



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

“Estudio químico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de *Senna crotalarioides* Kunth”

T E S I S

Que para obtener el grado de
Maestro en Biología Experimental

P R E S E N T A

Q.F.B. José Roberto Serrano Vega

Codirectores:

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez (UAM-X)

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar (UAM-I)

Asesor:

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez (UAM-I)

“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”.

Número de registro de la beca otorgada por CONACYT: 302033

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Estudio químico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de *Senna crotalarioides* Kunth“, que presentó

José Roberto Serrano Vega

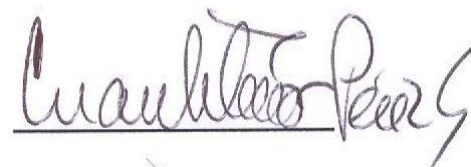
El día 5 de Octubre del año 2015

Sinodales:

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez
Departamento de Ciencias de la Salud
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa



Dr. Cuauhtémoc Pérez González
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco



Dra. Elizabeth Sánchez Miranda
Departamento de Sistemas Biológicos
Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco



Dr. David Osvaldo Salinas Sánchez
Departamento de Recursos Naturales CIByC
Universidad Autónoma del Estado de Morelos



Comité Tutorial

Codirector:

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Departamento de Sistemas Biológicos

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco

Codirector:

Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Asesor:

Dr. Julio Cesar Almanza Pérez

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

Dedicatoria

La concepción de este proyecto está dedicada a mis padres. Sin ellos, jamás hubiese podido conseguir lo que hasta ahora. Su tenacidad y lucha insaciable han hecho de ellos el gran ejemplo a seguir y destacar, no solo para mí, sino para mis hermanos y familia en general.

Roberto Serrano

Agradecimientos

A:

Mis padres Ramos Serrano y María Vega, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica como de la vida, por su incondicional apoyo y paciencia a través de mi formación.

Mis hermanos, Uriel Serrano, José Manuel Serrano y María Guadalupe Serrano, por estar conmigo y apoyarme en todo momento.

A mis directores de tesis:

A la Dra. Salud Pérez por la orientación, motivación, la ayuda incondicional que me brindó para la elaboración de esta tesis y sobre todo por la oportunidad de realizar mi proyecto en el laboratorio de Investigación Químico Orgánica y Productos Naturales ya que sin todo esto no hubiese podido llevar a cabo este gran sueño.

Dr. Francisco Alarcón por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo al aceptarme como su alumno y por todo su tiempo en la culminación de esta investigación.

A mi asesor, el Dr. Julio Almanza por sus excelentes enseñanzas en laboratorio ya que sin estas no hubiese podido concluir la parte experimental de este proyecto.

Al Dr. Cuauhtémoc Pérez por su enorme paciencia, los consejos brindados y por la disciplina que formó en mí durante mi estancia en el laboratorio.

A Osvaldo Campos y su hermosa familia por su apoyo, paciencia y compañía durante el primer año de maestría.

A mis compañeros y amigos de laboratorio Cristina, Axel, Miguel y Julio Meneses por su compañía durante la realización de los experimentos para que estos fuesen más amenos.

A todos y cada uno de ustedes, mil gracias.

Resumen

La inflamación es un proceso tisular constituido por una serie de fenómenos moleculares, celulares y vasculares de finalidad defensiva frente a agresiones físicas, químicas o biológicas. Clásicamente la inflamación se ha considerado integrada por los cuatro signos: Calor, Rubor, Tumor y Dolor. De acuerdo a la intensidad y duración de la lesión que origine la inflamación, esta se divide en aguda, sub-aguda y crónica.

El proceso inflamatorio se presenta en numerosos padecimientos, entre ellos la artritis reumatoide y otras enfermedades autoinmunes para las cuales es necesario encontrar agentes terapéuticos que permitan mejorar la salud del paciente.

Para el tratamiento de la inflamación se usan básicamente dos tipos de medicamentos antiinflamatorios, los esteroidales (AIEs) y los no esteroidales (AINEs). Los AIEs tienen efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, actuando sobre las manifestaciones iniciales y tardías de la inflamación en esta última actúan acelerando el proceso de cicatrización y de reparación de los tejidos. Los AINEs son los medicamentos que se usan con mayor frecuencia debido a que bloquean la síntesis de los mediadores de la inflamación, por lo que son capaces de suprimir algunos de los signos y síntomas de esta, pero el uso prolongado de estos produce efectos adversos en el organismo.

En la búsqueda de estos agentes antiinflamatorios, las plantas medicinales son un recurso natural que es necesario explorar.

Senna crotalarioides es un arbusto de tallos erguidos que en la medicina tradicional, se utiliza para tratar diferentes tipos de inflamación (García *et al*, 2011); (Herbología, 2002). Fue colectada en las Comadres Municipio de Guadalupe el estado de San Luis Potosí, se dejó secar a la sombra y se trituró.

Preparación de los extractos: El extracto clorofórmico se obtuvo por calentamiento a temperatura de ebullición durante 4 horas, se dejó enfriar y se filtró. Se eliminó el

disolvente en un rotavapor. Posteriormente se obtuvo el extracto metanólico, siguiendo la misma técnica.

Actividad antiinflamatoria: Se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos y fracciones en el modelo de edema auricular en ratón inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA). En grupos de 8 animales. La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 2.5 μ L de TPA. Media hora después, se administraron los tratamientos en una dosis de 2 mg/oreja (fármaco de referencia indometacina). Después de 6 horas los animales se sacrificaron y se cortaron discos de 8 mm de diámetro de ambas orejas y se pesaron. La diferencia de peso se tomó como expresión del edema.

Separación e identificación: El extracto clorofórmico se separó por cromatografía en columna empacada con sílica gel como fase estacionaria y hexano como fase móvil aumentando la polaridad con acetato de etilo. Para la identificación del compuesto responsable se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a masas (CG/MS).

Evaluación de mediadores involucrados en el proceso inflamatorio: se trabajó con la línea celular J774A.1 de macrófagos, los cuales fueron tratados a una concentración de 25 μ g/ml de tratamiento tanto de *S. crotalarioides* como del fármaco de referencia. Dos horas después fueron estimulados con 5 μ g/ml de LPS, se dejaron incubar por 24 horas para posteriormente recuperar el sobrenadante y hacer la determinación de los mediadores inflamatorios por la técnica de ELISA, también se obtuvieron las células, despegándolas de forma mecánica para realizar la expresión génica de los TNF- α e IL-6 por PCR.

Los resultados obtenidos indican que el extracto clorofórmico inhibe significativamente el edema auricular, con valores de 64.29 % similar al obtenido con indometacina (67.62 %). Las fracciones 6, 7 y 8 de la separación del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* inhiben significativamente el edema, con valores de 62.32, 68.67 y 68.08 % respectivamente. De la separación de la fracción 8 se

obtuvieron 5 fracciones las cuales fueron evaluadas en el modelo de edema auricular y de las cuales solo la subfracción 8.5 mostró actividad antiinflamatoria (50.91%).

Los resultados muestran que la subfracción activa producto de la separación de la fracción 8 del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* suprimió significativamente la liberación al medio de los mediadores TNF- α e IL-6.

De acuerdo con los análisis realizados a la fracción activa se pudo identificar uno de los compuestos presentes en el extracto clorofórmico, el cual es ácido ursólico, compuesto responsable de la actividad antiinflamatoria, al poseer un mecanismo de inhibición a nivel de la fosfolipasa A2.

El extracto clorofórmico y la fracción 8 tienen actividad en un modelo de inflamación aguda, los resultados muestran que la subfracción 8.5 obtenida de la separación de la fracción activa del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* presenta actividad antiinflamatoria en un modelo *in vitro* debido a que suprimió la liberación de los mediadores TNF- α e IL-6. El análisis por cromatografía de gases acoplado a masas arroja como resultado la presencia de ácido ursólico, compuesto al que se le atribuye la actividad antiinflamatoria de esta planta.

Abstract

The inflammation is a process consisting of a number of molecular, cellular and vascular phenomena defensive purposes against physical, chemical or biological attacks. Classically inflammation has been considered composed of four signs: warm, flushing, and tumor pain. According to the intensity and duration of the injury that results in inflammation, this is divided into acute, subacute and chronic.

The inflammatory process occurs in many diseases, including rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases for which therapeutic agents must be found to improve patient health.

For the treatment of inflammation two types of antiinflammatory drugs, steroidal (EIAs) and drugs (NSAIDs) are primarily used. EIAs have anti-inflammatory and immunosuppressive effects, acting on early and late manifestations of inflammation in this last act accelerating the process of healing and tissue repair. NSAIDs are the drugs used most frequently because they block the synthesis of inflammatory mediators, so that they are able to suppress some of the signs and symptoms of this, but prolonged use of these produces adverse effects organism.

In pursuit of these antiinflammatory agents, medicinal plants are a natural resource that must be explored.

Senna crotalarioides is a shrub of upright stems that traditional medicine is used to treat different types of inflammation (Garcia *et al*, 2011); (Herbology, 2002). It was collected in the municipality Guadalupe the state of San Luis Potosi, allowed to dry in the shade and ground.

