



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante) en un modelo de ratones CD1.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

JONATHAN URIEL URBINA SOTO

Director de tesis: M. C. Maurilio Flores Pimentel

Asesor de tesis: M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez

Laboratorio 1, PA, UMIEZ, FES ZARAGOZA, UNAM



MÉXICO, D.F. MAYO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A la memoria de mi padre Juan Urbina Flores por su insuperable ejemplo de esfuerzo, trabajo y valores, por haberme brindado su amor, tiempo, trabajo y paciencia a lo largo de la vida, por enseñarme a ser una gran persona, por ser una fuente de inspiración para seguir siempre adelante. Desde el lugar en donde te encuentres, el lugar a donde van las grandes y hermosas personas como tú, espero te sientas orgulloso de mí, como yo siempre lo estaré de ti.

Te extraño mucho papá.

A mi madre Elsa Cecilia Soto González por todo su gran amor, dedicación y esfuerzo hacia conmigo y su familia, por su comprensión, tolerancia y fortaleza, que son infinitas en ti y que te hacen ser una gran mujer mamá.

Gracias por todos sus grandes sacrificios, que en algún tiempo fueron incomprendidos, por transmitirme lo más grande y maravilloso que poseen, sus valores, costumbres y forma de ser, por creer en mí, por ser la principal razón que me motivó en todo momento para poder alcanzar uno de mis sueños y una meta más en la vida. Este gran logro es el reflejo de todo lo que han hecho por mí, y que siempre, cada día de la vida tendré presente.

¡Me siento muy orgulloso de ser hijo de ustedes!

A mis hermanos y hermanas, por su apoyo y confianza que siempre he recibido por parte de cada uno de ustedes, por sus ejemplos, consejos, regaños y palabras que me han ayudado a cumplir esta meta, los amo a todos.

A mis amigos Aristóteles, Francisco, Pedro, Luis, Carlos, Arturo y a todos los “cachunes”, por compartir todos estos años de amistad tanto en lo académico como en la vida personal, gracias por todos los momentos de alegría, los ánimos y por todos los recuerdos que serán para siempre.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la gran oportunidad de pertenecer a ella, la máxima casa de estudios de México.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por permitirme un lugar dentro de ella, el lugar donde me forme profesionalmente, donde mi mente adquirió conocimientos, se forjó de consciencia y de anhelos de ser capaz de aportar hechos y actos que sean útiles para poder mejorar a nuestro país. Siempre ha sido y será un privilegio y un enorme orgullo haber pertenecido a esta institución, mi Facultad.

A mi Director de tesis, el Médico Cirujano Maurilio Flores Pimentel por su apoyo, confianza y tiempo que dedicó en la realización de este proyecto, gracias por sus palabras de motivación, sus conocimientos y experiencia, muchas gracias por todo.

A mi Asesora de tesis, la Maestra en Ciencias Claudia Fabiola Martínez Rodríguez por su tiempo brindado en la elaboración de mi tesis.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura por todo su apoyo y conocimientos que tuve por parte de él en la elaboración de este trabajo experimental.

A mis sinodales, la Dra. Juana Rosado Pérez, la Mtra. Yolanda Flores Cabrera y la Mtra. Ma. del Rosario Benítez Velázquez, gracias por su tiempo invertido, por sus observaciones que me ayudaron a realizar un mejor trabajo.

A todos los que integran el Laboratorio 1, PA de la UMIEZ, el Dr. Rubén Marroquín Segura, el M. C. Maurilio Flores Pimentel, el Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara, la Mtra. Yolanda Flores Cabrera y la M. en C. Claudia Fabiola Martínez Rodríguez, gracias por todo su apoyo y por hacer de mi estancia en el laboratorio una experiencia muy agradable todo este tiempo, ya que además de ser excelentes investigadores y profesores, son unas grandes personas, muchas gracias por todo.

“La educación es el arma más poderosa que puedes usar para cambiar el mundo”

-Nelson Mandela

“La ciencia es la progresiva aproximación del hombre al mundo real”

-Max Planck

“Todos tenemos una máquina del tiempo, las que nos llevan al pasado son recuerdos, y las que nos llevan al futuro... son sueños”

-The time machine

CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. MARCO TEÓRICO	4
3.1 Plantas medicinales	4
3.2 Farmacognosia	5
3.3 Fitoquímica.....	5
3.4 Género <i>Kalanchoe</i>	6
3.5 <i>Kalanchoe beharensis</i> Drake (oreja de elefante)	7
3.6 Inflamación.....	9
3.6.1 Tipos de respuesta inflamatoria.....	10
3.6.2 Inflamación aguda	10
3.6.3 Inflamación crónica.....	11
3.6.4 Células inflamatorias	13
3.6.5 Mediadores químicos de la inflamación.....	15
3.7 Antiinflamatorios.....	21
3.7.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES).....	21
3.7.2 Corticoides.....	22
3.8 Bioensayo	24
3.9 Modelo experimental.....	24
3.9.1 Modelo experimental en animales	24
3.9.2 Diseño de la experimentación.....	25
3.9.3 Ratón	27
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
5. HIPÓTESIS	29
6. OBJETIVOS	30
6.1 Objetivo general	30
6.2 Objetivos específicos	30
7. DISEÑO EXPERIMENTAL	31
7.1 Tipo de estudio.....	31
7.2 Población de estudio.....	31

7.3	Variables	31
8.	MATERIAL	32
9.	MÉTODOS.....	35
9.1	Preparación del extracto acuoso.....	35
9.2	Ensayo de inflamación aguda: Modelo de edema en cojinete plantar de ratón con carragenina	36
9.3	Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con pellet de algodón	37
9.4	Determinación de nitritos.....	38
9.5	Análisis estadístico.....	40
10.	DIAGRAMA DE FLUJO	41
11.	RESULTADOS	44
11.1	Ensayo de inflamación aguda: Modelo de edema en cojinete plantar de ratón con carragenina.	46
11.2	Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con pellet de algodón.	47
12.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	49
13.	CONCLUSIONES.....	54
14.	PERSPECTIVAS	55
15.	REFERENCIAS	56

1. RESUMEN

Antecedentes. El enfoque al estudio de las plantas ha demostrado ser la estrategia más exitosa para el descubrimiento de nuevos fármacos, la información sobre el uso y las propiedades terapéuticas que poseen algunos géneros y especies de plantas, permite realizar estudios para evaluar sus posibles actividades farmacológicas, como lo es en este caso el género *Kalanchoe*.

Objetivo. Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante) en un modelo de ratones CD1.

Metodología. La planta fue autenticada en el herbario (FEZA)-UNAM, se le asignó el número FEZA 15053. Se realizó una extracción con agua, en un rotavapor. En el ensayo de inflamación aguda se utilizaron 5 grupos de 6 animales cada uno, se siguió el método del modelo de edema en cojinete plantar de ratón con carragenina. Para el ensayo de inflamación crónica se utilizaron 5 grupos de 6 animales cada uno siguiendo el modelo de formación de granuloma inducido con pellet de algodón, se extrajeron los pellets, se determinaron nitritos en suero y se calcularon los índices hepáticos, esplénicos y renales.

Resultados. Se observó que en la inflamación aguda los grupos tratados con el extracto presentan porcentajes bajos de inhibición de la inflamación sin tener alguna diferencia estadísticamente significativa contra el grupo control negativo. En el ensayo de inflamación crónica los grupos tratados con el extracto presentaron valores altos en los pesos de granuloma y en nitritos con una diferencia significativa, no se observó indicios de intoxicación alguna.

Conclusiones. Dado los resultados obtenidos se sugiere que el extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante) no posee efecto antiinflamatorio en el modelo de ratones CD1, ni se muestran indicios de que la planta tenga un efecto tóxico. Así mismo, los resultados sugieren que presenta un efecto pro inflamatorio en la fase crónica.

2. INTRODUCCIÓN

A lo largo de la historia las plantas han desempeñado un papel importante en el tratamiento y prevención de enfermedades humanas, han sido la base fundamental de las principales medicinas tradicionales. La Organización Mundial de la Salud (OMS) reconoce que el uso de extractos de origen vegetal es una alternativa para los sistemas de salud de todo el mundo debido a que los niveles de enfermedades crónicas y los costos de atención sanitaria son cada vez más elevados.

Desde la mitad del siglo pasado, las plantas fueron la base de la medicina moderna, se estima que el 70% de los principios activos y metabolitos descubiertos son de origen vegetal, entre los medicamentos que se prescriben en los países de occidente, del 40 al 50% provienen de metabolitos activos, de plantillas semisintéticas o de la modificación total de entidades químicas derivadas de plantas.

La evaluación farmacológica, fitoquímica, y toxicológica de los géneros y especies identificados con actividades biológicas debe ser abordada en proyectos de investigación para comprobar y documentar sus posibles aplicaciones terapéuticas.

El proceso inflamatorio es un importante sector en la investigación farmacológica, principalmente en virtud de la capacidad potencial que tienen ciertos compuestos de origen natural de interferir en la evolución de enfermedades que presentan procesos inflamatorios.

Teniendo en cuenta lo anterior así como los usos y estudios reportados sobre las propiedades biológicas que comparte el género *Kalanchoe*, se evaluó la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake en un modelo de ratones CD1, para comprobar su posible actividad como antiinflamatorio.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Plantas medicinales

Las plantas constituyen un recurso valioso en los sistemas de salud de los países en desarrollo. Aunque no existen datos precisos para evaluar la extensión del uso global de plantas con propiedades medicinales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que más del 80% de la población mundial las utiliza, para satisfacer sus necesidades de atención primaria de salud. Gran parte de los tratamientos tradicionales implican el uso de extractos de plantas o sus principios activos.

