgésica de la hierba *Porophyllum tagetoides* en modelos experimentales de inflamación aguda y dolor en roedores.

Objetivos particulares:

1. Preparar los extractos acuoso y metanólico de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides*.
2. Probar los efectos de los extractos acuoso y metanólico de *Porophyllum tagetoides* sobre el proceso inflamatorio con los métodos de formación de edema y migración celular inducidos con carragenina en ratas.
3. Corroborar el efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* en la disminución de dolor con el modelo de inducción de contorsiones abdominales con ácido acético en ratones.
4. Probar si el extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* presenta algún efecto tóxico agudo en ratones a dosis elevadas.

V.- MATERIAL Y METODOS

1. Obtención del material biológico.

La planta *Porophyllum tagetoides* se adquirió en el Mercado de la Merced de la Ciudad de México donde la reciben de los Estados de Morelos y Puebla, y posteriormente la Biól. María Edith López Villafranco corroboró su identidad en el Herbario de la FES Iztacala, UNAM y se depositó un ejemplar para la colección con número de depósito 2891

Para el modelo experimental se utilizaron ratas Wistar, machos, de 250-300 g de peso corporal, los cuales se mantuvieron en cautiverio bajo un régimen de dieta estándar con toma libre de agua. También se utilizaron ratones machos de la cepa CD1, de 20-25 g de peso corporal, los cuales se mantuvieron en las mismas condiciones señaladas anteriormente.

2. Preparación del extracto acuoso.

- 1) Se fragmentó y se pesó la parte aérea de *Porophyllum tagetoides*, se lavó y se puso en agua destilada a ebullición durante 10 minutos, en una proporción de 1g de planta por 20 ml de agua.
- 2) Para eliminar los restos de material vegetal el extracto se filtró y después se colocó en un vaso de precipitados previamente pesado, posteriormente se secó en horno a una temperatura de 60°C durante 24 horas, aproximadamente.
- 3) Se determinó el peso del extracto seco y se resuspendió en solución salina estéril (Abbot).
- 4) El pH se ajustó a 7.4 con gotas de solución de NaOH al 1 N y se guardó en viales manteniéndose en congelación hasta el momento de ser utilizado.

3. Investigación de la actividad antiinflamatoria.

3.1. Edema inducido con carragenina.

1)- Se formaron al azar 3 grupos de ratas, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía oral.

Grupo 1) Solución salina al 0.9 %.

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

Grupo 3) Extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 200 y 300 mg/kg de peso.

Una hora después de administrar los diferentes tratamientos, se inyectó 0.1 ml de carragenina al 1%, preparada con solución salina estéril al 0.9 %, en una de las extremidades posteriores de los animales en la región de la aponeurosis plantar. En la otra extremidad se aplicó un volumen igual de solución salina estéril al 0.9 %. Posteriormente, se procedió a obtener un registro durante el curso temporal de la formación de edema a través del incremento del volumen en las extremidades tratadas durante cuatro horas. Las mediciones se hicieron a intervalos de una hora, siguiendo el método de desplazamiento del mercurio propuesto por Van Arman y col. (1965), el cual consiste en medir la presión que ejerce el desplazamiento del mercurio en una columna, al introducir las extremidades tratadas con carragenina (inflamación) y solución salina (control). La columna de mercurio se encuentra conectada a un transductor de presión P-1000 A (Narco Bio Systems), a su vez interconectado a un amplificador y un sistema de registro, en este caso un fisiógrafo de mesa Mod. DMP-4B (Narco Bio Systems). La diferencia de volumen registrada entre las dos extremidades posteriores a las cuales se administró carragenina y solución salina, respectivamente, se consideró como el edema producido y se expresó en μl .

3.2. Migración celular.

1) Se formaron al azar 3 grupos de ratas, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía oral:

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

Grupo 2) Dexametasona 1 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 300 mg/kg de peso.

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

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

4) Del líquido peritoneal de cada uno de los animales, se recuperaron 5 ml de líquido, se tomaron muestras de 20 µl que se diluyeron en 400 ml de violeta de genciana en ácido acético, para la cuenta total de leucocitos en la cámara de Neubauer .

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

6) De esta suspensión se aplicaron 1 y 2 gotas, respectivamente, sobre portaobjetos cubiertos con papel filtro que se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

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

8) Se hizo la cuenta diferencial de células blancas de acuerdo con el método propuesto por Souza y Ferreira (1985), que consiste en registrar el número de

neutrófilos de entre los diferentes grupos de leucocitos para calcular la migración de neutrófilos hacia la cavidad peritoneal.

4. Prueba de analgesia.

Para determinar si el extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* tiene la propiedad de disminuir el dolor se probó en el modelo de inducción de contorsiones abdominales con ácido acético como agente irritante.

1) Se formaron al azar 3 grupos de ratones machos de la cepa CD1, de 20-25 g de peso corporal, a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos por vía oral:

Grupo 1) Solución salina estéril.