Preparing extracts: The chloroform extract was obtained by heating at boiling temperature for 4 hours, allowed to cool and filtered. The solvent was removed on a rotary evaporator. Subsequently the methanol extract was obtained by following the same technique.

Antiinflammatory activity: antiinflammatory activity of the extracts and fractions were evaluated in the model of mouse ear edema induced in 13-acetate 12-O-tetradecanoylphorbol (TPA). In groups of 8 animals. The right ear of each mouse received topical application of 2.5 mL of TPA. Half an hour later, the treatments were administered at a dose of 2 mg / ear (indomethacin drug reference). After 6 hours the animals were sacrificed and discs 8 mm in diameter of both ears were cut and weighed. The difference in weight was taken as edema expression.

Separation and Identification: The chloroform extract was separated by column chromatography packed with silica gel as stationary phase and hexane as mobile phase increasing the polarity with ethyl acetate. To identify the responsible compound chromatography analysis coupled to mass (GC/MS) was performed gases.

Evaluation of mediators involved in the inflammatory process: worked with the J774A.1 macrophage cell line, which were treated at a concentration of 25 µg / ml *S. crotalariaoides* treating both as reference drug. Two hours later they were stimulated with 5 µg / ml LPS, were allowed to incubate for 24 hours to subsequently recover the supernatant and make the determination of inflammatory mediators by ELISA, cells, separating mechanically were also obtained for the gene expression of TNF-α and IL-6 by PCR.

The results indicate that the chloroform extract significantly inhibited the ear edema, with values of 64.29% similar to that obtained with indomethacin (67.62%). Fractions 6, 7 and 8 separating the chloroform extract of *S. crotalariaoides* significantly inhibit the edema, with values of 62.32, 68.67 and 68.08% respectively. Separation of fraction 8 5 fractions which were evaluated in the model of ear edema and of which only showed antiinflammatory subfraction 8.5 (50.91%) activity were obtained.

The results show that active subfraction separating product fraction 8 of the chloroform extract of *S. crotalariaoides* significantly suppressed the release to the TNF-α and IL-6 mediators.

According to the analyzes to active fraction was identified one of the compounds present in the chloroform extract, which is ursolic acid, compound responsible for the antiinflammatory activity, possessing a mechanism of inhibition at the level of phospholipase A2.

The chloroform extract and fraction 8 has activity in a model of acute inflammation, the results show that 8.5 subfraction obtained from the separation of the active fraction of the chloroform extract of *S. crotalarioides* exhibits anti-inflammatory activity in an in vitro model because suppressed the release of TNF- α and IL-6 mediators. The chromatographic analysis yields coupled to mass gases result in the presence of ursolic acid, the compound attached to the antiinflammatory activity of this plant.

Índice

Comité Tutorial.....	iv
Dedicatoria	v
Agradecimientos.....	vi
Resumen.....	vii
Abstract	x
1. Introducción.....	1
1.1. Inflamación.....	3
1.1.1. Fases de la inflamación	4
1.2. Mediadores inflamatorios	5
1.3. Tratamiento farmacológico.....	6
1.3.1. Antiinflamatorios esteroideos (AIEs).....	6
1.3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)	7
1.1.1. Productos naturales para el desarrollo de nuevos medicamentos.....	8
1.1.2. Compuestos antiinflamatorios de origen natural.....	9
1.1.3. Antiinflamatorios obtenidos de fuentes naturales	9
1.2. <i>Senna crotalarioides</i> (Kunth).....	11
1.3. Métodos de obtención de principios activos.....	11
1.3.1. Métodos extractivos.....	12
1.3.2. Purificación y Aislamiento.....	15
1.3.3. Métodos analíticos para la identificación de compuestos orgánicos.....	17
1.4. Evaluación <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de la actividad antiinflamatoria	19
2. Justificación.....	23
3. Pregunta de Investigación.....	23
4. Hipótesis	23
5. Objetivos	23
5.1. Objetivo general	23
5.2. Objetivos específicos	23

6.	Materiales Y Métodos	24
6.1.	Material biológico	24
6.2.	Preparación del extracto	24
6.3.	Lavado con Hexano	24
6.4.	Aislamiento e identificación del compuesto responsable de la actividad.....	25
6.5.	Evaluación de actividad antiinflamatoria	26
6.6.	Evaluación de mediadores inflamatorios.....	27
6.7.	Análisis estadístico.....	28
7.	Resultados	29
8.	Discusión.....	45
9.	Conclusiones.....	49
10.	Bibliografía.....	50

Índice de tablas

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico y metanólico de <i>S. crotalarioides</i> en el edema auricular en ratón inducido con TPA.....	29
Tabla 2. Actividad antiinflamatoria del lavado con hexano y el residuo del extracto clorofórmico de <i>S. crotalarioides</i> en el edema auricular en ratón inducido con TPA.....	29
Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de las fracciones 1 y 2 obtenidas de la separación del residuo de <i>S. crotalarioides</i> en el edema auricular en ratón.....	31
Tabla 4. Actividad antiinflamatoria de las fracciones 3 a 6 obtenidas de la separación del residuo de <i>S. crotalarioides</i> en el edema auricular en ratón.....	31
Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de las fracciones 7 y 8 obtenidas de la separación del residuo de <i>S. crotalarioides</i> en el edema auricular en ratón.....	32
Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de la fracción 8 después del tratamiento con carbón activado en el edema auricular en ratón inducido con TPA.....	34
Tabla 7. Estructuras identificadas presentes en la fracción 8, obtenidas en el análisis por cromatografía líquida acoplada a masas.....	36
Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de la separación de la fracción 8 en el edema auricular en ratón.....	37
Tabla 9. Lista de los compuestos identificados presentes en la subfracción 8.5, obtenidas en el análisis por cromatografía de gases acoplada a masas.....	43

Índice de figuras

Figura 1. Evaluación del extracto clorofórmico y metanólico de <i>S. crotalariaoides</i> en el edema auricular en ratón inducido con TPA.....	30
Figura 2. Evaluación del lavado con hexano y el residuo del extracto clorofórmico de <i>S. crotalariaoides</i> en el edema auricular en ratón inducido con TPA.....	30
Figura 3. Evaluación de las fracciones 1 y 2 obtenidas de la separación del residuo de <i>S. crotalariaoides</i> en el edema auricular en ratón.....	32
Figura 4. Evaluación de las fracciones 3 - 6 obtenidas de la separación del residuo de <i>S. crotalariaoides</i> en el edema auricular en ratón.....	33
Figura 5. Evaluación de las fracciones 7 y 8 obtenidas de la separación del residuo de <i>S. crotalariaoides</i> en el edema auricular en ratón.....	33
Figura 6. Evaluación de la fracción 8 después del tratamiento con carbón activado en el edema auricular en ratón inducido con TPA.....	34
Figura 7. Prueba de viabilidad celular de la fracción 8 en la línea celular J774A.1 ...	35
Figura 8. Prueba de viabilidad celular de la fracción 8 en la línea celular J774A.1 ...	35
Figura 9. Evaluación de las subfracciones obtenidas de la separación de la fracción 8 del extracto clorofórmico de <i>S. crotalariaoides</i> en el edema auricular en ratón.....	38
Figura 10. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.1 en la línea celular J774A.1.....	38
Figura 11. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.2 en la línea celular J774A.1.....	39
Figura 12. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.3 en la línea celular J774A.1.....	39

Figura 13. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.4 en la línea celular J774A.1.....	40
Figura 14. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.5 en la línea celular J774A.1.....	40
Figura 15. Efecto de <i>S. crotalarioides</i> sobre la expresión génica de IL-6 en células J774A.1 estimuladas con LPS.....	41
Figura 16. Efecto de <i>S. crotalarioides</i> sobre la expresión génica de TNF- α en células J774A.1 estimuladas con LPS.....	42
Figura 17. Efecto de <i>S. crotalarioides</i> sobre la liberación al medio de IL-6 en células J774A.1 estimuladas con LPS.....	42
Figura 18. Efecto de <i>S. crotalarioides</i> sobre la liberación al medio de TNF- α en células J774A.1 estimuladas con LPS.....	43
Figura 19. Cromatograma de la subfracción 8.5 obtenida de la separación de <i>S. crotalarioides</i>	44

Lista de abreviaturas

AA - Ácido araquidónico

AIE - Antiinflamatorio esteroideo

AINE - Antiinflamatorio no esteroideo

ANOVA - Análisis de varianza unifactorial

CC - Cromatografía en columna

CCP - Cromatografía en capa fina

CG/MS - Cromatografía de gases acoplado a masas

CL/MS - Cromatografía líquida acoplado a masas

COX - Enzima ciclooxigenasa

eNOS - Sintasa endotelial del óxido nítrico

HPLC - Siglas en inglés de cromatografía de líquidos de alta resolución

IL - interleusina

iNOS - Sintasa inducible del óxido nítrico

LOX - Enzima lipooxigenasa

LPS - Lipopolisacarido

MTT - Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difenilretrazol

NF- κ B - Factor de transcripción nuclear kappa beta

nNOS - Sintasa neuronal del óxido nítrico

NO - Óxido nítrico

PMN - Polimorfonucleares

RMN - Resonancia magnética nuclear

RNS - Siglas en inglés de especies reactivas de nitrógeno

ROS - Siglas en inglés de especies reactivas de oxígeno

TNF- α - Factor de necrosis tumoral alfa

TPA - 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol

1. Introducción

La inflamación es una respuesta defensiva fisiológica que está relacionada con diversos padecimientos crónicos degenerativos, los cuales pueden afectar prácticamente a cualquier órgano o tejido del cuerpo humano. Sin embargo, algunos de ellos destacan por su alta frecuencia y por los graves daños que producen a quienes lo padecen, por ejemplo: infecciones, obesidad, enfermedad cardiovascular y cerebrovascular, hipertensión arterial, diabetes mellitus. Además de las lesiones provocadas por golpes, torceduras y traumas postoperatorios (Bhaskar *et al*, 2010; Petersen & Pedersen, 2005).