Se define a las plantas medicinales como cualquier especie vegetal que contiene sustancias que pueden ser empleadas para propósitos terapéuticos o cuyos principios activos pueden servir de precursores para la síntesis de nuevos fármacos.¹

Las plantas tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir de modelo para la elaboración de drogas sintéticas y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos.²

La revisión de la medicina tradicional permite realizar investigaciones etnobotánicas dirigidas, análisis químicos, caracterización de principios activos y bioensayos. En la actualidad muchas plantas han sido estudiadas y validadas desde el punto de vista biológico, químico y farmacológico.³

3.2 Farmacognosia

Es la rama de las ciencias farmacéuticas que estudia las materias primas y las sustancias de origen biológico (vegetal, animal o microbiológico) con fines terapéuticos. Estudia tanto sustancias con propiedades terapéuticas como sustancias tóxicas, excipientes u otras sustancias de interés farmacéutico. Dentro de sus principales objetivos está el establecer las propiedades farmacológicas de las drogas vegetales e investigar nuevos principios activos que puedan constituir un punto de partida para el diseño de nuevos fármacos en el futuro.^{4,5}

3.3 Fitoquímica

La Fitoquímica es una especialidad que deriva de la farmacognosia, sus objetivos abarcan el estudio químico de las plantas medicinales, el desarrollo de métodos de obtención de componentes activos y su clasificación de acuerdo al grupo funcional químico orgánico al que pertenecen, la aplicación de métodos analíticos que son cada vez más sofisticados que permiten detectar y posteriormente identificar los principios activos responsables de las propiedades atribuidas a las

plantas. Con la finalidad de dilucidar los efectos beneficiosos y perjudiciales a la salud humana.⁶

3.4 Género *Kalanchoe*

Kalanchoe o *Bryophyllum*, es un género de plantas perennes suculentas perteneciente a la familia *Crassulaceae*, comprende más de cien especies que son nativas de las zonas tropicales de África, Asia y América.

La mayoría de las especies de *Kalanchoe* han sido ampliamente introducidas y naturalizadas en gran parte del mundo, principalmente para uso en la horticultura.

Diversas especies del género *Kalanchoe* son utilizadas en la medicina tradicional de muchos países del mundo. Actualmente se ha reportado que los extractos de más de 30 plantas de este género poseen actividades biológicas, entre las cuales destacan la antiinflamatoria, antioxidante, analgésica, antiviral, sedante, antiulcerosa, inmunomoduladora, depresora del SNC, citotóxica, hepatoprotectora, anticonvulsivante, antimicrobiana, inhibidora del desarrollo de células B, anticonceptiva, cardiovascular, antidiabética, antileishmania, inhibidora de la acetilcolinesterasa.⁷⁻¹³

En la medicina tradicional de México se utilizan las especies: *Kalanchoe pinnata* (Siempre viva o tronador), *Kalanchoe blossfeldiana* (Maravilla), *Kalanchoe daigremontiana* (Aranto o espinazo del diablo); en el tratamiento de diabetes mellitus, enfermedades renales, resfriados, infecciones, cefalea, anticancerígena, poseen propiedades analgésicas y antiinflamatorias.^{14, 15}

3.5 *Kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante)

- **Información taxonómica**

Kalanchoe beharensis Drake pertenece a la división Fanerógama *Magnoliophyta*, clase *Magnolipsida*, subclase *Magnoliidae*, superorden *Myrothamnanae*, orden *Saxifragales* y familia *Crassulaceae*.

- **Sinónimos**

Kalanchoe de Behara, *Kalanchoe van-tieghemii*, *kalanchoe* oreja de elefante.¹⁷

- **Descripción botánica**

Es una planta perenne suculenta endémica de Behara, (sur de Madagascar), puede alcanzar más de 3 m de altura, es de porte erecto, con tallo delgado de color gris y aspecto afelpado y nudoso debido a las hojas que va perdiendo al crecer. Sus hojas son de color verde oliva con una velloidad fina de apariencia aterciopelada y color azulado en ambas caras, con peciolo que miden 3-4 cm, decusadas, triangular-lanceoladas de entre 10 a 20 cm de largo por 5 a 10 cm de ancho con márgenes que poseen un doble festón. Las flores son de color verde amarillento, poseen pedúnculos cortos, 4 pétalos y corola de 7 mm, florece a principios de la primavera.

Su cultivo requiere mínima atención y cuidados, se utiliza principalmente como uso ornamental.^{16, 17}

- **Estudios experimentales con *Kalanchoe beharensis* Drake**

Se tiene reportado que el jugo obtenido de *K. beharensis* Drake mostró una alta actividad neutralizante de los virus: poliovirus tipo 2 (PV2), Coxsackievirus B1 y B6, virus de la estomatitis vesicular (VSV) y virus de la gripe (influenza A).¹⁸



Figura 1. *Kalanchoe beharensis* Drake¹⁶

3.6 Inflamación

La inflamación es uno de los temas de mayor interés en la medicina clínica, ya que en mayor o menor grado es el sustrato patogénico y morfológico de las enfermedades. La inflamación es un importante sector en el campo de la investigación farmacológica y el gasto por el tratamiento de los procesos inflamatorios es de los más elevados.¹⁹

La inflamación es fundamentalmente la respuesta, del sistema inmunológico de un organismo, al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica cuya finalidad predominantemente es reparativa. Inicialmente tiene una función homeostática de protección o defensa que se caracteriza por rubor, dolor, tumefacción, edema y falta de función en la zona afectada, es un proceso que implica un enorme gasto de energía metabólica.²⁰⁻²²

La respuesta inflamatoria está formada por un proceso morfológico y bioquímico que involucra la participación de mediadores químicos, elementos del plasma, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares del tejido conectivo cuya actividad es coordinada y regulada por el sistema inmunitario innato y adquirido.²²⁻²⁴

3.6.1 Tipos de respuesta inflamatoria

Se divide en 2: aguda y crónica. A menudo estas se sobreponen debido al impacto de factores múltiples, como la duración de la agresión, el tipo de agente inflamatorio, el grado e intensidad de lesión y el microambiente morfológico.²⁵⁻²⁷

3.6.2 Inflamación aguda

Es la reacción tisular inmediata frente a una noxa inicial, se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos, fundamentalmente neutrófilos. Se inicia muy rápidamente y es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos días).²⁵

Los principales eventos que ocurren durante la inflamación aguda son:

1. Reacción vascular. Consiste en una vasodilatación arterial, de capilares y vénulas, con lo que aumenta el flujo sanguíneo y su velocidad en el foco inflamatorio, causada por la liberación de sustancias presentes en el tejido conectivo y células circundantes.
2. Trastornos de la permeabilidad vascular. Generada por la vasodilatación de capilares y vénulas, produce un exudado de líquido plasmático que, a su vez, condiciona una concentración local de células sanguíneas y un enlentecimiento de la corriente sanguínea.

3. Reacciones leucocitarias. Se produce la marginación y emigración de los leucocitos (neutrófilos, macrófagos y linfocitos) al foco inflamatorio, atraídos por estímulos quimiotácticos; como resultado aparece el infiltrado inflamatorio con gran capacidad de fagocitosis de material extraño y necrótico.²²⁻²³

Las causas y estímulos de la inflamación aguda son:

- Infecciones: bacterianas, víricas, fúngicas o parasitarias.
- Reacciones inmunitarias: enfermedades autoinmunitarias y reacciones alérgicas.
- Necrosis tisular: originada de cualquier factor y estímulo.
- Agentes físicos: suturas, traumatismos, heridas, lesiones por frío o calor, luz UV, radiación, etc.
- Agentes químicos: Sustancias irritantes y corrosivas, como ácidos y álcalis.²⁸

3.6.3 Inflamación crónica

Es una inflamación de duración prolongada y está relacionada con la respuesta dada por los linfocitos y los macrófagos, por la proliferación de vasos sanguíneos y la disfunción del endotelio, así como por la fibrosis y la destrucción tisular. La inflamación crónica se presenta cuando la inflamación aguda no ha logrado mitigar el estímulo nocivo o cuando la misma respuesta inflamatoria se autoperpetúa.

La inflamación crónica se caracteriza por:

1. Infiltración por células mononucleares, como linfocitos, macrófagos y células plasmáticas, que reflejan una reacción persistente a la lesión.
2. Destrucción tisular. Inducida principalmente por las células inflamatorias.
3. Intentos de reparación. Mediante sustitución del tejido conectivo o del tejido lesionado, con proliferación de angiogénesis y en especial, con fibrosis.²⁹⁻³⁰

La inflamación crónica se puede originar a partir de las siguientes circunstancias:

- Infecciones persistentes por patógenos difíciles de erradicar, como bacterias, virus, hongos y parásitos.
- Enfermedades inflamatorias de mecanismo inmunitario. En determinados trastornos, se desarrollan reacciones inmunitarias contra los propios tejidos del individuo, originando enfermedades autoinmunitarias que se autoperpetúan y producen inflamación crónica por lesiones tisulares, como la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple.
- Exposición prolongada a agentes con capacidad tóxica, exógenos o endógenos. Un ejemplo de agente endógeno son algunos componentes lipídicos tóxicos elevados en la sangre, que contribuyen a la aterosclerosis, y un agente exógeno puede ser la inhalación prolongada de partículas de sílice, que causa una enfermedad pulmonar conocida como silicosis.^{31, 32}

3.6.4 Células inflamatorias

Cualquier célula que participa en las reacciones inflamatorias se puede llamar célula inflamatoria. Algunas residen por periodos prolongados en tejidos normales; otras son células circulantes que penetran a los tejidos sólo durante el transcurso de una respuesta inflamatoria.²⁹

- Neutrófilos (leucocitos polimorfonucleares LPMN)

Son las primeras células que llegan al sitio de la inflamación, por lo general, en el transcurso de 90 minutos luego que se presenta la lesión. Son capaces de generar radicales libres derivados del Oxígeno. Participan en la fagocitosis, liberación de enzimas y formación de factores quimiotácticos.³³

- Monocitos

Aparecen en el foco inflamatorio, antes de 48 horas, como respuesta a los mediadores liberados por los LPMN. Se convierten en macrófagos después de fagocitar cualquier tipo de sustancia, liberan enzimas lisosomiales, que disuelven y necrosan la colágena, las fibras elásticas, las propias células muertas y las bacterias residuales. Los monocitos forman parte del infiltrado tanto en inflamaciones agudas como crónicas.³⁰

- Linfocitos

Los linfocitos se presentan en el foco inflamatorio en fases tardías y tienden a acumularse alrededor de los vasos sanguíneos por la activación de moléculas de adhesión. Linfocitos y monocitos se estimulan recíprocamente para su persistencia en el foco inflamatorio, los primeros por la liberación de linfoquinas (INF- γ), que tiene una potente capacidad de activar macrófagos y los segundos por medio de citoquinas que reclutan y activan linfocitos.^{23, 27}

- Basófilos

Los basófilos funcionan como iniciadores y/o efectores en las reacciones de hipersensibilidad, evitan la coagulación del foco inflamatorio, controlan la exudación y estimulan la angiogénesis. Contribuyen en el reclutamiento de otras células proinflamatorias.³⁴

- Eosinófilos

Los eosinófilos tienen gran capacidad de fagocitosis, especialmente en presencia de factores bacterianos, complemento y complejos antígeno-anticuerpo. Son importantes en la inflamación que se asocia con reacciones de hipersensibilidad inmediata y alteraciones alérgicas, donde participan en controlar la liberación de mediadores químicos específicos. En muchas inflamaciones la aparición de eosinófilos es signo de regresión y resolución de la inflamación.^{32, 35}

- Células plasmáticas

Es el resultado de la diferenciación de linfocitos B activados, aparecen en la fase tardía de la inflamación, sintetizan y liberan anticuerpos circulantes. En el foco inflamatorio presentan multinucleación, acumulación intracitoplasmática de inmunoglobulinas cristalizadas.³⁵

3.6.5 Mediadores químicos de la inflamación

Son compuestos derivados del huésped secretados por células activadas y actúan para desencadenar o aumentar aspectos específicos de la inflamación. Se dice que tales compuestos son proinflamatorios.^{30, 33}

Aminas vasoactivas

Las aminas vasoactivas: histamina y serotonina, se almacenan en forma de moléculas preformadas principalmente en las células cebada adyacentes a los vasos sanguíneos, basófilos y plaquetas; por lo que son de los primeros mediadores que se liberan durante la inflamación.