Grupo 2) Indometacina 10 mg/kg de peso.

Grupo 3) Extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 300 mg/kg de peso

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

3) Una vez administrado el ácido acético, se contó el número de contorsiones.

5.-Toxicidad aguda.

Un preparado para tener utilidad medicinal, además de mostrar efecto terapéutico, debe ser inocuo. Por lo cual se investigó si dosis mayores del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* mostraban efectos tóxicos agudos. Para ello, nuevamente se formaron 3 grupos de cinco ratones y a cada grupo se le administraron por vía intraperitoneal diferentes dosis.

1) 1.5g/kg del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides*.

2) 3g/kg del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides*.

3) 5g/kg del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides*.

Después se observaron durante las siguientes seis horas para determinar la aparición de signos de toxicidad aguda como ataxia, sedación o muerte.

6. Análisis estadístico.

De los resultados obtenidos de todos los experimentos se calcularon la media de cada uno de los grupos y el error estándar de la media. Para determinar la significancia entre los tratamientos aplicados, se utilizó la prueba "t de Student" para una $P < 0.05$.

VI. RESULTADOS.

El objetivo del presente estudio fue corroborar si el extracto acuoso de las partes aéreas de la hierba *Porophyllum tagetoides* (pipicha) tiene propiedades antiinflamatorias y debido a ello puede inhibir los mecanismos que participan en el desarrollo de la inflamación, entre los cuales están: la formación del exudado plasmático inflamatorio (edema), la migración de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) hacia la zona lesionada (quimiotaxis) y la supresión del dolor (analgesia).

1.- Rendimiento de las extracciones.

Se inició el estudio por coleccionar la planta y preparar los extractos acuoso y metanólico de la parte aérea.

En la tabla 2 se muestran los rendimientos del material extraído con agua y metanol de las ramas de la planta. De 100g de la parte aérea se pueden obtener 4g de material soluble en agua y 0.7g de compuestos solubles en metanol.

<i>Porophyllum tagetoides</i>	Gramos	Porcentaje
Planta	30 g	100%
Extracto Acuoso	1.20 g	4.0%
Extracto Residual	0.99 g	3.3%
Extracto Metanólico	0.21g	0.7%

TABLA 2.- Rendimiento de los extractos de *Porophyllum tagetoides*.

Para probar los efectos del material extraído con agua de la parte aérea de la pipicha sobre el proceso inflamatorio se emplearon 2 modelos de

inflamación aguda: la formación de edema y la migración celular inducidos por carragenina.

2.-Formación de edema.

En el ensayo de la formación de edema inducido por la carragenina se observó que la extremidad posterior del grupo control (sin tratamiento) mostró un incremento de volumen dependiente del tiempo que llegó al máximo en cuatro horas; el incremento de volumen fue de $438 \pm 27 \mu\text{l}$ en este tiempo(Figura 6). El grupo tratado con indometacina (fármaco antiinflamatorio no esterooidal), en el mismo lapso de tiempo, mostró un incremento de $105 \pm 23 \mu\text{l}$; es decir, la indometacina previene la formación de edema en un 76%(Figura 6).