La inflamación comprende cambios vasculares y celulares que se manifiestan como signos que caracterizan un proceso inflamatorio son: aumento de volumen (edema), enrojecimiento, calor, dolor y pérdida de la función del tejido afectado (Borazan & Binici, 2010; Hardman *et al*, 1996).

Los compuestos utilizados para combatir la inflamación son conocidos como analgésicos antiinflamatorios esteroidales (AIEs) y como analgésicos antiinflamatorios no esteroidales (AINEs), los cuales, en general ejercen su acción inhibiendo el metabolismo del ácido araquidónico, que es uno de los precursores principales de la inflamación. Sin embargo, los AINEs producen efectos adversos severos, tales como alteración de las funciones plaquetarias, úlceras gastrointestinales e infartos de miocardio (Goldenberg *et al*, 2005).

Los AIEs actúan sobre monocitos y macrófagos, inhibiendo la fosfolipasa A2, el metabolismo del ácido araquidónico y sus metabolitos. Entre los efectos adversos que provocan se encuentran arritmias cardíacas, disfunciones renales y alteraciones en el transporte de electrolitos (Hardman *et al*, 1996).

Ya que muchos de estos fármacos provocan efectos adversos, se plantea la necesidad de encontrar compuestos con actividad biológica, que permitan el tratamiento de enfermedades y/o malestares que aquejan a la sociedad y al mismo tiempo, tengan menos efectos no deseados. Los productos naturales son una buena

opción para obtener fármacos con actividad antiinflamatoria con menos efectos adversos.

En México se han realizado estudios sobre el efecto antiinflamatorio de algunas plantas y varias de ellas han mostrado actividad. Sin embargo, a pocas de ellas se les han realizado estudios químicos formales para el aislamiento y elucidación de los compuestos responsables de dicha actividad.

Por lo tanto, resulta importante que al estudiar la actividad farmacológica de las plantas usadas en la medicina tradicional se utilicen modelos apropiados, y una vez corroborado el efecto biológico, encaminar los estudios al aislamiento biodirigido e identificación química de los compuestos activos, lo que posteriormente permitirá el desarrollo de nuevos fármacos para el control y manejo de padecimientos comunes dentro de la población mexicana, tal como la inflamación y padecimientos relacionados.

1.1. Inflamación

La inflamación es una de las formas en que nuestro organismo hace frente al daño producido por una lesión que puede ser originada por agentes físicos, químicos y biológicos. Existen signos y síntomas que son clásicos para poder identificar la inflamación, y estos son: rubor, edema, calor, dolor y fiebre, aunque a estos se le ha anexado uno más que es la pérdida de la función motora de la zona dañada (Halachmi *et al*, 2006). Para que estos signos puedan aparecer es necesario que el organismo lleve a cabo ciertos procesos, como lo es la localización de la zona dañada, para poder encaminar la respuesta ante el agente agresor, esta respuesta debe ser de carácter inmediato y urgente. Una vez localizada la zona o sitio donde se está llevando a cabo el proceso de inflamación el organismo se encargará de reclutar a las células participantes para poder hacer frente a la agresión que está originando el problema (Boukthir *et al*, 2010; Huang *et al*, 2004; Halachmi *et al*, 2006).

Dependiendo de la duración, intensidad y las características presentes en la zona afectada, la inflamación puede dividirse en aguda, subaguda y crónica.(Halachmi *et al*, 2006; Kayhan *et al*, 2013).

La inflamación aguda se inicia con los cambios vasculares en la zona afectada, la movilización de las células participantes a la zona y la liberación de los mediadores inflamatorios, con estos acontecimientos se presenta la aparición del edema y la coloración roja. La inflamación aguda es de duración corta ya que en la mayoría de los casos la eliminación del agente agresor no presenta dificultad.(Barrett, 2013; Perez *et al*, 2013; Kumar *et al*, 2004).

La inflamación subaguda es un problema de duración mayor, puede ser de uno a tres días después de haber estado en contacto con el agresor. Dentro de este proceso los acontecimientos que ocurren son la movilización y reclutamiento de linfocitos y monocitos en el sitio donde se está llevando a cabo el proceso inflamatorio y la formación de tejido fibroso, esto provoca que los signos como edema y rubor, característicos de la inflamación tengan una mayor duración. (Barrett, 2013; Kumaret *al*, 2004; Miyazaki *et al*, 2005).

La inflamación crónica es el proceso inflamatorio de mayor duración ya que puede ir desde semanas hasta años. Dentro de los acontecimientos que podemos observar se encuentran: signos y síntomas de la inflamación amplificados y la destrucción de los tejidos en la zona dañada ya que este no puede regresar a su estado basal. Existe la presencia constante de las células participantes, como linfocitos, monocitos, macrófagos y células plasmáticas. La inflamación crónica es una evolución del proceso agudo al no haberse corregido correctamente el daño del agente agresor, esta complicación desencadena a las diversas enfermedades como; asma y artritis reumatoide. (Barrett, 2013; Miyazaki *et al*, 2005).

Aunque es probable que muchos agentes causen un daño al organismo, como los microorganismos, el frío, el calor, químicos, electricidad o un trauma mecánico, la respuesta inflamatoria a todas estas causas es similar. La respuesta moviliza las defensas del cuerpo, aísla y elimina los agentes dañinos, luego remueve los materiales extraños y las células dañadas, para llevar a cabo la reparación del tejido. La inflamación se acompaña de tres eventos característicos: dilatación capilar para aumentar el flujo sanguíneo, cambios en la estructura microvascular facilitando el paso de proteínas plasmáticas y de leucocitos, migración y acumulación de leucocitos en la zona afectada. (Ley, 2001; Tracey, 2002; Murphy *et al*, 2003).

1.1.1. Fases de la inflamación

La inflamación incluye dos fases principales: la etapa vascular y etapa celular. Estas etapas son de gran importancia ya que de ellas depende la aparición de los eventos posteriores.

Etapa vascular

La etapa se inicia una vez que se está en contacto con el agente agresor que está originando la reacción inflamatoria, para lo cual es necesario que ocurran cambios vasculares en esta zona, en un primer paso se requiere la constricción momentánea de los vasos sanguíneos presentes en esta zona, inmediatamente después se presenta una vasodilatación de las venas y arterias que irrigan el sitio, ya que con

este cambio vascular se consigue incrementar el flujo sanguíneo que a la par ocasiona en el organismo dos de los signos característicos de la inflamación, los cuales son: ruboración y calor. El aumento en la permeabilidad capilar provoca que el líquido pase a los tejidos y comience a acumularse, de modo que se obtiene la formación del edema que va acompañada de la sensación del dolor y en algunos casos de la pérdida de la función. (Robbins, 2008; Abbas *et al*, 2004; Mattson, 2006).

Se le denomina exudación al paso del líquido a través de los capilares a la zona comprometida con la finalidad de diluir el agente agresor.

Dependiendo de la gravedad de la inflamación, esta etapa puede presentar tres diferentes mecanismos, ya sea de forma inmediata, sostenida o prolongada, los cuales derivan del tipo de inflamación que se esté presentando (Robbins, 2008; Abbas *et al*, 2002).

Etapas celulares

Esta etapa se caracteriza por la movilización y reclutamiento de células polimorfonucleares y mononucleares hacia la zona dañada. Las células pueden residir de manera permanente en los tejidos mientras que otras necesitan penetrar la zona únicamente durante el transcurso de la respuesta inflamatoria. Un factor importante para que este tipo de localización suceda es la liberación de mediadores químicos por parte de los leucocitos (mayoritariamente neutrófilos) los cuales afectan de manera directa las células endoteliales facilitando la migración (Zambrano, 2007; Abbas *et al*, 2002; Mattson., 2006; Janeway *et al*, 2005).

1.2. Mediadores inflamatorios

Si bien, lo que hace que se manifieste un proceso inflamatorio puede ser una lesión, los mediadores químicos son la causa de que se lleve a cabo la etapa celular y vascular. Estos pueden originarse en plasma como precursores que deben ser activados, o sintetizados por las células en respuesta a la agresión. Una vez activados y liberados, la mayoría tienen un tiempo de vida corto, ya que son degradados por acción enzimática. (Robbins, 2008).