La histamina induce la dilatación de las arteriolas y aumenta la permeabilidad de las vénulas. Es el principal mediador del aumento de la fase transitoria de la permeabilidad vascular, produciendo espacios interendoteliales en las vénulas que favorecen la salida del exudado plasmático.

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

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

La serotonina es otro mediador preformado que produce efectos similares a los de la histamina. Se encuentra, principalmente, en el interior de los gránulos de cuerpos densos plaquetarios y es liberada durante la agregación plaquetaria.²³

Citocinas

Son producidas por linfocitos y macrófagos activos, secretadas como una respuesta al estímulo que representan diferentes factores, externos o internos como los antígenos de los agentes infecciosos, endotoxinas, lesión física y procesos inflamatorios. Las señales transmitidas originan una serie de eventos que son necesarios para limitar, rechazar o reparar, inmunológicamente, cualquier clase de daño tisular. La producción y la liberación al exterior de las citocinas es una parte importante de las respuestas inflamatoria e inmunitaria. En este último caso, destacan sus efectos reguladores sobre la proliferación y la activación de las células fagocíticas y de los linfocitos T y B.

En éstas se incluyen:

- Linfocinas: citocinas producidas por los linfocitos.
- Monocinas: citocinas producidas por monocitos/macrófagos.
- Interleucinas: citocinas que actúan entre los leucocitos.
- Interferones: inhiben la replicación de los virus dentro de las células y activan a los macrófagos y las células citolíticas naturales.
- Factores de necrosis tumoral
- Factores de crecimiento.³⁶

Quininas

Son péptidos vasoactivos derivados de proteínas plasmáticas, el sistema de quininas está íntimamente relacionado con la cascada de coagulación, ya que la activación del factor XII, genera bradiquinina, la quinina más conocida. Las quininas aumentan la permeabilidad vascular, causan contracción del músculo liso, dilatación de los vasos, dolor, efectos similares a los de la histamina. Ejercen efectos quimiotácticos en la producción de plasmina y fibrina, por lo que participan en la mayoría de los procesos antiinflamatorios.³⁰

Sistema del complemento

El sistema del complemento está formado por 20 proteínas (incluidos los productos de fragmentación), sus componentes se encuentran en el plasma en

forma inactiva y se enumeran de C1 a C9, los cuales tienen una importante intervención en la inmunidad y la inflamación. Existen 3 vías que desencadenan la activación del complemento, la vía clásica, alterna y la de la lectina, las cuales llevan a la formación del complemento de ataque a la membrana (MAC).

Las funciones del sistema del complemento implican:

- Ataque a la membrana (MAC), lisis de células, bacterias y virus.
- Quimiotaxis, generando la adhesión y activación de leucocitos en el endotelio.
- Oponización, promoviendo la fagocitosis de antígenos particulados por medio de neutrófilos y macrófagos.^{23, 35}

Factor activador de plaquetas

Es un mediador bioactivo producido por neutrófilos, mastocitos, monocitos y plaquetas que puede ser sintetizado y liberado en forma intracelular por degranulación o en forma secretada. Induce agregación plaquetaria, activa a neutrófilos y eosinófilos, causa aumento de la permeabilidad vascular, estimulan la síntesis de otros mediadores derivados del ácido araquidónico.²⁵

Metabolitos del ácido araquidónico

El ácido araquidónico (AA) se encuentra en forma esterificada en la membrana de las células, se libera a partir de fosfolípidos por la acción de fosfolipasas celulares activadas, las cuales se activan por estímulos químicos, físicos, mecánicos o por otros mediadores químicos.

Los metabolitos del AA, también denominados ecosanoides poseen actividades biológicas y se comportan como señales intracelulares o extracelulares que influyen en diversos procesos biológicos, entre ellos la inflamación y la hemostasia. El AA puede metabolizarse por dos vías principales: vía de la ciclooxigenasa en la que se sintetizan prostaglandinas y tromboxanos, y la vía de la lipooxigenasa donde se generan leucotrienos y lipóxinas.

Las funciones de los metabolitos del AA en la inflamación son:

Prostaglandinas: producen vasodilatación, dolor y fiebre.

Tromboxanos: producen vasoconstricción vascular y activan la agregación plaquetaria.

Leucotrienos: aumentan la permeabilidad vascular, activan neutrófilos.

Lipoxinas: inhiben el reclutamiento y la adhesión al endotelio de leucocitos, por lo que se consideran como inhibidoras de la inflamación.³⁷

Óxido nítrico

El óxido nítrico (NO), es un radical libre, potencialmente tóxico que se puede difundir libremente a través de las membranas celulares. Es un potente vasodilatador formado por las células endoteliales, inicialmente fue denominado como factor relajante derivado del endotelio (EDRF). Tiene una vida media de 3-50 segundos debido a su rápida conversión a nitritos y nitratos en presencia de Oxígeno. Se sintetiza a partir de la oxidación de la L-arginina con NADPH como cofactor, por acción de la enzima óxido nítrico sintetasa. Existen dos formas distintas de la enzima, la constitutiva, que es dependiente de Calcio y de calmodulina e insensible a los glucocorticoides, y la inducible, que no depende de Calcio o de calmodulina y se inhibe por los glucocorticoides.

El óxido nítrico desempeña múltiples funciones en los procesos inflamatorios ejerciendo efectos en la relajación del musculo liso vascular, regula la adhesión, agregación y degranulación de plaquetas, actúa como antagonista en el reclutamiento de leucocitos. Además posee actividad antimicrobiana y citotóxica por la interacción con otras especies reactivas del Oxígeno promoviendo la formación de metabolitos antimicrobianos: peroxinitrilo (OONO^-), S-nitrosoles (RSNO) y dióxido de Nitrógeno (NO_2).^{38, 39}

3.7 Antiinflamatorios

3.7.1 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)

Los analgésicos AINES se encuentran entre los medicamentos más prescritos en todo el mundo, constituyen un grupo heterogéneo de compuestos que pertenecen a diversas clases químicas (derivados del ácido salicílico, del p-aminofenol, derivados del indol y ácido indenacético, derivados del ácido heteroarilacético, derivados del ácido arilpropiónico, derivados del ácido antranílico, derivados del ácido enólico, y recientemente, los inhibidores selectivos de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) como los coxibs.^{40, 41}

La utilidad terapéutica de los AINES como analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios, se atribuye a su capacidad de inhibir con mayor o menor potencia la sintetasa de prostaglandinas (COX-1) y a la sintetasa de tromboxanos (COX-2).⁴⁰

- **Indometacina**

La indometacina es un derivado del indol, sus efectos analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios se deben a su capacidad de inhibir, de manera no selectiva a la ciclooxigenasa 1 y 2, acción que da lugar al bloqueo de la síntesis de prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Interfiere en una gran cantidad de procesos de membrana, como la fosforilación oxidativa y la adhesión celular, inhibe la agregación plaquetaria y es veinte veces más potente que el ácido

acetilsalicílico como inhibidor de la COX, potencia proporcional a su actividad como analgésico y antiinflamatorio.

Su administración oral tiene una excelente biodisponibilidad, se absorbe y fija a proteínas plasmáticas de manera rápida, alcanzando su $t_{máx}$ a las 2 horas, presenta recirculación enterohepática, por lo que su $t_{1/2}$ en el plasma es de 5 a 10 horas. Entre el 10 y 20% se elimina sin metabolizar por secreción tubular activa, el resto en forma de metabolitos inactivos y conjugados del ácido glucurónico que se eliminan por la orina, bilis y heces.^{40, 42}

3.7.2 Corticoides

Los corticoides (glucocorticoides o corticoesteroides) son derivados sintéticos del cortisol, hormona producida en la región cortical de las glándulas suprarrenales. Los corticoides naturales y sus derivados sintéticos biológicamente activos poseen potentes efectos analgésicos y antiinflamatorios, se encuentran entre los medicamentos de mayor uso en distintas enfermedades, debido a su capacidad para ejercer efectos sobre casi todos los sistemas y a la diversidad de sus acciones farmacológicas.

Las modificaciones químicas, fundamentalmente la halogenación, reducen su potencia, esto se correlaciona con la afinidad por sus receptores. De acuerdo a la duración del efecto terapéutico se clasifican como de acción: breve (6-12 horas): hidrocortisona (cortisol), prednisona y prednisolona; intermedia (12-36 horas):

triamcinolona, parametasona y fluprednisolona y prolongada (36-72 horas): betametasona y dexametasona.

Su administración terapéutica produce un potente efecto antiinflamatorio e inmunopresor, inhiben las manifestaciones agudas y tardías de la inflamación, las fases de cicatrización, reparación y reacciones proliferativas de la inflamación crónica. Así mismo tienen efecto sobre los mediadores de las respuestas inflamatorias e inmunitarias, ya que inhiben la síntesis de prostanoïdes, disminuyen la generación de citoquinas (IL-1 a IL-8) y de óxido nítrico inducido, reducen la liberación de histamina por los basófilos y la síntesis de IgG.

- **Hidrocortisona**

La hidrocortisona es un glucocorticoide sintético con mecanismos de acción similares a los del cortisol endógeno, se unen a receptores específicos de membrana citoplasmática. El complejo receptor-corticoide es transferido al núcleo donde se une a la cromatina y aumenta o inhibe la regulación de genes inducidos específicamente por corticoides, por medio de este mecanismo los corticoides modulan la síntesis de proteínas que regulan el metabolismo proteico-glucídico y lipídico, presentan acción sobre el sistema endocrino y el SNC.