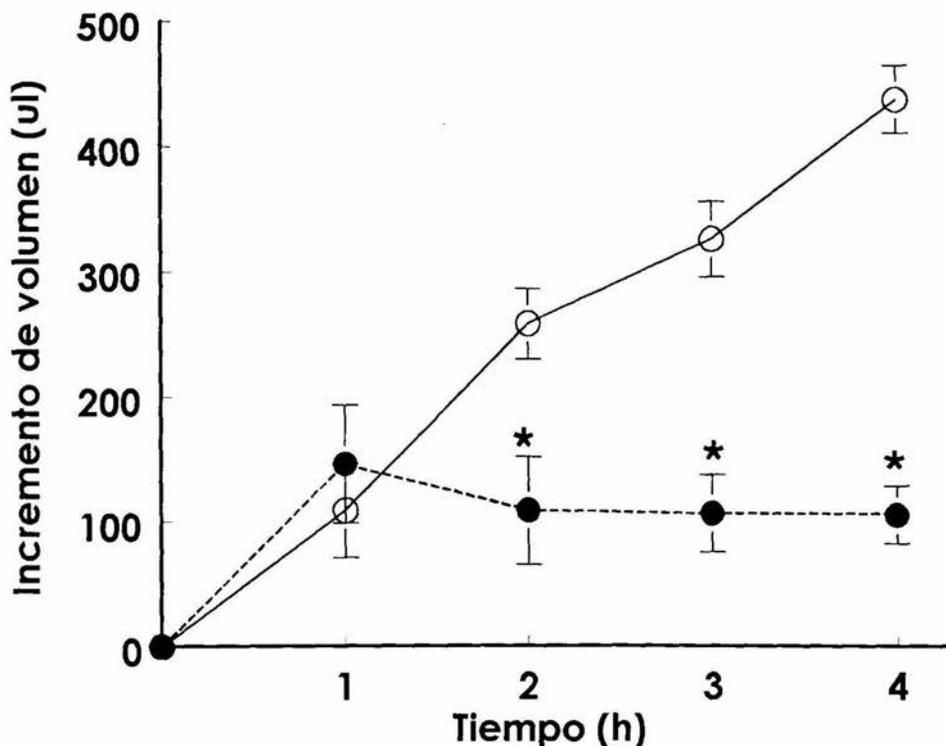


FIGURA 6.- Efecto de la Indometacina 10 mg/kg (●) y solución salina (O), administrados por vía oral sobre el edema Inducido por 0.1 ml de carragenina (1 %) en la extremidad posterior de la rata (n=5, * p<0.05).

3.- Actividad antiedema del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides*.

Se inició por probar el efecto del extracto acuoso de la pipicha sobre el edema inducido con carragenina en la región plantar de las extremidades inferiores. Los resultados se presentan en la Figura 7.

En este experimento el grupo de organismos a los que se les administró solución salina (0.9%) por vía oral mostró el máximo nivel de formación del edema a las 4 h después de aplicar la carragenina con un incremento del volumen de $499 \pm 55 \mu\text{l}$, sobre la extremidad sana. Lo cual indica que esta sustancia promueve la exudación plasmática inflamatoria máxima a las 4 h de aplicarla en los tejidos plantares (Figura 1).

El edema causado por la carragenina se puede prevenir con la administración de un fármaco antiinflamatorio. En este ensayo se empleó la indometacina (10 mg/kg, vía oral) que es un antiinflamatorio de tipo no esteroide como fármaco de referencia. En los animales tratados con indometacina el incremento de volumen que se observó fue de $87 \pm 20\mu\text{l}$; es decir, se previene la formación del edema en un 82% en comparación con el grupo control.

Cuando se administró el extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 200 mg/kg (vía oral) el incremento de volumen fue de $383 \pm 51 \mu\text{l}$; es decir, se previno el 23% de la formación de edema, mientras que con la dosis de 300 mg/kg (vía oral) se previno el 41% ($190 \pm 63 \mu\text{l}$) (Figura 7).

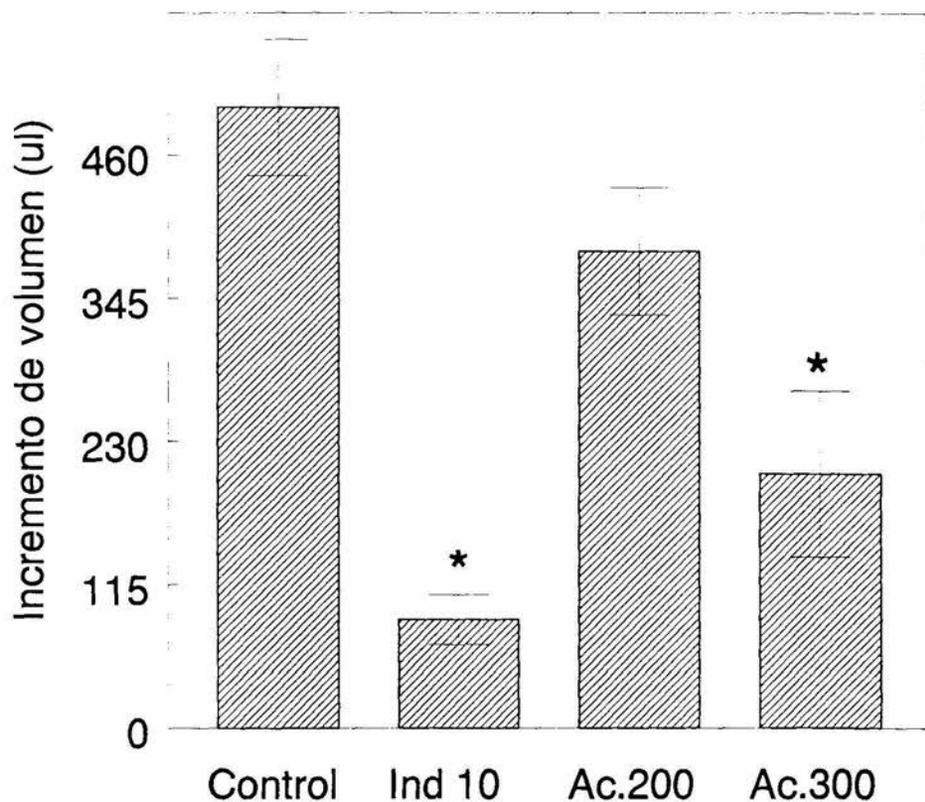


FIGURA 7.- Efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 200 y 300 mg/kg, indometacina 10 mg/kg y solución salina, administrados por vía oral, sobre el edema inducido por 0.1ml de carragenina al 1% en la extremidad posterior de la rata (n = 5; * p < 0.05 comparada con el control).