Los mediadores son de diferente naturaleza, por ello inducen respuestas específicas en las células diana. Estos se pueden clasificar de la siguiente manera:

- Los que poseen propiedades vasoactivas y causan contracción del músculo liso, dentro de estos encontramos la histamina, las prostaglandinas, los leucotrienos y el factor activador de plaquetas.
- Aquellas que poseen factores quimio-atrayentes como las citocinas y las quimiocinas. De las cuales las citocinas pueden clasificarse como: proinflamatorias (IL-1, TNF- α , IL-12, IL-8), y antiinflamatorias (IL-4, IL-10).
- Proteasas plasmáticas que pueden activar el complemento y los componentes del sistema de coagulación.
- Moléculas reactivas liberadas por los leucocitos que cuando son secretadas en el ambiente extracelular pueden dañar el tejido.
- El óxido nítrico, que es producido por una gran variedad de células, desempeña papeles múltiples en la inflamación, como la relajación del músculo liso, antagonismo de funciones plaquetarias, reducción del reclutamiento de leucocitos y destrucción de los agentes microbianos por las células fagocíticas. (Olivera *et al*, 20108; Passani y col., 2007; Li & Verma, 2002; Murakami *et al*, 2000).

1.3. Tratamiento farmacológico

Para el tratamiento de las enfermedades o padecimientos que involucran un proceso inflamatorio se usan básicamente dos tipos de medicamentos, los antiinflamatorios esteroidales (AIEs) y los antiinflamatorios no esteroidales (AINEs). (Goldenberg *et al*, 2005).

1.3.1. Antiinflamatorios esteroideos (AIEs)

Los antiinflamatorios esteroidales o glucocorticoides, tales como el cortisol y la cortisona, son hormonas producidas por la corteza suprarrenal, actúan en cualquier tipo de inflamación sin importar el tipo de agente agresor que lo esté provocando, son los más potentes agentes antiinflamatorios que se conocen. Actúan

disminuyendo la dilatación de los vasos sanguíneos, con ello se obtiene una menor irrigación en la zona y una disminución en la formación del edema. Reduce el número y activación de eosinófilos, también reduce el nivel de algunos mediadores como IL-3 e IL-5, así como la expresión de moléculas de adhesión. Esto último se lleva a cabo mediante la interacción del complejo cortisol-receptor glucocorticoide con el factor de transcripción nuclear NF- κ B. Este factor se une a las secuencias del ADN y estimula la transcripción de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores del complemento, así como la transcripción de la COX-2. (Kawabata *et al*, 2011; Tanabe & Tohnai, 2002).

A pesar de tener un potente efecto antiinflamatorio, son muchos los efectos adversos que se presentan al usar estos antiinflamatorios, dentro de los cuales podemos encontrar: hiperglucemia, glucosuria, agravamiento de la insuficiencia cardiaca, debilidad muscular, riesgo de fractura. (osteoporosis) (Hardman *et al*, 1996; Duggan *et al*, 2010).

1.3.2. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Son los medicamentos que se usan con mayor frecuencia debido a que bloquean la síntesis de los mediadores de la inflamación, por lo que son capaces de suprimir algunos de los signos y síntomas de esta, así como también tienen la capacidad de realizar funciones antipiréticas y analgésicas. (Goldenberg *et al*, 2005; Warner & Mitchell, 2003; Sadowski & Steinmeyer, 2002).

Estos fármacos se agrupan en varias clases químicas:

- a) Salicilatos: Ácido acetilsalicílico, ácido salicílico.
- b) Pirazolonas: Fenilbutazona, metamizol.
- c) Paraminofenol: Paracetamol o acetaminofeno.
- d) Derivados indolacéticos: Indometacina, benzidamina.
- e) Derivados arilacéticos o fenilacéticos: Diclofenaco, pirrolacético (ketorolaco).
- f) Derivados arilpropiónicos: Ibuprofeno, ketoprofeno, naproxeno.
- g) Oxicanes: Piroxicam, meloxicam.

- h) Derivados de la sulfonamida: Nimesulida.
- i) Inhibidores selectivos de COX-2: Celecoxib.

Los AINEs comparten un mismo mecanismo de acción inhibitorio de la enzima ciclooxigenasa (COX), la cual es la responsable de convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos.

Existen dos isoformas de la enzima COX, las cuales son inhibidas por este tipo de compuestos aunque en diferente grado. Sin embargo, solo la inhibición de COX-2 muestra la supresión del proceso inflamatorio, mientras que la inhibición de COX-1 da como resultado efectos adversos en el organismo. (Simmons *et al*, 2000; Masso *et al*, 2010; Hawkey *et al*, 2001).

1.1.1. Productos naturales para el desarrollo de nuevos medicamentos

Los productos naturales nos ofrecen una gran variedad de compuestos con diversas actividades biológicas. Con el paso del tiempo el estudio de los productos naturales ha cobrado gran importancia, ya que los estudios realizados a estos nos proveen de compuestos de interés los cuales necesitan ser evaluados para corroborar los efectos que se le atribuyen. Ya sea que las plantas nos proporcionen estructuras químicas únicas o algún precursor de una sustancia con actividad antiinflamatoria, la farmacología se apoya del empleo de dichas sustancias con el fin de conseguir medicamentos eficaces y seguros para el consumo humano. El uso de las plantas para el alivio y control de un proceso inflamatorio son prácticas comunes en medicina tradicional, que ha cobrado interés por parte de los investigadores ya que las sustancias de origen vegetal nos ofrecen, en algunos casos, ventajas en relación a los antiinflamatorios clásicos, como es la baja incidencia de efectos secundarios. (Yunes *et al*, 2005; Fernández & Torres, 2006).

Otra de las aportaciones que nos han hecho los productos naturales es ayudar a entender mejor cual es el comportamiento de algunas enfermedades en el organismo, el ejemplo más claro es la elucidación del mecanismo de acción del ácido

acetil salicílico que ayudo al descubrimiento de las isoenzimas COX-1 y COX-2. (Yunes *et al.*, 2005; Fernández & Torres, 2006).

1.1.2. Compuestos antiinflamatorios de origen natural

Se ha realizado una gran cantidad de estudios sobre la evaluación antiinflamatoria tanto de extractos como de metabolitos aislados de plantas. Estas pruebas se realizan empleando modelos tanto *in vivo* como *in vitro*. (Newman *et al.*, 2003; Setty & Sigal, 2005).

Uno de los metabolitos obtenidos de fuentes naturales son los terpenos, compuestos derivado del isopreno. El cual ha demostrado inhibir notablemente la síntesis de ARNm y la expresión de las proteínas MMP-3 y MMP-13, inducida por citocinas proinflamatorias como IL-1, IL-17 y TNF- α , las cuales están presentes en enfermedades como osteoartritis. Dentro de estos encontramos a los derivados del Taxol y la tanshinona IIA (Setty & Sigal, 2005).

Otro ejemplo son los flavonoides, una clase de metabolitos aromáticos ampliamente distribuidos en las plantas, los cuales poseen una gran variedad de efectos biológicos entre los que sobresale la actividad antiinflamatoria. Ya que se ha reportado que inhibe los niveles de TNF- α en la línea celular de macrófagos RAW 264.7 estimulados con LPS. Dentro de este grupo de compuestos con actividad antiinflamatoria encontramos: apigenina, quercetina y la sidertoflavonona (Fonseca *et al.*, 2010).

1.1.3. Antiinflamatorios obtenidos de fuentes naturales

Contamos con una gran cantidad de recursos naturales, en los cuales desde tiempos históricos las plantas han sido el primer recurso para el tratamiento de las enfermedades de mayor incidencia en la población.

Con los avances científicos, la búsqueda de tratamientos para mantener la salud humana se ha encaminado a la búsqueda de sustancias biológicamente activas. Se sabe que los productos naturales, específicamente las plantas, son una posible

fuente para la obtención de compuestos que pueden servir como tratamiento para las enfermedades que involucran el proceso inflamatorio. (Butler, 2004).

Es importante recordar que uno de los primeros agentes con actividad antiinflamatoria fue obtenido de fuentes naturales y deriva de la salicilina y en la actualidad es uno de los agentes terapéuticos más utilizados. Por ejemplo, se ha empleado la corteza del sauce blanco para combatir los signos característicos de la inflamación. Con el empleo de estudios más especializados se ha podido caracterizar el mecanismo de acción de la corteza, mostrando que puede inhibir de manera no selectiva COX, con ello bloqueando la producción de prostaglandinas inflamatorias. Otro compuesto del cual se ha logrado elucidar el mecanismo de acción es el psycogenol, derivado de la corteza de pino, el cual posee una mezcla de polifenoles, los cuales han demostrado reducir el proceso inflamatorio al disminuir la producción de TNF- α inducido por la activación de NF- κ B, así como la reducción de moléculas de adhesión. El resveratrol es otro ejemplo de molécula de origen vegetal con propiedades antiinflamatorias, sus efectos se deben a su capacidad de suprimir la expresión de prostaglandinas, ya que inhibe la expresión de TNF- α e IL-1 β inducidos por la activación de NF-KB. (Alvarado & Beirana, 2003; Hebert *et al.*, 2001).

A pesar del uso amplio de los medicamentos antiinflamatorios, la población continúa utilizando otros recursos por la vía empírica, principalmente aquellos de origen vegetal. Así por ejemplo, las investigaciones etnobotánicas reportan gran número de plantas medicinales usadas como antiinflamatorias. Una de ellas es *Senna crotalarioides*.