Sus efectos antiinflamatorio, antialérgico e inmunosupresor se producen por regular e inhibir la producción y secreción de citocinas proinflamatorias, el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), el interferón gamma (IFN- γ) y el factor estimulante granulocitos y macrófagos (GM-CSF); por la interferencia directa

sobre las cascadas y mecanismos genómicos. Reprime la expresión de las moléculas de adhesión endoteliales y la síntesis del activador de plasminógeno, regula la síntesis y liberación de autacoides y de enzimas lisosomales en las reacciones inflamatorias de fase aguda.^{43, 44}

3.8 Bioensayo

Se denomina bioensayo al proceso de determinar la potencia de una sustancia o de un material a partir de las respuestas producidas en organismos biológicos. El bioensayo intenta establecer una relación funcional entre dosis y respuesta, donde la respuesta es una medida del resultado de la aplicación de la sustancia en determinadas dosis y puede ser de diferentes tipos: ordinal, discreta, cuantitativa, dicotómica, cuantitativa continua.^{40, 45}

3.9 Modelo experimental

3.9.1 Modelo experimental en animales

Un modelo experimental animal se define como un sistema biológico, reproducible y complejo, que se utiliza para estudiar los mecanismos celulares y moleculares que operan en el funcionamiento normal de un órgano, en la reproducción de una enfermedad (o procesos de una enfermedad), de manera parecida al humano para permitir su conocimiento o abordaje mediante diferentes técnicas terapéuticas.

Los modelos animales de enfermedades humanas han sido utilizados desde hace muchos años en distintas áreas de investigación, constituyendo uno de los pasos fundamentales en la biomedicina. Tanto la caracterización de un mecanismo fisiopatológico como la puesta a punto de una modalidad terapéutica pasan generalmente por la necesidad de realizar ensayos in vivo, empleando para ello uno o varios modelos animales.

Los resultados de la investigación con modelos animales proporcionan información necesaria para diseñar pruebas humanas que son esenciales para la aprobación legal de nuevos fármacos, dispositivos médicos, y procedimientos con carácter terapéutico y de diagnóstico.^{46, 47}

3.9.2 Diseño de la experimentación

El diseño experimental es una parte del desarrollo de la investigación, su éxito depende de las condiciones de vida del animal (características genéticas y ambientales) y de la calidad de los recursos humanos (especialización y acreditación).

Debido a que los animales de experimentación constituyen el nivel más alto de complejidad de todos los modelos experimentales y son la fuente principal de conocimiento de la fisiopatología quirúrgica, se han especificado aspectos y recomendaciones para el diseño del protocolo:

- a) Establecer las propiedades fisicoquímicas de la sustancia a estudiar, lo que permite determinar las condiciones de almacenamiento, manipulación, vía de administración.
- b) Seleccionar el modelo animal adecuado, el cual depende del tipo de proceso morfológico y fisiopatológico a estudiar, de la farmacocinética y biodisponibilidad de la sustancia o producto a evaluar, lo cual definirá la especie, cepa y la calidad del animal.
- c) Justificar el número de animales seleccionados, el número de animales a utilizar se calcula por procedimientos estadísticos y depende del protocolo de experimentación.
- d) Seleccionar la vía de administración del inóculo: dosis, frecuencia de inoculación, determinación del punto final del experimento.
- e) Realizar los procedimientos experimentales adecuados, los cuales están condicionados a los conocimientos y calificación de los recursos humanos.
- f) Especificar el método de eutanasia y definir el punto final humanitario del experimento.⁴⁸⁻⁵⁰

3.9.3 Ratón

El ratón (*Mus musculus*) es la especie animal más utilizada en experimentación biomédica moderna, los ratones de laboratorio constituyen entre el 60 y 80% de los mamíferos usados en la investigación, debido a que su genoma es totalmente conocido, a sus características reproductivas, a los conocimientos que se tienen sobre su fisiología, anatomía, fácil manejo y capacidad de adaptación. Un gran número de ratones se utiliza para bioensayos, pruebas de toxicidad, para el estudio de nuevos fármacos, estudios de microbiología y virología.

El uso de ratones como modelo animal en estudios biomédicos se considera esencial para dilucidar los mecanismos subyacentes de una enfermedad, así como en el diseño de modelos genéticamente modificados en las áreas de oncología e inmunología, donde son enfocados para el tratamiento, prevención y comprensión de múltiples trastornos y patologías.

Estudios recientes han reportado que los niveles de expresión de los genes en modelos de ratón de patologías humanas son significativamente correlacionados con los de las condiciones humanas. Esto demuestra que los patrones de expresión génica en modelos de ratones se relacionan a las condiciones inflamatorias en humanos y argumentan fuertemente la utilidad de los ratones como modelos animales de enfermedades humanas.⁵¹⁻⁵³

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las plantas han sido la principal fuente de la mayoría de las moléculas nuevas y principios activos de los medicamentos, sin embargo, se estima que hay 250.000 especies de plantas en el mundo y probablemente solo el 10% de ellas han sido probadas para algún tipo de actividad biológica, muchos compuestos y moléculas útiles están en espera de ser descubiertos.³¹

La naturaleza interdisciplinaria de la medicina tradicional (etnobotánica) permite una amplia variedad de enfoques y aplicaciones; estudios etnobotánicos y farmacológicos proporcionan información esencial para la orientación en la bioprospección de nuevos medicamentos de origen vegetal.³²

El género *kalanchoe* es ampliamente utilizado en la medicina tradicional de varios países debido a que poseen diversas actividades biológicas que son estudiadas y reportadas extensamente, entre ellas la actividad antiinflamatoria.

En la actualidad *Kalanchoe beharensis* Drake sólo tiene reportada actividad antiviral y carece de estudios que evidencien la presencia de otras propiedades biológicas que comparten la mayoría de las especies de su mismo género. Por lo que surge un interés en evaluar la actividad antiinflamatoria de *kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante) para comprobar si posee dicha actividad biológica.

5. HIPÓTESIS

Considerando las propiedades biológicas, entre ellas la antiinflamatoria, que poseen las plantas del género *Kalanchoe*, se espera encontrar la actividad antiinflamatoria en el extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake, en un modelo de ratones CD1.

6. OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante) en un modelo de ratones CD1.

6.2 Objetivos específicos

- Obtener el extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso en un proceso de inflamación aguda usando el modelo de edema en cojinete plantar.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria del extracto acuoso en un proceso de inflamación crónica siguiendo el modelo de formación de granuloma con pellet de algodón.
- Determinar la presencia de nitritos como producto estable del óxido nítrico.

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

7.1 Tipo de estudio

Experimental

7.2 Población de estudio

Ratones CD1 machos de entre 25 y 40 g de peso.

7.3 Variables

Independiente:

Tratamiento

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

Dependiente:

- Grosor de la pata por el efecto de la administración de los tratamientos
- Peso del granuloma (pellet de algodón)
- Concentración de nitritos en suero

8. MATERIAL

➤ Material biológico

- Ratones CD1 machos
- Planta: *Kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante)

➤ Reactivos

- Ácido acético glacial (Merck)
- Ácido clorhídrico (Merck)
- Agua destilada (Pisa)
- Cadmio granular (Merck)
- Carragenina tipo IV (Sigma)
- Cloruro de amonio al 5% pH=9 (JT Baker)
- Goma Ghatti (SYQUEM)
- Hidrocortisona (Flebocortid solución inyectable de 100 mg- Janssen-Cilac)
- Indometacina (Indocid cápsulas de 25 mg- Aspen Port Elizabeth (Pty) Ltd, Sudafrica).
- Nitrito de Sodio (Merck)
- N-1-naftiletildiamina-NED (Merck)
- Solución salina (solución inyectable 0.9%) (Pisa)
- Sulfato de Cobre al 5% (Sigma)
- Sulfato de Zinc (HYCEL)
- Sulfonamida (Merck)

➤ **Material**

- Algodones pellet (Protec)
- Cajas de Petri (Pyrex)
- Cámara de éter
- Embudo Büchner (Kimax)
- Embudo de vidrio (Pyrex)
- Espátula (RYE)
- Estuche de disección (Vesalius)
- Gasas (Protec)
- Gradilla (Brand)
- Jeringas 1 mL (Terumo)
- Matraz Erlenmeyer de 2 L (Kimax)
- Microtubos (Fisher Brand)
- Mortero con pistilo (Veravitrum)
- Papel filtro (Whatman)
- Papel parafilm (American National Can)
- Pipetas Pasteur (Biotech)
- Placa de microtitulación (Beckton)
- Sonda gástrica (Animal feeding needles, 20GX 1-1/2" Poper and Sons, Inc. Newhyde Park, NJ, USA).
- Tubos de ensaye 13x100 (Pyrex)
- Vasos de precipitado 25, 50, 100 y 250 mL (Pyrex)

➤ **Equipo**

- Agitador Rocker Platform (Bellco Glass. Inc.)
- Agitador Vortex (Scientific Industries, Inc. Modelo K-550G)
- Balanza analítica (ae ADAM)
- Balanza granataria (Ohaus)
- Báscula para animales (TecnoCor)
- Bomba de vacío (Koblenz)
- Centrifuga (Hamilton Bell)
- Congelador (Tor-rey)
- Espectrofotómetro UV/Visible (JENWAY- Modelo: 6305)
- Estufa (Shel Lab)
- Microcentrífuga (Hermle – Modelo: Z233M-2)
- Refrigerador (Mabe)
- Rotavapor (Yamato – Modelo: BM500)
- Sonicador (SONICS)

➤ **Instrumentos**

- Matraz volumétrico 100 mL (Pyrex)
- Matraz volumétrico 1000 mL (Pyrex)
- Micrómetro (Scala)
- Micropipeta de 100-1000 μ L (Labsystems)
- Micropipeta de 40-200 μ L (Labsystems)

- Pipeta automática (Jencons)
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL (Kimax)
- Pipetas volumétricas de 2 y 5 mL (Pyrex)