4.Migración celular.

Después de corroborar el efecto antiedema del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* se procedió a probar el efecto sobre la migración leucocitaria inflamatoria que es otro de los procesos importantes de la inflamación. Se empleó el modelo de inducción de la migración celular a la cavidad peritoneal irritada con carragenina. En la figura 8 se muestran los resultados de este bioensayo.

El grupo control tratado con solución salina (vía oral) presentó una aparición de neutrófilos de $15,705 \pm 934$ células/ μl en la cavidad peritoneal.

En los organismos tratados con el fármaco estándar dexametasona (antiinflamatorio esteroidal) a la dosis de 1 mg/kg (vía oral) se previno la migración de células en un 66% ($5,254 \pm 179$ células/ μl).

El extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* (300 mg/kg, vía oral) disminuyó el número de neutrófilos presentes en el lavado de la cavidad peritoneal irritada a $9,492 \pm 1,142$ células/ μl ; es decir, se previno en un 40% la migración celular (Figura 8).

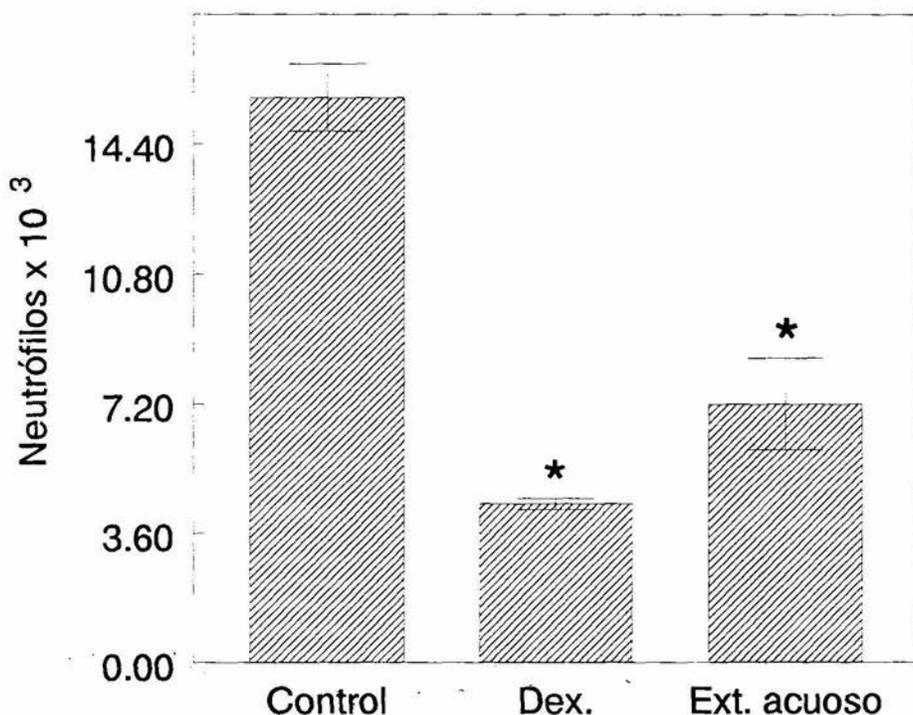


FIGURA 8.- Efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 300mg/kg, solución salina y dexametaxona, por vía oral, sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal irritada con carragenina (300 $\mu\text{g}/3\text{ml}$) ($n = 5$; $*p < 0.05$ comparado con el grupo control).

5. Efecto analgésico de *Porophyllum tagetoides*.

La mayoría de los fármacos antiinflamatorios de tipo no esteroidal son además analgésicos y antipiréticos; por ello, probamos el efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* sobre el dolor. En la figura 9 se puede observar que el grupo control fue el que mayor dolor mostró considerando que fue el que tuvo un promedio de 36 ± 3 contorsiones en un lapso de 20 minutos, a partir de la aplicación del ácido acético (60 mg/kg, vía intra peritoneal). En el grupo tratado con el fármaco antiinflamatorio de referencia indometacina (10 mg/kg, vía oral), se registraron 7 ± 2 contorsiones; es decir, mostró una disminución del 80% en las contorsiones causadas por el ácido acético en comparación con el grupo de ratones control. Los ratones tratados con el extracto acuoso de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides* (300 mg/kg, por vía oral) mostraron 18 ± 4 contorsiones, lo que indica una reducción del 50% en comparación con el grupo control, demostrando su efecto analgésico.