1.2. *Senna crotalarioides* (Kunth)

Sinonimia popular

Hoja Sen

Sinonimia botánica

Cassia crotalarioides Kunth

Earleocassia crotalarioides (Kunth)



Es una planta que crece en Nuevo León, San Luis Potosí y Estado de México. Es un arbusto o subarbusto perenne de 40-60 cm, de tallos erguidos. En la medicina tradicional, se utiliza para tratar diferentes tipos de inflamación (García *et al*, 2011). Las especies de *Senna* contienen un compuesto químico llamado antraquinona, el cual se conoce por tener un fuerte efecto laxante (Herbología, 2002).

Existe un estudio previo de las propiedades antiinflamatorias y antioxidantes de los extractos de cloroformo, metanol y agua de *S. crotalarioides*. En el cual tanto los extractos clorofórmico y metanólico presentaron actividad sobre el edema auricular inducido con 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), sin embargo no existe registro de un fraccionamiento de los extractos, ni de la identificación o aislamiento de un compuesto al cual se le pueda atribuir la actividad antiinflamatoria (García *et al*, 2011).

1.3. Métodos de obtención de principios activos

La separación y obtención de las sustancias de interés farmacológico requiere de la utilización de métodos fitoquímicos que se llevan a cabo de manera biodirigida dependiendo la naturaleza de los compuestos y se ayuda de técnicas básicas de separación como destilación, extracción, separación cromatográfica, etc. y de técnicas de análisis como las instrumentales que permiten la identificación y elucidación de dichos compuestos.

Existen diferentes posibilidades que podemos emplear para poder obtener los metabolitos o principios activos a partir de las fuentes de origen natural, dentro de ellos podemos encontrar:

1.3.1. Métodos extractivos

Los métodos extractivos, del cual se parte de la planta seca y molida que se someterá al proceso para poder aislar de manera directa los metabolitos con los cuales queremos seguir trabajando. Existen distintas variantes las cuales podemos utilizar para llegar a dicha extracción, los cuales se describen a continuación (Cuevas& Brambila, 2003; Durts & Gokel, 2007; Kuklinski, 2003).

Extracción de tipo mecánica, esta técnica nos permite obtener los metabolitos o principios que se encuentran presentes en los fluidos, la planta no necesariamente tiene que estar seca ya que se puede hacer uso de un objeto punzocortante para poder realizar cortes en ella de los cuales brotara el líquido que lleva consigo los metabolitos. Aunque también podemos hacer uso de algún objeto para ejercer compresión sobre la planta o utilizar una fuente de calor para facilitar la salida de los fluidos propios de la planta (Kuklinski, 2003).

La extracción por destilación, es una de las técnicas más utilizadas, la cual nos permite obtener los metabolitos gracias a las diferencias que existen entre los puntos de ebullición de los componentes presentes en nuestra fuente natural. Dentro de los componentes que nos permite obtener este tipo de técnica se encuentran los aceites esenciales. Dado a que en este método se emplea una fuente de calor para poder llevar a cabo la separación solo es recomendable a compuestos o principios activos termoestables. Dentro de esta técnica existen variantes que podemos utilizar para poder tener una mejor separación, la primera y más sencilla es la destilación simple, la cual se lleva a cabo en una sola etapa, en ella la planta se encuentra sumergida en un disolvente previamente elegido para que pueda llevarse con él los metabolitos, la mezcla se calienta y el compuesto con punto de ebullición más bajo se evapora, este viaja por una columna hasta llegar a un refrigerante donde se condensa permitiéndonos recolectar lo obtenido en la separación. Otra variante que existe es la

destilación de tipo fraccionada, la cual se lleva a cabo en varias etapas gracias a una columna especial empleada en este tipo de técnica, en ella se llevan a cabo un gran número de evaporaciones y condensaciones a lo largo de la columna, lo que hace a esta técnica más eficiente, ya que mientras más etapas de evaporación y condensación se lleven a cabo, mejor será la separación de los componentes de la planta. Por último tenemos la destilación por arrastre de vapor, en la cual se hace pasar una corriente de vapor a través de la mezcla ente la planta y el disolvente, con ello los componentes que son solubles en el vapor son separados del resto de la mezcla. Entre las sustancias que podemos obtener gracias a esta variante se pueden mencionar los aceites esenciales (Cuevas & Brambila, 2003; Durts & Gokel, 2007; Kuklinski, 2003).

La extracción con disolventes es una de las técnicas más utilizadas para la obtención de compuestos presentes en las plantas. El método consiste en sumergir determinada cantidad de planta seca y triturada con un disolvente capaz de solubilizar los principios activos presentes en ella. La mezcla se mantiene por un periodo de tiempo determinado, el cual tiene que ser suficiente para que los metabolitos pasen de la planta al disolvente que estamos empleando. Transcurrido este tiempo separamos la mezcla obteniendo un extracto al cual hay que eliminar la totalidad de disolvente para poder trabajar en él. Para facilitar la extracción por este tipo de método y evitar algún daño que podamos ocasionar a los principios activos presentes en las plantas, es necesario tener en cuenta algunos aspectos que nos ayudaran en el proceso:

El primero, tomar en cuenta las características de la planta, es decir debemos tener en cuenta que es más sencillo trabajar con la planta libre de agua y también debe estar triturada, ya que al estarlo aumentamos la superficie de contacto, lo que nos ayudara a facilitar el paso de los metabolitos al disolvente. El siguiente factor a considerar es la naturaleza del disolvente, en este proceso dentro de los disolventes más utilizados se encuentra el agua y mezclas hidroalcohólicas, también es bastante común el uso de disolventes orgánicos como la acetona, el hexano, acetato de etilo,

metanol y cloroformo. El uso de cualquiera de estos depende de la naturaleza de los principios activos presentes en la planta con la que se está trabajando, en caso de no conocer la naturaleza de los compuestos presentes, es recomendable realizar diferentes extractos empleando distintos disolventes, los cuales deberán ser evaluados para poder determinar en cuál de ellos se encuentran presentes los metabolitos responsables. La temperatura es otro factor que se debe tomar en cuenta, ya que el empleo de una fuente de calor favorece la extracción pues se incrementa la solubilidad de los principios activos en los disolventes empleados. Por último, el tiempo de contacto entre la planta y el disolvente, este depende de las características de la planta y la naturaleza de los metabolitos (Cuevas & Brambila, 2003; Durts & Gokel, 2007; Kuklinski, 2003).

La extracción puede ser de dos tipos, de forma continua y discontinua.

En la extracción discontinua, la planta es colocada en el disolvente seleccionado, una vez hecha esta mezcla la difusión o liberación de los metabolitos presentes se produce en todas direcciones hasta alcanzar un punto de equilibrio. Existen diferentes procedimientos o variantes.

La primera es la maceración, la cual consiste en poner en contacto la planta con el disolvente seleccionado para poder extraer a temperatura ambiente en un periodo de tiempo prolongado los metabolitos de la planta.

Otro variante es la digestión, la cual consiste en el empleo de una fuente de calor, ya que es necesario trabajar a temperaturas más elevadas con el fin de facilitar el paso de los principios activos al disolvente.

También es posible llevar a cabo la extracción de forma discontinua mediante la infusión: que al igual que el procedimiento anterior, requiere de una fuente de calor para poder llevar a cabo la extracción, la gran diferencia es que se emplean temperaturas próximas a ebullición, mientras que en la digestión solo se requiere una temperatura mayor a la ambiental sin llegar al punto de ebullición.

Por último tenemos a la decocción, en la cual se pone en contacto la planta con el disolvente, esta mezcla se lleva a temperatura de ebullición por un periodo de tiempo que va de una a cuatro horas, dependiendo de la naturaleza de los compuestos, una vez transcurrido el tiempo se deja enfriar y se filtra para posteriormente eliminar el disolvente y poder obtener el extracto (Cuevas & Brambila, 2003; Kuklinski, 2003).

También existe la extracción continua, en la cual el disolvente empleado se va renovando a lo largo de todo el proceso y a diferencia de la extracción discontinua este solo actúa en una sola dirección. Esta técnica consiste en poner en contacto la planta con el disolvente adecuado y durante todo el tiempo que dure la extracción mantener un desequilibrio constante entre la concentración de principio activo presente en la planta y el disolvente, para que se produzca una difusión. Algunos ejemplos de este tipo de extracción son la percolación y la extracción por shoxlet. Con el uso de estas técnicas se consigue un mejor rendimiento, pero su uso está limitado ya que se requiere el empleo de una gran cantidad de disolvente durante todo el proceso (Kuklinski, 2003).

1.3.2. Purificación y Aislamiento

Una vez obtenido el extracto con actividad farmacológica es necesario el empleo de técnicas que nos permitan separar el metabolito responsable del efecto farmacológico del resto de compuestos presentes en la planta. Para ello podemos hacer uso de métodos fisicoquímicos y de métodos cromatográficos.