9. MÉTODOS

9.1 Preparación del extracto acuoso

1. Se recolectaron 4 hojas de *Kalanchoe beharensis* Drake procedentes de la Colección viva de Cactáceas y otras Suculentas de la FES Zaragoza, una muestra se identificó y herborizó en el herbario de la FESA-UNAM de la FES Zaragoza.
2. Se pesaron 840 g de las hojas recolectadas, se trituraron con 1L de agua en un procesador de alimentos hasta obtener una mezcla homogénea.
3. La mezcla homogénea se colocó en un matraz Erlenmeyer de 2 L con tapón, se dejó reposar durante 24 horas evitando la exposición a la luz.
4. Posteriormente la mezcla se filtró por gravedad y vacío utilizando gasas y papel filtro. Una vez filtrado el extracto acuoso, se eliminó el disolvente a rotavapor (60 °C), obteniendo un concentrado con el mínimo de humedad.
5. El concentrado se colocó en la estufa a 37 °C durante 1 semana para dejarlo secar.
6. Se retiró el extracto seco y se pulverizó en un mortero, se pesó para obtener el rendimiento del extracto acuoso. El extracto se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

9.2 Ensayo de inflamación aguda: Modelo de edema en cojinete plantar de ratón con carragenina⁵⁶

1. Se trabajó con 5 grupos de ratones de 6 ratones cada uno, se pesaron y se marcaron de acuerdo al orden correspondiente.
2. Previo al ensayo, se dejó en ayuno de 16 horas a todos los ratones, con acceso libre de agua.
3. Se midió el grosor de la pata izquierda de cada uno de los grupos antes de la inyección de carragenina.
4. Se Inyectaron 50 μ L de carragenina al 1% en el cojinete plantar de la pata izquierda trasera de cada ratón.
5. Se administró oralmente mediante una sonda gástrica: 25, 50 y 100 mg/ Kg del extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake.
6. Al grupo de referencia, se le administró mediante una sonda gástrica Indometacina (10 mg/Kg) disuelta en goma Ghatti al 1% en agua destilada, al grupo control negativo, solución salina fisiológica (10 mg/Kg).
7. Se midió el grosor de la pata a los tiempos 1, 2, 3, 4 y 5 horas después de la inyección utilizando un micrómetro.
8. Se calculó el porcentaje de inhibición de la inflamación con la siguiente ecuación:

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

$$(Ct - Co) \text{ control}$$

Donde:

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

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

9.3 Ensayo de inflamación crónica utilizando el modelo de granuloma inducido con pellet de algodón^{56, 57}

1. Se pesaron con exactitud 50 pellets de algodón estériles de 10 mg.
2. Se utilizaron 5 grupos de ratones de 6 ratones por cada grupo, se pesaron y marcaron de acuerdo a las dosis utilizadas.
3. Se implantó subcutáneamente en el dorso el pellet de algodón a cada ratón de los 5 grupos.
4. A cada grupo se le administró por sonda gástrica el extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake a diferente concentración (25, 50 y 100 mg/Kg), al control positivo Hidrocortisona (15 mg/Kg) y al control negativo solución salina fisiológica (10 mL/Kg) durante 17 días.
5. Al décimo octavo día se anestesió a cada uno de los ratones en cámara de éter y por medio de una incisión del plexo axilar se colectó muestras de sangre en microtubos.
6. Posteriormente se sacrificó a los animales y se extrajo el pellet de algodón, se colocaron en una placa de microtitulación y se pesaron para obtener el

peso húmedo, posteriormente se colocaron en la estufa a 37 °C durante una semana, transcurrido este lapso se pesaron para obtener el peso seco.

7. Se extrajo el bazo, hígado y los riñones de todos los ratones y se colocaron en cajas Petri, se pesaron cada uno de ellos para obtener el coeficiente de relación órgano/animal: $\text{Peso del \u00f3rgano} / \text{Peso del rat\u00f3n} \times 100$.
8. Las muestras de sangre obtenidas se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos para obtener el suero, se alicuotaron y se colocaron en microtubos, despu\u00e9s se guardaron en el congelador.

9.4 Determinaci\u00f3n de nitritos

Plateado de Cadmio

1. A 30 tubos de ensaye de 13x100 se les coloc\u00f3 0.5 g de Cadmio met\u00e1lico y se lavaron con \u00e1cido clorh\u00eddrico 0.1 N.
2. Se agregaron 2 mL de sulfato de Cobre al 5% y se agit\u00f3 por 10 minutos en un agitador de placa horizontal.
3. Se hicieron 3 lavados con agua destilada.
4. Los tubos se lavaron nuevamente con \u00e1cido clorh\u00eddrico 0.1 N centrifugando a 3500 rpm durante 5 minutos.
5. Posteriormente se lavaron con cloruro de amonio al 5% pH= 9 y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos.
6. Los tubos con el Cadmio activado se colocaron en una gradilla y se taparon con papel parafilm.

Preparación de la muestra

1. Se tomaron 100 μL de suero de ratón de cada muestra, se agregaron 300 μL de agua destilada y se agitó.
2. Se adicionó 20 μL de sulfato de Zinc, se mezcló y posteriormente se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 minutos.
3. Se eliminó el cloruro de amonio de los tubos con Cadmio activado y se les adicionó el sobrenadante del centrifugado anterior.
4. Los tubos se agitaron en un agitador de placa horizontal durante 15 minutos y se centrifugaron a 3500 rpm durante 5 minutos.
5. Se tomaron 200 μL del sobrenadante.

Ensayo

1. Se preparó al momento una solución de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Nitrito de Sodio y se realizó la siguiente curva de calibración:

Tabla 1. Curva de calibración para la determinación de nitritos.

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

2. A los tubos de las muestras y de la curva estándar se les adicionaron 50 μL de sulfonamida y se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente.
3. Se adicionaron 50 μL del reactivo de NED, se mezcló e incubó 30 minutos a temperatura ambiente.
4. Se leyeron los tubos de la curva estándar y posteriormente las muestras a 540 nm en un espectrofotómetro UV/Visible.