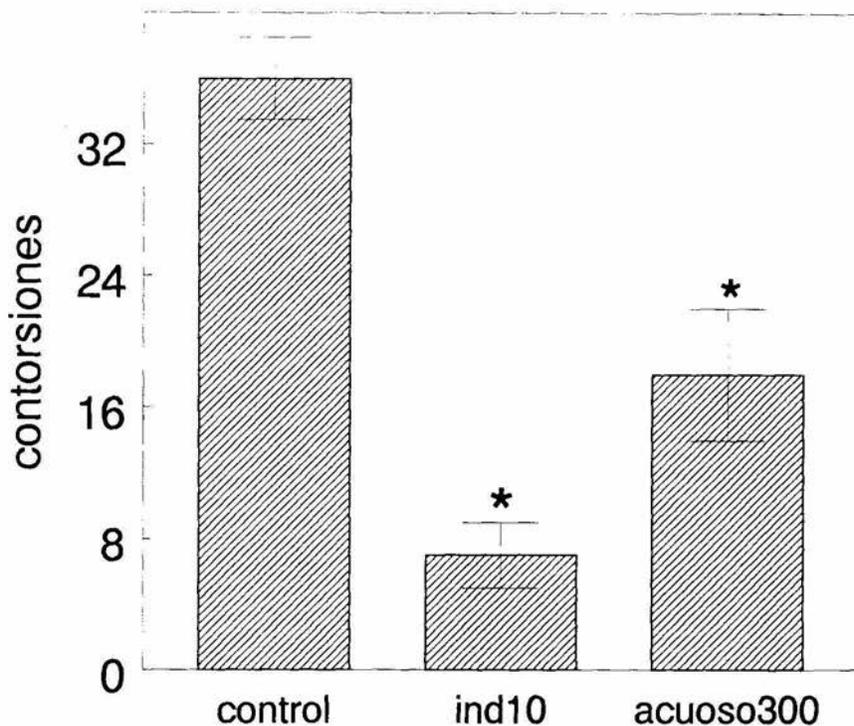


FIGURA 9.- Efecto del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* 300mg/kg, indometacina 10mg/kg y solución salina, administrados por vía oral sobre las contorsiones inducidas por la administración intraperitoneal de ácido acético (60mg/kg) (n =5,* p < 0.05 comparado con el control).

6.Toxicidad.

Durante el desarrollo de fármacos nuevos, además de probar la eficacia terapéutica de un preparado, se demuestra su inocuidad; es decir, que carezca de efectos colaterales nocivos o tóxicos. Por lo cual se probó la posible toxicidad aguda de dosis altas del extracto acuoso de la pipicha. Los resultados se presentan en la Tabla 3 e indican el efecto tóxico letal en dosis de 3,000 y 5,000 mg/kg, vía intraperitoneal, a los 12 minutos. En dosis de 1.5mg/kg (5 veces la dosis terapéutica) la aparición de organismos muertos tarda 5 horas.

GRUPO	DOSIS	OBSERVACIONES
1	1.5 g/kg de peso (5 veces la dosis terapéutica)	Se observaron contorsiones intensas a los 4 min, 14 min después sufrieron ataxia, 27 min después disminuyeron las contorsiones y solo presentaron ataxia; 5 h después murieron.
2	3 g/kg de peso (10 veces la dosis terapéutica)	Se observaron convulsiones a los 9 min y a los 12 min presentaron paro cardiorrespiratorio.
3	5 g/kg de peso (16 veces la dosis terapéutica)	Se observaron convulsiones a los 8 min y a los 12 min presentaron paro cardiorrespiratorio.

TABLA 3.- Toxicidad aguda del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides*.

7. Fraccionamiento químico del extracto acuoso.

Con el fin de realizar una aproximación hacia el aislamiento del principio activo antiinflamatorio de *P. tagetoides*, se fraccionó el extracto acuoso con metanol obteniéndose 2 fracciones: el extracto metanólico y un precipitado. Ambas fracciones se probaron en el bioensayo de formación de edema y los resultados se muestran en la Figura 10.

7.1.- Edema.

Se observó que en el grupo control hubo un incremento de volumen de $409 \pm 38 \mu\text{l}$ a las 4 h de la aplicación de la carragenina. La fracción residual (insoluble en metanol, pero soluble en agua) no afectó el progreso de la inflamación ($356 \pm 23 \mu\text{l}$) pero la fracción del extracto metanólico causó una reducción en la formación del edema a un incremento de volumen de la pata de $268 \pm 31 \mu\text{l}$; es decir, un 34.5% de disminución de la formación del edema (Figura 10).