Dentro de los métodos fisicoquímicos se encuentran técnicas como sedimentación, decantación, centrifugación, filtración, precipitación, cristalización, entre otras. Las cuales nos van apoyar eliminando algunas partículas no deseadas (como restos de planta) antes de pasar a la separación de nuestro extracto (Kuklinski, 2003; Skoog *et al*, 2008).

Los métodos cromatográficos, son las técnicas que nos permiten realizar la separación de los componentes presentes en el extracto, debido a la diferencia de velocidad de elución que presentan cuando se hacen pasar a través de una fase

estacionaria, esta separación se produce empleando una fase móvil. Dentro de las técnicas cromatográficas podemos encontrar:

La cromatografía en capa fina CCF: en esta técnica hacemos uso de una placa metálica o de vidrio, la cual está impregnada de material adsorbente formando una capa delgada, a la cual denominamos fase estacionaria. En este método hacemos uso de un capilar para colocar una pequeña cantidad de muestra sobre la placa, después esta se coloca de forma vertical en un recipiente el cual contiene la fase móvil en el fondo, cuidando de no cubrir la zona de aplicación para poder llevar a cabo una correcta separación. La fase móvil puede ser un único disolvente o la mezcla de dos o más con la finalidad de aumentar la polaridad y tener una mejor separación. La fase móvil fluye en forma ascendente por la placa arrastrando los diferentes componentes presentes en la muestra, una vez que el disolvente a recorrido casi por completo toda la placa, debemos retirarla para poder observar la separación, para poder llevar a cabo tal acción es necesario colocar la placa en luz ultravioleta, o utilizar reactivos reveladores específicos como lo es la cámara de yodo (Kuklinski, 2003; Skoog *et al*, 2008).

También podemos hacer uso de la cromatografía líquida, en la cual existe una fase móvil que es un eluyente líquido y una fase estacionaria que puede ser un sólido poroso o un líquido.

Existen muchas variantes de esta técnica, una de ellas es la cromatografía líquida en columna: en la cual la elución de los diferentes componentes de la mezcla se hace por gravedad. La columna se encuentra de forma vertical empacada por un material poroso que en la mayoría de los casos es gel de sílice. La muestra se deposita por la parte superior y se hace fluir la fase móvil, de modo que cuando esta va recorriendo la columna hasta llegar a la parte inferior va arrastrando los componentes de la muestra. En el extremo inferior de la columna se van recogiendo las diferentes fracciones después de haber colectado una cantidad establecida. La elución se lleva a cabo hasta que se han recogido la mayoría de los componentes de la mezcla, la

cual se logra después de ir variando la composición de la fase móvil hasta producir una completa separación (Kuklinski, 2003; Skoog *et al*, 2008).

Una técnica muy parecida a la cromatografía líquida es la cromatografía líquida de alta resolución, la cual se diferencia de la primera en el uso de bombas para poder alcanzar altas presiones para impulsar la fase móvil y con ello llevar a cabo la elución en un menor tiempo. En este sistema la fase estacionaria es una columna compactamente empacada con la fase estacionaria, la cual contiene en su interior distintos materiales los cuales dependerán de las características específicas para cada compuesto. Este es un método de elevada sensibilidad y eficacia por lo que su uso es de gran frecuencia (Skoog *et al*, 2008).

Por último tenemos a la cromatografía de gases la cual se emplea para sustancias volátiles. La fase estacionaria es un líquido que se encuentra en una columna situada en el interior de un horno, esto debido a la temperatura a la que se trabaja y a los diferentes detectores que se pueden usar en esta técnica, como el de conductividad térmica y el de ionización de llama. Mientras que la fase móvil es un gas inerte. Para tener mejores resultados este método puede complementarse con otras técnicas como la espectrometría de masas. Esta técnica no es empleada para separar ya que sus métodos de detección son destructivos, por lo que no podemos recuperar la muestra en estudio. (Kuklinski, 2003; Skoog *et al*, 2008).

1.3.3. Métodos analíticos para la identificación de compuestos orgánicos

Existen diversas técnicas que permiten identificar y elucidar las estructuras de los compuestos responsables de la actividad biológica de las plantas en estudio.

Espectroscopia de absorción en el infrarrojo

Cualquier molécula tiene distintos enlaces, estos poseen una fuerza vibracional única la cual es una característica peculiar o propia de cada molécula. Según la intensidad de la energía de vibración que contengan, esta puede caer en la región de los 8 a los 15.4 μm , a la cual se le denomina zona de la huella dactilar de las moléculas, ya que en esta región aparecen las vibraciones de los enlaces simples y las vibraciones de

moléculas más complejas. Además de esta región existen otras zonas, cuyo estudio previo nos dice que podemos localizar dentro de ellas, enlaces en particular e identificar la presencia de grupos funcionales dentro de la molécula.

Según el tipo de espectro que arroje el equipo, se pueden llegar a hacer comparaciones con otros ya conocidos para poder identificar que compuesto está presente en la muestra, o si no, al menos nos puede dar una idea del tipo de enlaces y grupos funcionales que lo conforman (Skoog *et al*, 2008).

Espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN)

En esta técnica están implicados los núcleos de los átomos, y para ello es necesario colocar nuestra muestra en un campo magnético de gran intensidad, con el fin de que aparezcan los estados de energía de los núcleos que hagan posible la absorción. Esto se ve reflejado en señales características que se da por un desplazamiento químico. De la magnitud de este desplazamiento se pueden deducir grupos funcionales; de la medida del área bajo la banda se puede conocer el número de protones presentes en cada grupo y mediante la multiplicidad de las bandas se puede observar si hay grupos funcionales relacionados entre sí.

A pesar de que este es uno de los mejores métodos, es necesario emplear en conjunto otras técnicas espectroscópicas con el fin de elucidar estructuras de carácter orgánico e inorgánico. (Vall & Castillo, 2003; Skoog *et al*, 2008).

Espectrometría de masas

Esta técnica está fundamentada en la separación de las partículas por su diferencia de relación masas carga, la cual se lleva a cabo en 4 etapas: la primera es la ionización de la muestra, la cual se da mediante un bombardeo con electrones, seguido de una aceleración de los iones por un campo eléctrico, lo que ocasiona que estos se dispersen según su relación masa-carga y por último se da la detección de los iones en forma de señales.

Siempre que una molécula se rompe se obtiene un número de fragmentos, los cuales son característicos y forman un patrón propio de cada molécula. Si una muestra es

desconocida, podrá ser identificada por la similitud correspondiente a una fragmentación de un patrón conocido guardado en una base de datos, por el contrario, si se tienen una estructura completamente desconocida, únicamente podrán identificarse algunos componentes por comparación con patrones.

La combinación con otro tipo de técnicas como la cromatografía resulta un excelente método no solo de separación, sino también de detección e identificación, de manera rápida y eficaz, el cual es de gran apoyo para la elucidación de los compuestos de origen natural. (Vall & Castillo, 2003; Skoog *et al*, 2008).

1.4. Evaluación *in vivo* e *in vitro* de la actividad antiinflamatoria

Modelos de evaluación *in vivo*

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos, fracciones y compuestos obtenidos de fuentes naturales, existen modelos que nos permiten hacer la determinación de tal efecto, existen modelos tanto para evaluar la actividad crónica como aguda.

Para el estudio de agentes antiinflamatorios provenientes de fuentes naturales, es necesario hacer uso de agentes irritantes que permitan conocer el posible mecanismo de acción del compuesto obtenido, como por ejemplo los esteroides de forbol cuyo mecanismo ya es conocido y que nos permite hacer la comparación de nuestro metabolito contra compuestos de carácter esteroideo y no esteroideo (Kawabata *et al*, 2011; Ríos *et al*, 2004).

Dentro de las metodologías más utilizadas tanto por su facilidad como por su reproducibilidad se encuentran:

Edema plantar inducido por carragenina

Es uno de los métodos de mayor utilidad para la evaluación de compuestos con actividad antiinflamatoria. Consiste en la administración subcutánea de una solución de carragenina en el cojinete de la pata trasera de la rata o del ratón. El compuesto a evaluar se administra comúnmente de forma oral o intraperitoneal. Antes de la

administración de la solución de carragenina es necesario hacer una medición basal de la pata del animal para tener un parámetro inicial, después de la inyección y administración del tratamiento es necesario ir midiendo cada hora la evolución del edema inducido y así determinar el tiempo en el que se observa el efecto antiinflamatorio. Para hacer estas determinaciones es necesario el empleo de equipos como pletismometro y micrómetro laser.

La respuesta que desencadena la inyección de carragenina es de tipo bifásica. En la primera fase se da la liberación de los mediadores inmediatos del proceso inflamatorio los cuales son: histamina y serotonina, mientras que en la segunda se da la liberación de prostaglandinas, citocinas, EROs, leucotrienos, también ocurre la estimulación de la fosfolipasa A2. A la tercera hora de la inyección de carragenina se observa la consolidación del edema, así como la aparición del efecto de las sustancias en evaluación. (Chakraborty *et al.*, 2004).