9.5 Análisis estadístico

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

10. DIAGRAMA DE FLUJO

Diagrama 1. Obtención del extracto

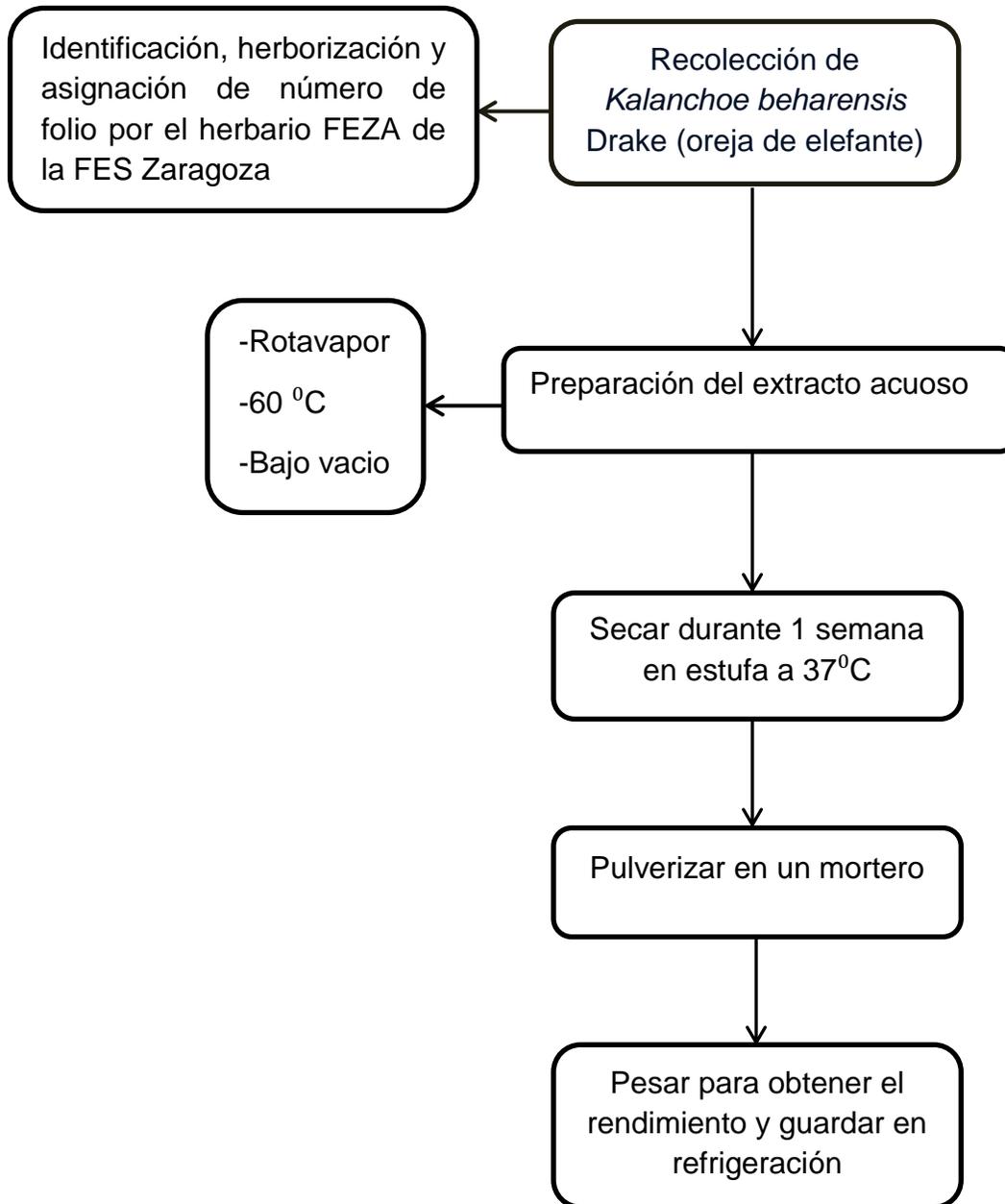


Diagrama 2. Ensayo de inflamación aguda

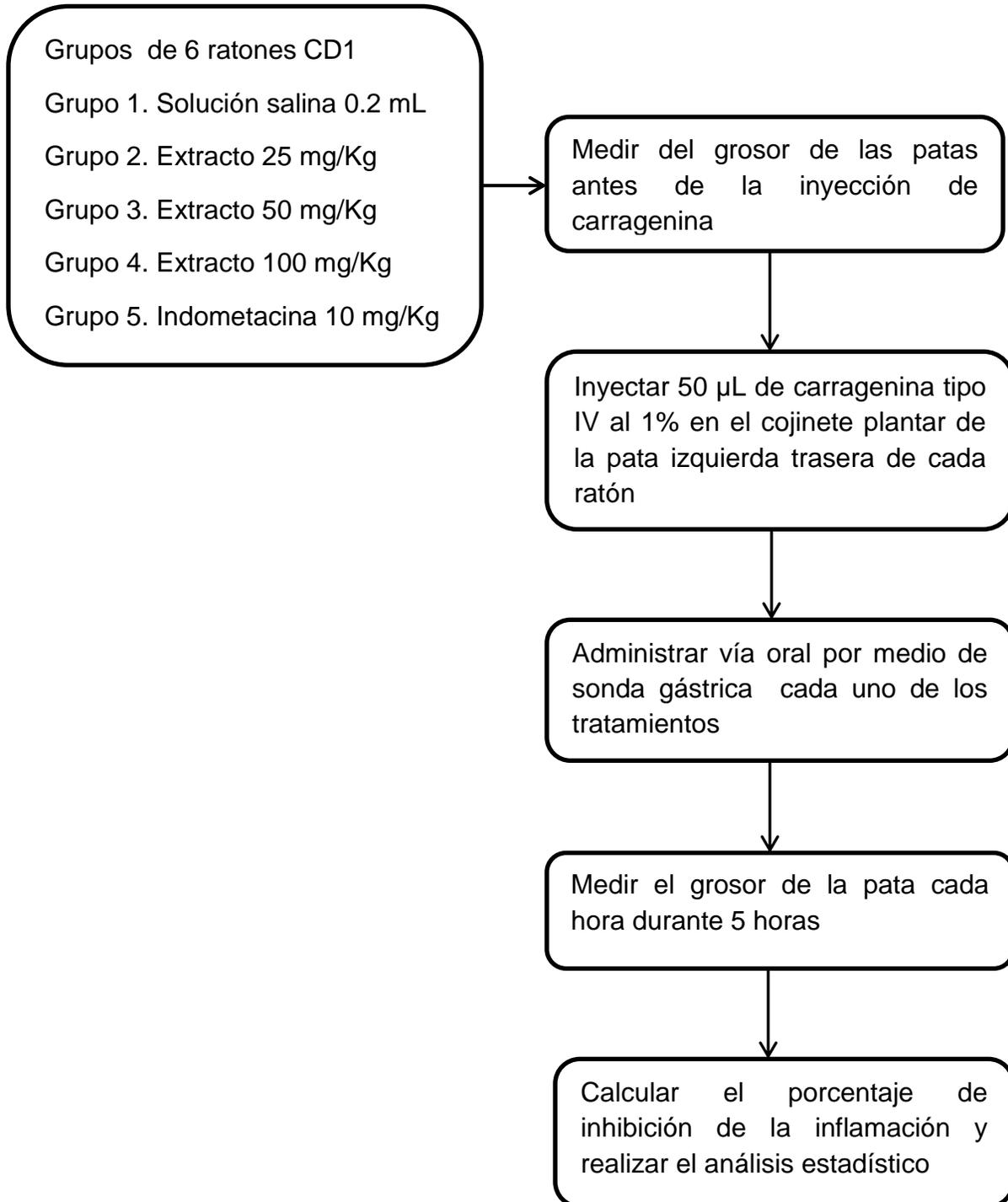
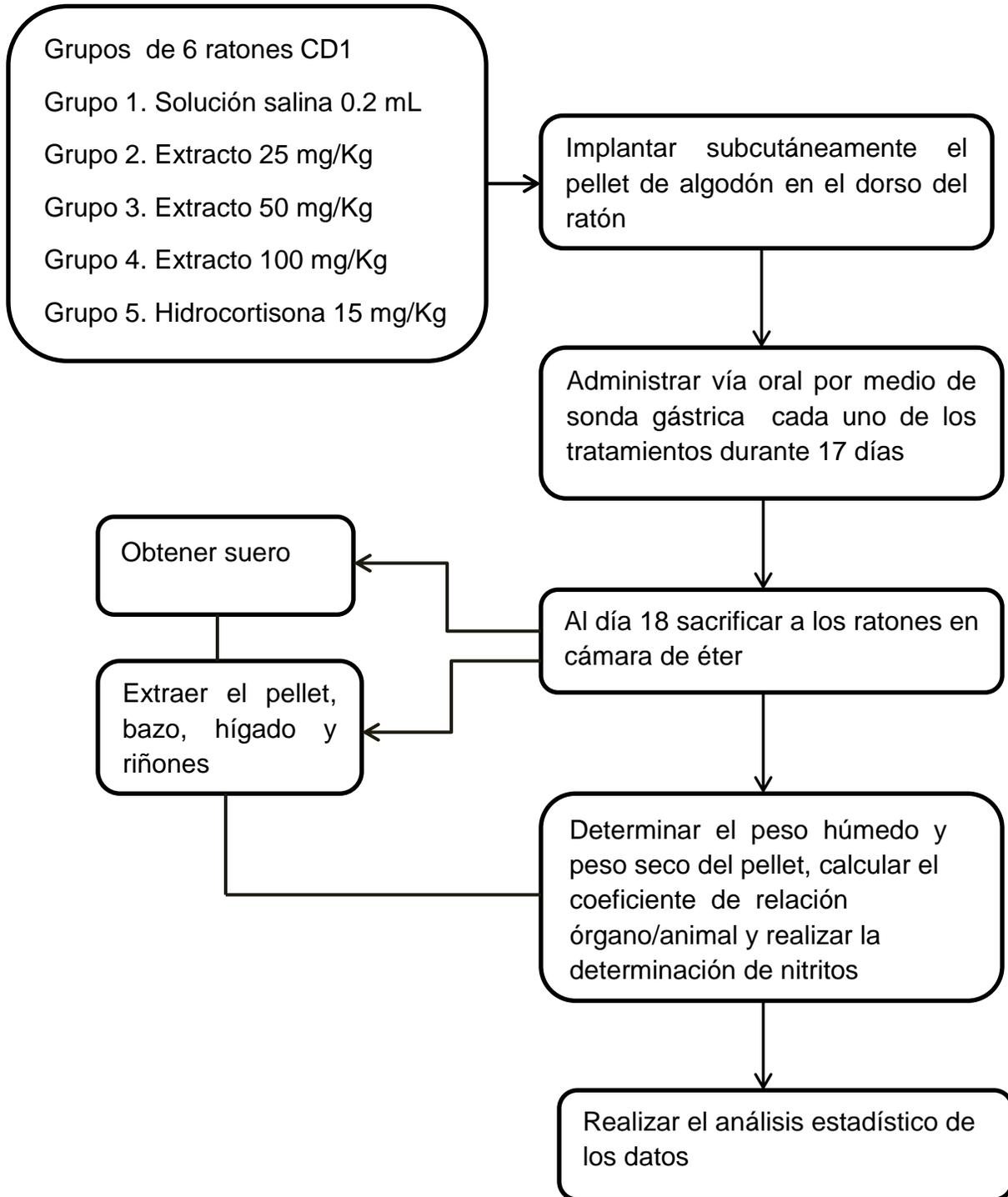


Diagrama 3. Ensayo de inflamación crónica



11. RESULTADOS

La planta fue identificada y herborizada en el herbario de la FES Zaragoza (FESZA)-UNAM y se le asignó el número FESZA 15053, 840 g de *Kalanchoe beharensis* Drake se utilizaron para la obtención del extracto acuoso en rotavapor, a una temperatura de 60 °C y bajo vacío. Se obtuvo un rendimiento del 8.45%.

En el cuadro 1 se muestran los porcentajes de inhibición de la inflamación de cada uno de los tratamientos. Se observa que el porcentaje de inhibición de la inflamación de los grupos tratados con el extracto de 25 mg/Kg y 50 mg/Kg fue relativamente mayor con respecto al grupo control negativo, el extracto de 100 mg/Kg no tuvo ningún efecto. Los porcentajes de los 3 grupos tratados con el extracto son menores comparados con el grupo tratado con Indometacina.

En el cuadro 2 se muestra el grosor de las patas en cada uno de los tratamientos 3 y 4 horas después de iniciado el proceso inflamatorio. Se observa que el grosor de las patas del grupo de ratones tratados con el extracto de 25 mg/Kg son menores con respecto al grupo control negativo sin tener diferencia estadísticamente significativa ($p \leq 0.959$ 3 horas, $p \leq 0.808$ 4 horas), en los grupos tratados con el extracto de 50 mg/Kg y 100 mg/Kg el grosor de las patas es mayor comparado con el grupo control negativo. El grosor de las patas de los 3 grupos

tratados con el extracto es mayor que el del grupo tratado con indometacina, con una diferencia estadísticamente significativa con una $p \leq 0.05$, las concentraciones del extracto no mostraron diferencia significativa entre ellas.

En el cuadro 3 se muestra el peso húmedo y peso seco de los pellets que se implantaron subcutáneamente en el dorso a los ratones de cada grupo de tratamiento, en los cuales no se observa una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, el valor de la media del peso seco de los pellets de los grupos tratados con el extracto es mayor con respecto al valor de la media del grupo control negativo.

En el cuadro 4 se muestra el índice de los órganos diseccionados de cada grupo de tratamiento, en los cuales no se observa una diferencia estadísticamente significativa en los grupos tratados con el extracto comparados con el grupo control negativo.

En el cuadro 5 se muestran las concentraciones de nitritos de cada grupo de tratamiento. Se observa que el valor de la media de los grupos tratados con *Kalanchoe beharensis* Drake es mayor con respecto al valor de la media del grupo control negativo y presentan una diferencia estadísticamente significativa contra él.