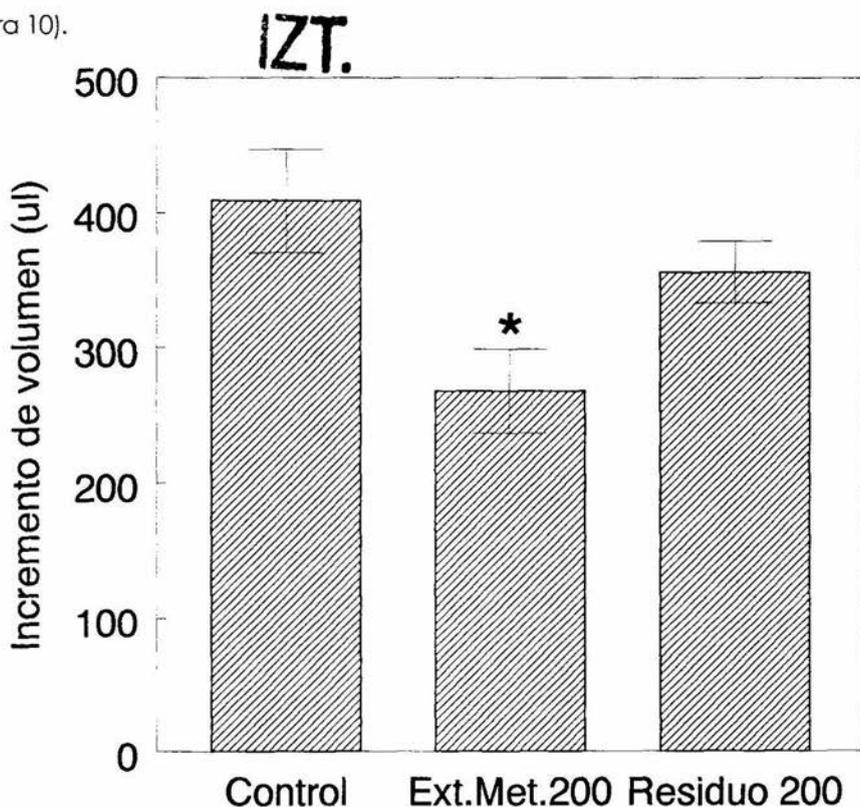


FIGURA 10.- Efecto de la fracción metanólica y el residuo del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* ambos en la dosis de 200mg/kg y solución salina, administrados por vía oral, sobre el edema inducido por 0.1 ml de carragenina al 1% en la extremidad posterior de la rata (n = 5; * p < 0.05 comparado con el control).

7.2.-Efecto de *Porophyllum tagetoides* sobre la migración celular.

Ya que la fracción metanólica del extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* mostró poseer el efecto antiedema, se investigó si afectaba la migración de leucocitos.

IZT.

En la figura 11 se muestra el efecto producido por el extracto metanólico de *P. tagetoides* sobre la migración de los neutrófilos causada por una irritación de la cavidad peritoneal con 300 μ g de carragenina; se observó que en el control migraron $13.15 \times 10^3 \pm 950$ neutrófilos/ mm^3 . La dexametasona (fármaco antiinflamatorio de tipo esteroidal) redujo la migración celular en un 66% ($4.4 \times 10^3 \pm 150$ neutrófilos/ mm^3) y el extracto metanólico de *P. tagetoides* en la dosis de 200 mg/kg de peso no inhibió la migración de leucocitos a la zona inflamada.

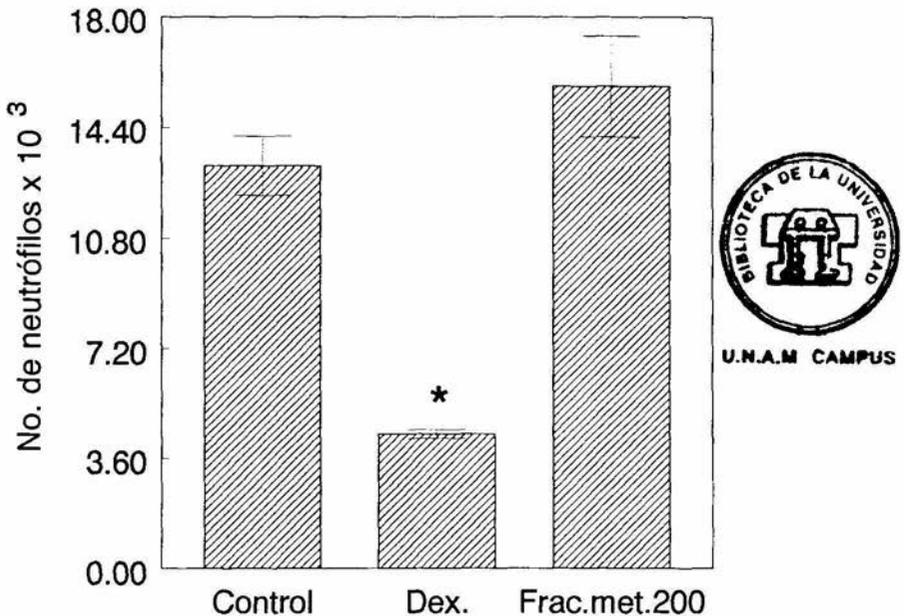


FIGURA11.-Efecto de la fracción metanólica de *Porophyllum tagetoides* (200 mg/kg), dexametasona(1mg/kg) y solución salina(1ml), por vía oral, sobre la migración de neutrófilos a la cavidad peritoneal irritada con carragenina (300 mg/3ml) (n =5; * p<0.05).