Edema auricular inducido por aceite de crotón

Se lleva a cabo mediante la administración tópica de 50 µg/oreja de aceite de crotón, cuya composición presenta ésteres y otros componentes, los cuales al ser administrados por esta vía provocan irritación en la zona. Este método se emplea para la estimulación de inflamación local en las orejas de los animales, inflamación que nos ayuda para la evaluación no solo de antiinflamatorios no esteroideos sino también de los compuestos y/o fracciones obtenidos de las plantas. Después de la duración del modelo es necesario obtener secciones de las orejas, las cuales por diferencia de pesos entre la oreja tratada y la no tratada, nos permitirán conocer si hay efecto antiinflamatorio. (Hetter, 2000).

Edema auricular inducido por 13-Acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA)

Esta técnica, fue descrita por De Young en el año 1989. El TPA es uno de los componentes del aceite de crotón y es el más potente de todos, este posee propiedades irritantes e inflamatorias.

La inducción del edema se lleva a cabo por la aplicación tópica del TPA, media hora después la administración por la misma vía del compuesto a evaluar. Y al igual que el experimento descrito anteriormente es necesario obtener secciones de la oreja para que por diferencia de peso poder determinar el efecto.

La aplicación del TPA desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación, extravasación, ruboración y edema. A nivel histológico, se produce la etapa vascular y la etapa celular. A nivel bioquímico, se eleva la síntesis del ácidos nucleicos, los cuales activan los genes de expresión de los mediadores de la inflamación, como son IL-6, IL-10 y TNF- α (Schadow *et al*, 2001).

La aplicación de 1 μ L de TPA en la oreja del ratón induce en las primeras 2 horas vasodilatación, eritema, edema y agregación plaquetaria, de la hora 3 a la 4, la oreja se engruesa por acción del exudado. Entre la hora 4 y la 6 aumenta la agregación y adhesión de los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos y eosinófilos principalmente) a las paredes de los vasos, el edema alcanza su máximo y se incrementa también la actividad de las células cebadas (degranulación) así como la acumulación de leucocitos en la zona dañada. (Young & De Young, 1989); (Gábor, 2003).

Modelos de evaluación *in vitro*

Las células como los leucocitos polimorfonucleares y los macrófagos, son capaces de responder a una variedad de estímulos. Los macrófagos tienen un papel en la modulación de la iniciación de la respuesta inflamatoria, un medio por el cual los macrófagos llevan a cabo este proceso es por su capacidad para sintetizar mediadores como prostaglandinas. (Forman & Torres, 2001); (Yang & Marshall, 2009)

La citotoxicidad es atribuida de forma directa al óxido nítrico. Bajo condiciones fisiológicas, las células producen sólo pequeñas cantidades de NO, por las isoformas constitutivas de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), neuronal (nNOS) y endotelial (eNOS). Mientras que grandes cantidades de NO son generadas por la isoforma

inducible (iNOS) en diversos eventos que involucren inflamación, acompañados de la producción de EROs (Forman & Torres, 2001; Yang & Marshall, 2009).

El lipopolisacárido (LPS) es un compuesto presente en la pared celular de bacterias gram negativas y se utiliza para estimular macrófagos para que estos liberen mediadores inflamatorios, siendo este un potente agente agresor que induce inflamación aguda en muchas especies animales.

Por esta razón, el modelo de estimulación *in vitro* de líneas celulares de macrófagos por LPS, nos permite determinar la inhibición de la producción tanto de NO como de citocinas por compuestos aislados de fuentes naturales, permitiéndonos proporcionar una estimación del efecto antiinflamatorio de los mismos (Wang *et al*, 2003; Thornton *et al*, 2006; Forman & Torres, 2001; Yang & Marshall, 2009).

Conjuntamente con la determinación de nitritos debe ser ensayada la funcionalidad por el método colorimétrico del MTT. La sal de tetrazolio, MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio bromuro), es una sal de color amarillo soluble en agua, el cual es captado por enzimas deshidrogenadas presentes en mitocondrias activas produciendo cristales de formazán insolubles en medio acuoso. (Wang *et al*, 2003; Thornton *et al*, 2006).

2. Justificación

Las enfermedades crónicas degenerativas relacionadas con un proceso inflamatorio conllevan un gran impacto social, económico y en la calidad de vida de quienes las padecen. Según la Organización Mundial de la Salud son la causa más frecuente de incapacidad de origen no mental en el mundo. La búsqueda de tratamientos alternativos eficientes, económicos y más accesibles para la población justifica la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios. En este sentido, las plantas medicinales son fuente potencial para el descubrimiento de compuestos y su estudio permitirá también validar con métodos científicos su uso en la medicina tradicional mexicana.

3. Pregunta de Investigación

¿Cuál será el efecto antiinflamatorio de los extractos y/o fracciones de *Senna crotalarioides* en un modelo de inflamación?

4. Hipótesis

Si los extractos orgánicos de *Senna crotalarioides* tienen efecto antiinflamatorio, entonces contendrán compuestos con actividad antiinflamatoria capaces de reducir los niveles de mediadores inflamatorios (TNF- α e IL-6) en modelos de inflamación.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Aislar y caracterizar al menos un compuesto con actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico de *Senna crotalarioides*.

5.2. Objetivos específicos

- Determinar el efecto antiinflamatorio del extracto clorofórmico de *Senna crotalarioides* en un modelo de inflamación aguda.
- Fraccionar el extracto clorofórmico de *Senna crotalarioides*.

- Determinar la participación de mediadores inflamatorios en la acción antiinflamatoria de *Senna crotalarioides*.
- Evaluar la expresión de citocinas inflamatorias en macrófagos tratados con extractos y/o fracciones de *Senna crotalarioides*.

6. Materiales Y Métodos

6.1. Material biológico

La recolección de la planta se realizó en el mes de agosto de 2014. *Senna crotalarioides* se colectó en el municipio de Las Comadres, Municipio de Guadalcázar, Estado de San Luis Potosí, México. La planta se dejó secar a la sombra a temperatura ambiente y se trituró para su uso. Un espécimen se depositó en el Herbario Isidro Favela de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí con número SLPM042360.

6.2. Preparación del extracto

En un matraz balón de 5 L con un refrigerante en posición de reflujo se colocaron 300 g de la planta seca y molida con 3500 mL de cloroformo, la mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 4 h, transcurrido el tiempo se dejó enfriar y se filtró.

El disolvente se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio y el residuo se secó en una estufa de vacío. (Pérez *et al*, 2012)

6.3. Lavado con Hexano

Con la finalidad de eliminar ceras o ácidos grasos presentes en el extracto se realizó un lavado con hexano, para lo cual 5 g de extracto se colocaron en un vaso de precipitados y se adicionaron 100 ml de hexano, la mezcla se calentó a temperatura de ebullición en baño María por 5 minutos, después de este tiempo se filtró y se recuperó el residuo, se eliminó el disolvente y se evaluó la actividad antiinflamatoria de las partes obtenidas (residuo y lavado).

6.4. Aislamiento e identificación del compuesto responsable de la actividad

La separación del o los compuestos responsables de la actividad antiinflamatoria se realizó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice, se usó hexano como fase móvil al cual se le fue aumentando la polaridad gradualmente con acetato de etilo. Después se determinó la fracción activa en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA.

Posteriormente la fracción con actividad se separó por cromatografía en columna fase reversa C18, empleando como fase móvil una mezcla agua-ácido acético 5% (v/v), acetonitrilo y metanol en una proporción 5:25:70, la cual fue modificada reduciendo los primeros dos disolventes y aumentando el tercero hasta llegar a 100 % de metanol, con esta polaridad se aisló un sólido con actividad antiinflamatoria, el cual se analizó por cromatografía líquida de alta resolución, se utilizó un cromatógrafo Varian Modelo Pro Star, acoplado con un detector de masas Alltech, con una columna C18 Grace Smart RP (5 μ m, 4.6 x 250 mm). La temperatura de la columna se mantuvo a 40° C. Se usó una solución de ácido acético agua 0.5% (v/v), metanol y acetonitrilo, a tiempo 0 la concentración el sistema consistió en 5:85:10 (v/v) y al tiempo 20 min la composición fue 7:80:13 (v/v) con un flujo de 0.7 ml/min, el volumen de inyección fue de 20 μ l.

Identificación del compuesto responsable por cromatografía de gases acoplado a masas

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (Agilent Technology, modelo 6890N); con un detector selectivo de masas (modelo 5973) con una columna capilar DB-5HT (15 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno, y 0.10 micras de espesor de película). Se utilizó un gradiente de temperatura a partir de 100 °C durante 3 min con una velocidad de calentamiento de 10 °C por minuto hasta 320 °C; esta temperatura se mantuvo durante 5 min. La inyección sin división se realizó en una proporción de 1:100, y la temperatura del

inyector fue de 320 °C. Los espectros se determinaron a 70 eV, y el rango de masa analizado fue de 33 a 800 m/z. Los compuestos fueron identificados a partir de los espectros de masas y mediante la comparación de los espectros con los espectros reportados en la base de datos NIST (Wiley09/NIST11).

6.5. Evaluación de actividad antiinflamatoria

Animales

Se usaron ratones machos cepa CD-1 con un peso de 25-30 g proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Los animales se mantuvieron a una temperatura de 20-22 °C y humedad relativa entre 50-55 %.

El agua y el alimento se suministraron *ad libitum* cumpliendo con los ciclos de luz/oscuridad de 12 h (Pérez *et al*, 2012).