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

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

Parámetro	Solución salina (-) n= 6	Extracto 25 mg/kg n= 6	Extracto 50 mg/kg n= 6	Extracto 100 mg/kg n= 6	Hidrocortisona (+) n= 6
% de inhibición	0	4.41	1.33	0	56.44

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

Tiempo	Solución salina (-) n= 6	Extracto 25 mg/kg n= 6	Extracto 50 mg/kg n= 6	Extracto 100 mg/kg n= 6	Indometacina (+) n= 6
3 horas	3.24 ± 0.25	3.15 ± 0.35*	3.34 ± 0.26*	3.33 ± 0.15*	2.63 ± 0.04*
4 horas	3.57 ± 0.40	3.37 ± 0.38*	3.60 ± 0.37*	3.35 ± 0.15*	2.71 ± 0.05*

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

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

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

3 horas * $p = 0.959$ 25 mg/Kg; * $p = 0.951$ 50 mg/Kg; * $p = 0.966$ 100 mg/Kg vs solución salina

4 horas * $p = 0.808$ 25 mg/Kg; * $p = 1.000$ 50 mg/Kg; * $p = 0.748$ 100 mg/Kg vs solución salina

$p \leq 0.05$ los extractos vs Indometacina

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

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

Parámetros	Solución salina (-) n= 6	Extracto 25 mg/kg n= 6	Extracto 50 mg/kg n= 6	Extracto 100 mg/kg n= 6	Hidrocortisona (+) n= 6
Peso húmedo	78.1 ± 13.2	73.4 ± 8.0	82.9 ± 12.8	85.4 ± 11.1	73.8 ± 7.3
Peso seco	20.3 ± 3.7	23.2 ± 3.0	24.7 ± 5.9	22.8 ± 1.5	18.1 ± 2.0

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

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

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

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

Parámetros	Solución salina (-) n= 6	Extracto 25 mg/kg n= 6	Extracto 50 mg/kg n= 6	Extracto 100 mg/kg n= 6	Hidrocortisona (+) n= 6
Índice esplénico	0.41 ± 0.013	0.37 ± 0.024	0.42 ± 0.011	0.37 ± 0.038	0.40 ± 0.013
Índice hepático	5.7 ± 0.717	5.9 ± 0.333	6.4 ± 0.759	6.0 ± 0.265	5.7 ± 0.449
Índice renal	1.37 ± 0.142	1.32 ± 0.139	1.40 ± 0.106	1.36 ± 0.124	1.42 ± 0.057

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

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

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

Cuadro 5. Concentración de nitritos (mg/dL) en cada uno de los tratamientos.

Parámetro	Solución salina (-) n= 6	Extracto 25 mg/kg n= 6	Extracto 50 mg/kg n= 6	Extracto 100 mg/kg n= 6	Hidrocortisona (+) n= 6
Nitritos	0.19 ± 0.020	0.24 ± 0.022*	0.25 ± 0.023*	0.26 ± 0.018*	0.15 ± 0.01

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

Los valores corresponden a media ± desviación estándar.

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

* $p = 0.001$ 25 mg/Kg; * $p = 0.000$ 50 mg/Kg; * $p = 0.000$ 100 mg/Kg vs solución salina

12. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Estudios científicos han permitido descubrir importantes nuevos compuestos derivados de las plantas, entre ellos compuestos con propiedades antiinflamatorias, gran variedad de moléculas de origen natural, poseen la capacidad de inhibir específicamente algunos factores que contribuyen al proceso inflamatorio.

Hoy en día es evidente que el interés por las sustancias antiinflamatorias de origen vegetal va en aumento, porque ofrecen en algunos casos ventajas en relación a los antiinflamatorios clásicos, como la baja incidencia de efectos secundarios. La industria farmacéutica continúa utilizando las moléculas de origen natural como blancos novedosos en la búsqueda de nuevos fármacos.⁵⁸

El método de edema plantar inducido por carragenina consiste en la administración subcutánea de una solución de carragenina a nivel de la aponeurosis plantar del ratón, provocando una reacción de carácter inflamatorio: vasodilatación, exudación plasmática, migración de neutrófilos y monocitos, mediada por la liberación de diversos autocoides y factores del complemento. El mecanismo del edema producido por carragenina se caracteriza por dos fases, la fase temprana o etapa inicial se presenta una hora después de la inyección, donde la histamina y la serotonina son los principales mediadores, las cininas intervienen entre una hora y media a dos horas. La fase tardía comprende desde

la tercera a la sexta hora y las prostaglandinas (PGE1, PGE2 y PGF2) actúan como los principales mediadores.^{59, 60}

En el ensayo de Inflamación aguda se observó a partir de los porcentajes de inhibición de la inflamación, que los grupos tratados con el extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake a dosis de 25 mg/Kg y 50 mg/Kg presentaron un bajo efecto antiinflamatorio, el grupo tratado a dosis de 100 mg/Kg se comportó como el grupo control negativo ya que tuvo un efecto nulo en la inhibición de la inflamación.

El análisis estadístico muestra que no existe diferencia significativa entre los grupos tratados a dosis de 25 mg/Kg y 50 mg/Kg con respecto al grupo control negativo $p \leq 0.05$, el grupo control positivo tratado con indometacina presenta un porcentaje de inhibición mayor y valores estadísticamente significativos con respecto a los grupos tratados con el extracto, lo que indica que el extracto no presenta un efecto antiinflamatorio en un proceso agudo.

El modelo de granuloma inducido por la implantación subcutánea de los pellets de algodón se utiliza para evaluar el proceso de inflamación crónica, durante la formación del granuloma ocurre un proceso exudativo de fluidos proteicos mediado por productos de la lipooxigenasa y prostaglandinas, con infiltración de

linfocitos, macrófagos, eosinófilos y células epiteliales, seguido por un incremento de fibroblastos, síntesis de colágeno y mucopolisacáridos que aíslan en una cápsula fibrosa vascularizada al pellet de algodón que actúa como cuerpo extraño. La cantidad de infiltrado celular y tejido conectivo recién formado se mide pesando el pellet húmedo y seco después de su remoción.^{61, 62}

En este sentido, los resultados obtenidos en la inducción del granuloma muestran que el extracto a concentración de 25 mg/Kg tuvo un peso húmedo menor y los grupos tratados a 50 mg/Kg y 100 mg/Kg presentan pesos más elevados comparándolos con el grupo control negativo, el peso seco de los pellets de los 3 grupos tratados con el extracto son mayores que el peso seco del grupo control negativo, sin embargo, no se encontró una diferencia significativa en el análisis estadístico.

La administración de cualquier fármaco, medicamento o sustancia terapéutica puede generar efectos adversos que en algunos casos resultan por acción tóxica, en la alteración de la función y daño de un órgano, tejido o grupo de células. El índice relativo de los órganos que se obtuvo del ensayo de inflamación crónica muestra que los grupos tratados con el extracto no presentan diferencias con respecto al grupo control negativo que fue tratado con solución salina, lo que sugiere que *Kalanchoe beharensis* Drake no presenta un efecto tóxico en los ratones utilizados en el estudio.

El óxido nítrico es un importante mediador biológico de la respuesta inmune, en los procesos inflamatorios la inducción de la enzima óxido nítrico sintetasa ONS por acción de las citocinas proinflamatorias (LPS, Factor de Necrosis Tumoral α (TNF α) y IL-1 y INF γ) estimulan a macrófagos y neutrófilos activados para que aumenten la producción de óxido nítrico. Inicialmente en la respuesta inflamatoria tiene la capacidad de producir vasodilatación, alteración de la permeabilidad vascular y extravasación de proteínas plasmáticas, en una fase más tardía o crónica de la inflamación genera mayor vasodilatación y edema, además de que el NO puede presentar reacciones de transformación a productos altamente reactivos capaces de inducir daño por diversos mecanismos o muerte celular. El NO es una molécula que reacciona rápidamente con otros elementos, por lo que su cuantificación en fluidos biológicos se realiza de forma indirecta midiendo sus metabolitos estables nitritos y nitratos.^{38, 63}

En los resultados de la determinación de nitritos se observó que los grupos tratados con el extracto tienen una concentración mayor en comparación con el grupo control negativo presentando una diferencia estadísticamente significativa. Los resultados de granuloma inducido y nitritos sugieren que la administración de *Kalanchoe beharensis* Drake puede tener un efecto pro inflamatorio.

En la actualidad se han aislado e identificado varios compuestos de diferentes especies del género *Kalanchoe*, entre estos se encuentran glucósidos flavonoides, antocianinas, cumarinas, bufadienólidos, dimalato de kalanchosina, triterpenoides, fenantrenos y esteroides. Los cuales debido a su estructura y origen químico orgánico actúan como metabolitos activos y ejercen diversas actividades terapéuticas.^{7, 64-68}

Algunas antocianinas y cumarinas presentes en varias especies de *Kalanchoe* han mostrado poseer efectos antiinflamatorios, sin embargo, la actividad antiinflamatoria del género *Kalanchoe* se le atribuye al dimalato de kalanchosina, una sal del ácido 3,6-diamino-4,5-dihidroxiocetanoico.⁶⁹

El no presentar un efecto antiinflamatorio en fase aguda y fase crónica, del extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake permite suponer que la planta no contiene dimalato de kalanchosina.

13. CONCLUSIONES

Dado los resultados obtenidos se sugiere que el extracto acuoso de *Kalanchoe beharensis* Drake (oreja de elefante) no posee efecto antiinflamatorio en el modelo de ratones CD1, ni se muestran indicios de que la planta tenga un efecto tóxico. Así mismo, los resultados sugieren que presenta un efecto pro inflamatorio en la fase crónica.

14. PERSPECTIVAS

- Realizar el estudio con extractos de diferentes disolventes.
- Realizar estudios con *kalanchoe beharensis* Drake para evaluar otras posibles actividades farmacológicas que presentan la mayoría de las plantas del género *kalanchoe*.
- Realizar un estudio fitoquímico para aislar e identificar posibles compuestos de importancia química y farmacológica que pueda contener *kalanchoe beharensis* Drake.

15. REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023 [Internet]. México: OMS; 2014. [Consultado el 5 de Septiembre de 2014]. Disponible en:

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf?ua=1&ua=1

2. Bermúdez A, Oliveira M, Velázquez D. La investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *Interciencia*. 2005; 30(8): 453-459.

3. González EM, López EIL, González EMS, Tena FJA. Plantas Medicinales del Estado de Durango y Zonas Aledañas [Internet]. México. Talleres Gráficos de la Dirección de Publicaciones del Instituto Politécnico Nacional; 2004: 11-31. [Consultado el 9 de Septiembre de 2014]. Disponible en:

<http://www.libros.publicaciones.ipn.mx/PDF/1490.pdf>

4. Kuklinski C. Farmacognosia. Estudio de las drogas y Sustancias Medicamentosas de Origen Natural. Barcelona: Omega. 2000.