VII.- DISCUSION

1.- Efecto del extracto acuoso de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides* sobre el edema.

Fue posible establecer el método para la evaluación del efecto del extracto acuoso de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides* sobre el edema intraplantar causado con carragenina ya que los organismos control mostraron un incremento de volumen de 499 μ l. El edema causado con el polisacárido carragenina es iniciado por la liberación de histamina y bradicinina, mediadores químicos de la inflamación que producen vasodilatación y dolor; la inflamación es mantenida por las prostaglandinas también vasodilatadoras y algésicas a las 3 horas de la aplicación del polisacárido (Di Rosa, 1972). El antiinflamatorio no esterooidal indometacina (inhibidor de la enzima ciclooxigenasa que sintetiza los mediadores inflamatorios prostaglandinas) inhibió el proceso inflamatorio en un 82%. Los resultados observados con el extracto acuoso muestran la presencia de compuestos con efecto antiinflamatorio ya que redujeron la formación del edema en un 23% y 41% a las dosis de 200 y 300 mg/kg, respectivamente; lo que indica la existencia de una relación dosis - efecto. Estas sustancias resisten la acidez gástrica y la acción hidrolítica de las enzimas digestivas, ya que tienen efecto al ser administrados por la vía oral; además son estables al calor, ya que se extrajeron con agua a ebullición.

2.-Efecto del extracto acuoso sobre migración celular.

El extracto acuoso(300 mg/kg) reduce la migración en un 40%, lo cual indica que este preparado, además de reducir la formación del exudado plasmático inflamatorio, también inhibe el aumento de leucocitos neutrófilos desde el torrente circulatorio hacia los sitios de lesión, atraídos por factores quimiotácticos como subcomponentes del complemento (C3a y C5a) y

leucotrienos B4 (Mc Cance y Huether, 1998); ya que funcionan fagocitando los agentes invasores y liberando otros mediadores químicos de la inflamación como las prostaglandinas.

3.-Efecto analgésico del extracto acuoso de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides*

Los fármacos antiinflamatorios de tipo no esteroidal también tienen propiedades analgésicas, por lo cual probamos este efecto empleando el modelo de contorsiones en ratones a los que se causó dolor por la aplicación intraperitoneal de ácido acético en el cual está involucrada la generación de prostaglandinas sintetizadas por la enzima ciclooxigenasa (Duarte y col., 1988) . Este dolor lo inhibió la indometacina en un 80% y también el extracto acuoso en un 50% (300 mg/kg), corroborando su actividad analgésica.

4.-Efecto tóxico del extracto acuoso de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides*.

Al evaluar la toxicidad aguda de una decocción de la parte aérea de *Porophyllum tagetoides* administrada en ratones machos a las dosis de 1, 500 (5 veces la dosis terapéutica de 300 mg/kg), 3, 000 (10 veces la dosis terapéutica) y 5, 000 mg/kg (16 veces la dosis terapéutica) se observaron efectos nocivos y muerte. Guillet y col. (1998) informaron que *P. gracile* y *P. ruderale* contienen el insecticida alfa-tertienil, compuesto que podría ser la causa de la toxicidad observada en *P. tagetoides*.

5. Fraccionamiento del extracto acuoso de *P. tagetoides*.

Con el fin de obtener una porción activa con menos componentes químicos se separó el extracto acuoso en dos partes, una con los componentes

solubles en metanol y otra con los insolubles en metanol (seguramente formado por polisacáridos y proteínas) pero solubles en agua.

6.-Actividad antiedema de la fracción metanólica de *Porophyllum tagetoides*.

Al separar del extracto acuoso las sustancias solubles en metanol (metabolitos secundarios) y evaluarlas en el modelo de edema se observó que inhiben en un 34.5%; estos resultados nos muestran que las sustancias solubles en metanol (en general, metabolitos secundarios) tienen compuestos antiinflamatorios. Entre los metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias se encuentran las coumarinas, las sesquiterpenolactonas, alcaloides, esteroides y flavonoides. La fracción residual (compuestos insolubles en metanol, pero solubles en agua) no inhibió la formación de edema.

7.-Efecto de la fracción metanólica de *Porophyllum tagetoides* sobre la migración celular.

La fracción metanólica no mostró inhibición de la migración celular causada por irritación con carragenina en la cavidad peritoneal, efecto que sí mostró el antiinflamatorio esteroide dexametasona, ya que estimula la síntesis de la lipocortina proteína que inhibe a la fosfolipasa A₂ en consecuencia disminuye la liberación del ácido araquidónico y la síntesis de sus metabolitos tal como el leucotrieno B₄, que promueve la migración celular (Barnes, 1993). Con lo cual parece ser que los antiinflamatorios presentes en la fracción residual son de tipo no esteroide (similares a la indometacina) y podrían inhibir la actividad de la ciclooxigenasa que genera prostaglandinas, que son los principales mediadores químicos en la inflamación provocada con la carragenina, pero que requieren de dosis mayores para inhibir la migración de neutrófilos (Hardman y col., 1996).

VIII.- CONCLUSIONES.

El extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* fue capaz de disminuir la formación de edema inducido con carragenina ya que inhibió la formación del exudado plasmático y la migración de leucocitos neutrófilos hacia la zona lesionada.

El extracto metanólico fue capaz de disminuir el edema pero no inhibió significativamente la migración celular hacia la cavidad peritoneal.

El extracto acuoso pudo reducir el dolor, ya que se observaron menos contorsiones inducidas con el ácido acético que en el control.

El análisis toxicológico indica que el extracto acuoso de *Porophyllum tagetoides* presenta efectos letales agudos.

Por lo antes mencionado es necesario hacer estudios para determinar la composición química y conocer su valor terapéutico; así mismo debe conocerse la estructura y la cantidad de metabolitos secundarios presentes para saber si podría hacerse un aprovechamiento de estos.

Por último es necesario decir que el uso de las plantas medicinales lleva beneficios terapéuticos y económicos implícitos, por lo que se debe fomentar aun más el interés para el estudio químico-farmacológico de las plantas medicinales ya que la mayoría de los compuestos que se emplean actualmente en la farmacoterapia presentan diversos efectos colaterales que en ocasiones llegan a hacer severos.

IX.-BIBLIOGRAFÍA.

Barnes, P. J. and Adcock, L. (1993). Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanisms. *Tips*. 14: 436-441.

Bowman y Rand. (1984) Bases Bioquímicas y Patológicas. Editorial Interamericana. Segunda edición. Páginas: 13.1- 13.29.

Cabrera T. J J, A. Casas, F, M. C. Rojas, C. y J. L. Viveros(1998) *Alimentos en la naturaleza. Algunas plantas comestibles, silvestres arvenses y ruderales*. SEMARNAP. México.D:F. Página: 160.

Contran, R. S., V. Kumar, S. L. Robbins, F. J. Schoen(1995) Patología estructural y funcional. Quinta edición. Editorial Mc. Graw Hill Interamericana de España, Madrid. Páginas: 57-104.

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

Di Rosa, M. (1972). Biological properties of carrageenan. *J. Pharm. Pharmac.* 24: 89-102.

Down Fawwcett y R. P. Jensch.(1999) Compendio de histología .Editorial Interamericana. Madrid España. Páginas: 37-39.

Duarte ID, Nakamura M, Ferreira SH. (1988). Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Braz J Med Biol Res* 21(2):341-3.

Gartner, L. y James I. Hiatt(1997) Histología Texto y Atlas. Editorial Interamericana, México. Página: 106.

Geneser Finn (2000) Histología sobre bases biomoleculares. Tercera edición. Editorial Medica Panamericana. Madrid España. Página: 216.

Guillet, S. Bélanger, A. and T. J Arnanson(1998) Volatile monoterpenes in porophyllum gracile and P. ruderale (Asteraceae): Identification, localization and insecticidal synergism with α -tertimenyl. Phytochemistry

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

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

Higgs, G. A., Salmon, J. A., Henderson, B. y Vane, J. R. (1987).Pharmacokinetics of aspirin and salicylate in relation to inhibition of arachidonate cyclooxygenase and antiinflammatory activity. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 1417-1420.

Martínez M. (1987) Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas Mexicanas. Fondo cultural económica. México.

Martínez, M. (1961). Edición facsimilar. Las plantas medicinales de México. Editorial. Botas. México. Páginas: 291-347.

Martínez Peña J. (1998) Inmunología. Ediciones Pirámide. Madrid.

McCance, K. L. y S. E. Huether (1998). Pathophysiology. The biologic basic for disease in adults and children. 3a ed., Ed. Mosby, Nueva York: 205-236.

Pardo Mirand (1991) Anatomía Patológica General. Ediciones Diosa. España.

Robbins S. (1997) Patología Básica . Novena edición. Editorial Interamericana. Méx. D. F.

Roitt, I., J. Brostoff, D. Male (1998). Immunology. Quinta edición. Mosby, New York: Páginas: 61 –69.

Ross H. M. y L. J Romroll y G. Kaye (1997) Histología texto y atlas a color. Tercera edición. Editorial Panamericana. México. Páginas: 90-92.

Samano. T. L. 1995) Antiguo herbario medicinal Azteca. Gómez Gómez Hermanos editores. México.

Sánchez Sánchez, O. (1980). La flora del valle de México. Sexta edición. México.

Souza, G. E. P. y S. E. Ferreira (1985). Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents and Action* 17: 97-103.

Stevens, A. y Lowe, J. (1996). Texto y atlas de Anatomía patológica. Editorial. Mosby/Doyma. España. Páginas: 57-71.

Stites. P. D. (1995). Inmunología Basica y Clínica. Editorial. Manual moderno. Novena edición. México.

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