5. Kinghorn D. Pharmacognosy in the 21st century. *J Pharm Pharmacol*. 2001; 53: 135-148.

6. Phillipson J. Phytochemistry and pharmacognosy. *Phytochemistry*. 2007; 68: 2960–2972.

7. Milad R, El-Ahmady S, Nasser A. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): A Review of Its Ethnomedicinal, Botanical, Chemical and Pharmacological Properties. *European J Med Plants*. 2014; 4(1): 86-104.
8. Afzal M, Gupta G, Kazmi I, Rahman M, Afzal O, Alamc J, et al. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. *Fitoterapia*. 2012; 83: 853–858.
9. Ibrahim T, Cunha J, Madi K , Fonseca L, Costa S, Goncalves V. Immunomodulatory and anti-inflammatory effects of *Kalanchoe brasiliensis*. *J Immunopharmacol*. 2002; 2: 875–883.
10. Cruz E.A, Reuter S, Martin H, Dehzad N, Muzitano M.F, Costa S.S, et al. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. *Phytomedicine*. 2012; 19: 115– 12.
11. Dimo t, Fotio A, Nguelefack T.B, Asongalem E.A, Kamtchouing P. Antiinflammatory activity of leaf extracts of *Kalanchoe crenata* Andr. *Indian J Pharmacol*. 2006; 38(2): 115-119.
12. Asiedu-Gyekye I, Ansong D, Agyei K, Awortwe C. Comparative study of two *kalanchoe* species: total flavonoid, phenolic contents and antioxidant properties. *Afr J Pure Appl. Chem*. 2012; 6(5): 65-73.
13. Lai Z, Ho Y, Huang S, Huang T, Lai S, Tsai J, et al. Antioxidant, Anti-inflammatory and Antiproliferative Activities of *Kalanchoe gracilis* (L.) DC Stem. *Am J Chin Med*. 2011; 39(6): 1275–1290.

14. Argueta A. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana [Internet]. México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana; 2009 [Consultado el 15 Septiembre de 2014]. Disponible en:

<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>

15. Plantas medicinales de México [Internet]. México; 2014 [Consultado el 02 de Octubre de 2014]. Disponible en:

<http://plantasdemexico.blogspot.mx/2014/06/aranto-kalanchoedaigremontiana.html>

16. Trópicos. Catalogue of the Vascular Plants of Madagascar [Internet]. México; 2014 [Consultado el 05 de Octubre de 2014]. Disponible en:

<http://www.tropicos.org/Name/8901435?projectid=17>

17. SIB. Catálogo de especies [Internet]. México; 2014 [Consultado el 28 de Octubre de 2014]. Disponible en:

<http://www.sibcolombia.net/web/sib/home>

18. Shirobokov VP, Evtushenko AI, Lapchik VF, Shirobokov DN, Suptel EA. Antiviral activity of representatives of the family Crassulaceae. Antibiotiki. 1981; 26 (12): 897- 900.

19. Espinós D, A. López A, Calvo E. Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación [Internet]. México: Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía XV. Nuevos avances en medicamentos. [Consultado el 29 de Octubre de 2014]. Disponible en: <http://www.analesranf.com/index.php/mono/article/viewFile/536/554>

20. Robbins R, Cotran R. Patología estructural y funcional. 8^a ed. España: Elsevier; 2010.
21. García P. Inflamación. RAC. 2008; 102(1): 91-159.
22. Rosado J, Mendoza V. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. Bioquímica. 2007; 32(2): 58-69.
23. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Patología humana. 7^a ed. España: Elsevier; 2004.
24. Rodríguez R. Guía de Farmacología y Terapéutica. 1^a ed. México: McGraw Hill; 2007.
25. Parham P. El sistema Inmune. 3^a ed. México: El Manual Moderno; 2011.
26. Parakrama C. Patología general. 3^a ed. México: El Manual Moderno; 2003.
27. Parslow GT, Stites PD. Inmunología básica y clínica. 10^a ed. México: El Manual Moderno; 2002.
28. Pastrana J, García de Casasola G. Fisiopatología y patología general básicas para ciencias de la salud. España: Elsevier; 2013.
29. Fainboim L, Geffner J. Introducción a la inmunología humana. 5^a ed. Argentina: Médica Panamericana; 2005.
30. Mitchel NR. Compendio de Robinson y Cotran: Patología estructural y funcional. 8^a ed. España: Elsevier; 2012.

31. Gonzales A, Elizondo S, Gutiérrez G, León J. Implicaciones fisiopatológicas entre inflamación crónica y el desarrollo de diabetes y obesidad *Cir Cir.* 2011; 79 (2): 209-216.
32. Bayarsaihan D. Epigenetic Mechanisms in Inflammation. *J Dent Res.* 2011; 90(1):9-17.
33. Grossman S, Mattson C. Porth Fisiopatología: Alteraciones de la salud Conceptos básicos. 9ª ed. España: Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
34. Karasuyama H, Obata K, Wada T, Tsujimura Y, Mukai K. Newly appreciated roles for basophils in allergy and protective immunity. *Allergy.* 2011; 66:1133-1141.
35. Pardo J. Anatomía Patológica. 2ª ed. España: Harcourt; 1997.
36. García T. Fundamentos de inmunobiología [Internet]. México: Universidad Nacional Autónoma de México; 1997 [Consultado el 11 de Noviembre de 2014]. 551 p. Disponible en:
http://books.google.com.mx/books?id=YpP4WeZ2x14C&printsec=copyright.&redir_esc=y
37. Laso G, Javier F. Patología General. Introducción a la medicina clínica. México: MASSON; 2005.
38. Goldsby R, Kindt T, Osborne B, Kuby M. Inmunología 5ª ed. México: McGraw Hill; 2004.

39. McCartney-Francis N, Song X, Mizel D, Wahl S. Selective Inhibition of Inducible Nitric Oxide Synthase Exacerbates Erosive Joint Disease. *J Immunol.* 2001; 166: 2734-2740.
40. Mendoza N. *Farmacología médica.* México: Médica Panamericana; 2008.
41. Batlouni M. Anti-inflamatórios não esteroides: Efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arq. Bras. Cardiol.* 2010; 94 (4): 556-563.
42. Brunton L, Parker K, Blumenthal D, Buxton I. Goodman y Gilman. *Manual de farmacología y terapéutica.* México: Mc Graw Hill; 2009.
43. Serra H, Roganovich J, Rizzo L. Glucocorticoides: paradigma de medicina traslacional de lo molecular al uso clínico. *Medicina.* 2012; 72 (2): 158-170.
44. Katzung BG. *Farmacología Básica Clínica.* 10ª ed. México: El Manual Moderno; 2007.
45. Universitat de Barcelona. Una aplicación: introducción al bioensayo. [Internet] México. [Consultado el 16 de Noviembre de 2014]. Disponible en:
<http://www.ub.edu/stat/GrupsInnovacio/Statmedia/demo/Temas/Capitulo13/B0C13m1t10.htm>
46. Merino J, Merino R. Aportación de los modelos animales al estudio y el tratamiento de las enfermedades autoinmunitarias sistémicas. *Reumatol Clin.* 2008; 4: 5-10.

47. Herráez V, Herranz R, López M. ¿Qué es un modelo animal? .Gaceta óptica. 2004; (382): 20-24.
48. Hernández S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. Biomedicina. 2006; 2(3): 252-256.
49. Chow PK, Mg RT, Ogden Be. Using animal models in biomedical research. Singapore: World Scientific; 2007.
50. Del Cañizo J, López D, Lledó E, García P. Diseño de modelos experimentales en investigación quirúrgica. Actas Urol Esp. 2008; 32(1): 27-40.
51. Altamirano A. Manual para manejo de animales de laboratorio. México: UNAM. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza; 1994.97 p.
52. Carbon C, Maschi F. El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. Química Viva. 2006; 5(1): 19-23.
53. Takao K, Miyakawa T. Genomic responses in mouse models greatly mimic human inflammatory diseases. Proc Natl Acad Sci. U.S.A. 2014; 112(4): 1167-1172.
54. Harvey A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. Drug Discovery Today. 2000; 5(7): 294-300.
55. Costa I, Rios F, Melo R, Martinez M, Macedo M, et al. Ethnopharmacology of Medicinal Plants of the Pantanal Region (Mato Grosso, Brazil). Evid Based Complement Alternat Med. 2012; vol. 2012: Article 36 pages.

56. Marroquín R, Flores M, Carreón R, García M, Mora J, Aguilar A, Hernández A. The effect of the aqueous extract of *Helietta parvifolia* A. Gray (Rutaceae) stem bark on carrageenan-induced paw oedema and granuloma tissue formation in mice. *J Ethnopharmacol.* 2009; 124(3): 639-641.
57. Vogel WH, Schölkens BA, Sandow J, Müller G. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. 2^a ed. Alemania: Springer; 2002.
58. Gómez H, González K, Domingo J. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Bol. Latinoam. Caribe Plantas Med Aromát* 2011; 10(3):182-217.
59. De Faria L, Silva C, Ferreira F, Tavares J. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae). *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2011; 7(2): 1-8.
60. García A, Morales R, Porta M, Rubio E, Ochoa J. Superoxide dismutase and Naproxen in the very late phase of carrageenan induced edema in rats. *La Revista de Investigación Clínica.* 2000; 52(2): 156-159.
61. Said S. Proinflammatory and Antiinflammatory Peptides. United States of America: MARCEL DEKKER, INC; 1988.
62. Matiz G, Franco L, Rincón J. Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L. (Swartz). *Rev Univ Ind Santander. Salud.* 2011; 43(3): 281-287.

63. Alfieri A. Óxido Nítrico: estudios sobre su papel como mediador en diversas funciones fisiológicas y fisiopatológicas. [Internet]. México: VITAE: Academia Biomédica Digital 2003 [Consultado el 28 de Noviembre de 2014]. Disponible en: http://vitae.ucv.ve/pdfs/VITAE_3213.pdf
64. Nielsen AH, Olsen CE, Moller BL. Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. *Phytochemistry*. 2005; 66: 2829–2835.
65. Muzitano MF, Cruz EA, De Almedia AP, Da Silva SAG, Kaiser CR, Guette C, et al. Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta medica*. 2006; 72: 81-83.
66. Singab AB, El-Ahamdy SH, Labib RM, Fekry SS. Phenolics from *Kalanchoe marmorata* Baker, family *Crassulaceae*. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. 2011; 49: 1–5.
67. Megawati AK, Fajriah S. 3',4'-Dimethoxy Quercetin, a Flavonol Compound Isolated from *Kalanchoe pinnata*. *J App Pharm Sci*. 2013; 3(1): 88-90.
68. Wu PL, Hsu YL, Wu TS, Bastow KF, Lee KH. Kalanchosides A-C, new cytotoxic bufadienolides from the aerial parts of *Kalanchoe gracilis*. *Organic Letters*. 2006; 8: 5207-5210.
69. Costa SS, Souza MM, Ibrahim T, Melo GO, Almeida AP, Guette C, et al. Kalanchosine dimalate, an anti-inflammatory salt from *Kalanchoe brasiliensis*. *J Nat Prod*. 2006; 69: 815-818.