Inflamación aguda: modelo de edema auricular inducido por 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA). (Pérez *et al*, 2013).

Se utilizaron grupos de 8 animales cada uno. La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 2.5 µl de TPA en 25 µl de acetona. Media hora después de la aplicación de TPA, se administraron los tratamientos en una dosis de 2 mg/oreja. Se utilizó indometacina como fármaco de referencia. Después de 6 h de la administración de TPA, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se cortaron discos de 8 mm de diámetro de la oreja derecha y de la izquierda, ambos círculos se pesaron. La diferencia de peso entre las orejas se tomó como expresión del edema y se calculó el porcentaje de inhibición del edema en los animales tratados con respecto al grupo control.

El porcentaje de inhibición se determinó con la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{(P_t - P_{nt})_{control} - (P_t - P_{nt})_{tratamiento}}{(P_t - P_{nt})_{control}} \right) 100$$

Donde Pt es el peso de la sección de la oreja tratada y Pnt es el peso de la sección no tratada (Pérez *et al*, 2013).

6.6. Evaluación de mediadores inflamatorios

Línea celular

La línea celular de macrófagos J774A.1 fue obtenida de la “American Type Culture Collection” (ATCC). Las cuales se cultivaron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 7% de suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina), y se incubaron a 37 °C y 5% CO₂.

Evaluación de la actividad citotóxica vía ensayo de viabilidad

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltriazol (MTT) en un compuesto de color azul (formazán), permitiendo determinar la funcionalidad de las células tratadas. Este método fue desarrollado por Mosmann en 1983. Los macrófagos J774A.1 fueron sembrados a una densidad de 80,000 células por pozo en una placa de 96 pozos y fue tratada con varias concentraciones de la fracción activa (25, 50, 100 y 200 µg/ml) por 24 h. Las células sin tratamiento fueron tomadas como el control. Al final del experimento se adicionaron 10 µl de una solución de MTT (0.5 mg/ml) y la placa se incubó a 37°C por 4 horas. Posteriormente se removió el MTT y se adicionaron 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) para disolver los cristales de formazán. La microplaca se leyó en un lector de ELISA a 595 nm. El experimento se realizó por triplicado para poder hacer la determinación de las concentraciones.

Análisis de la transcripción génica

Para observar el efecto que tiene la fracción activa obtenida de *S. crotalarioides* sobre la expresión génica de citocinas inflamatorias de las células tratadas con LPS, las células J774A.1 fueron sembradas en placas de 6 pozos a una densidad de 2000000 células/pozo, se estimularon con LPS a una concentración de 5 µg/ml durante 24 horas y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Después de las 24 horas se

colocaron los tratamientos: la fracción activa a una concentración de 25 µg/ml e indometacina a una concentración de 25 µM, se dejaron incubar por 24 horas más a 37 °C y 5% de CO₂. Después, se llevó a cabo la extracción de RNA total de las células por medio de la técnica de Fenol-Cloroformo. La obtención de cDNA se realizó por medio de transcripción reversa a partir de 2 µg de RNA total. Posteriormente, la expresión génica se determinó por medio de la reacción en cadena de la polimerasa, utilizando oligonucleótidos específicos.

Determinación de los niveles de IL-6 y TNF-α

Las células tratadas con LPS, sembradas en placas de 6 pozos se incubaron durante 18 horas a 37°C y 5% de CO₂. Transcurrido este lapso de tiempo, se trataron por separado con la fracción obtenida de la planta a una concentración de 25 µg/ml y se utilizó una concentración de 50 µM de indometacina, se incubaron por 24 horas más a 37 °C y 5 % de CO₂. Pasadas las 24 horas, los sobrenadantes libres de células se recogieron y se almacenaron a 20 °C hasta que se realizó el inmunoensayo para cuantificar citocinas. Las concentraciones de IL-6 y TNF-α en los sobrenadantes de cultivo de células J774A.1 se determinaron utilizando un kit de ensayo inmunoenzimático BioLegend®.

6.7. Análisis estadístico

Los resultados de la evaluación del efecto antiinflamatorio, transcripción génica y los niveles de citocinas fueron sometidos a un análisis de varianza con un criterio de clasificación (ANOVA), seguido de una comparación con la prueba de Dunnett empleando el programa estadístico NCSS 2004.

7. Resultados

Se evaluó la actividad de los extractos clorofórmico y metanólico de *S. crotalarioides* en el modelo de edema auricular inducido por TPA. Los resultados que se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico y metanólico de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Formación de edema (mg)	Porcentaje de Inhibición
Vehículo	0	19.22 ± 0.92	0
Indometacina	2	5.98 ± 0.65 *	67.62 ± 4.88
Extracto CHCl ₃	2	6.91 ± 0.76 *	64.29 ± 3.29
Extracto MeOH	2	11.31 ± 0.91	30.55 ± 5.48

Los resultados se expresan como formación de edema y porcentaje de inhibición, son el promedio de 8 determinaciones ± error estándar. Se usó la prueba de Dunnett; *p<0.05 para la comparación entre grupos.

El extracto clorofórmico después de eliminar el disolvente se lavó con hexano y se evaluó la actividad de ambas partes, los resultados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividad antiinflamatoria del lavado con hexano y el residuo del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Formación de edema (mg)	Porcentaje de Inhibición
Vehículo	0	7.57 ± 1.1	0
Indometacina	2	1.38 ± 0.28 *	80.44 ± 4.79
Lavado	2	2.48 ± 0.37 *	61.45 ± 8.95
Residuo	2	5.28 ± 0.41	21.92 ± 10.73

Los resultados se expresan como formación de edema y porcentaje de inhibición, son el promedio de 8 determinaciones ± error estándar. Se usó la prueba de Dunnett; *p<0.05 para la comparación entre grupos.

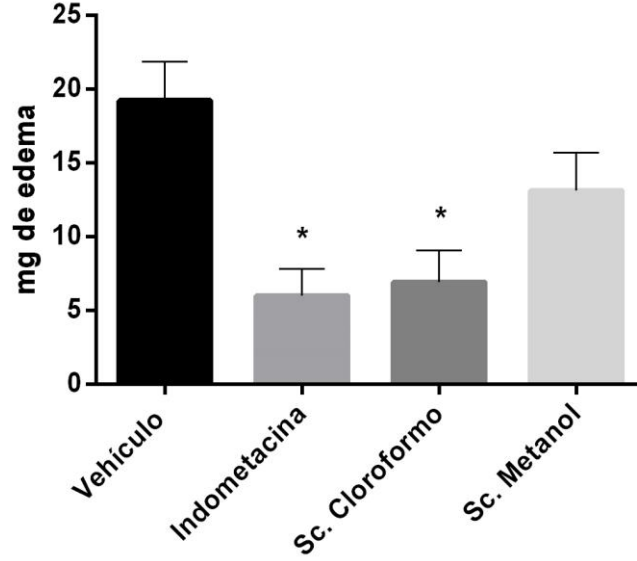


Figura 1. Evaluación del extracto cloroformico y metanólico de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett \pm error estándar; * $p < 0.05$ con respecto al vehículo, $n=8$.

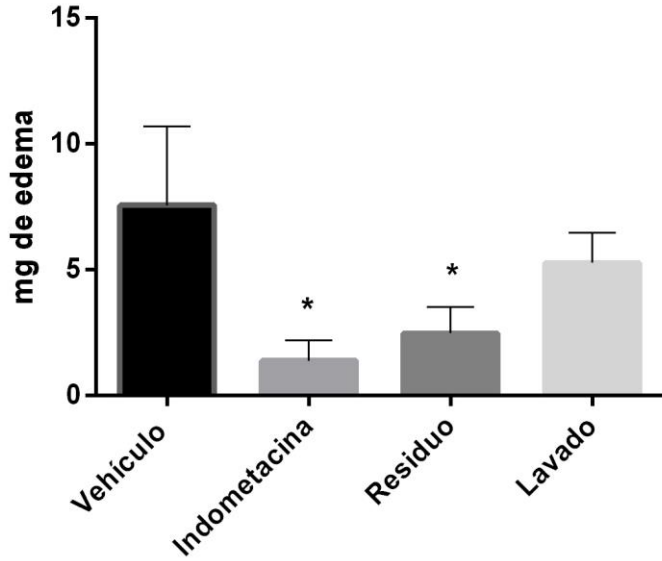


Figura 2. Evaluación del lavado con hexano y el residuo del extracto cloroformico de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett \pm error estándar; * $p < 0.05$ con respecto al vehículo, $n=8$.

El residuo se separó por cromatografía en columna usando silica gel como fase estacionaria y hexano como fase móvil a la cual se le fue aumentando la polaridad gradualmente con acetato de etilo. Se obtuvieron un total de 30 fracciones, las cuales fueron comparadas por cromatografía en capa fina quedando un total de 8 fracciones. Se evaluó la actividad de las fracciones en el modelo de edema auricular inducido con TPA, obteniendo los resultados que se muestran en las tablas 3, 4 y 5.

Tabla 3. Actividad antiinflamatoria de las fracciones 1 y 2 obtenidas de la separación del residuo de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Formación de Edema (mg)	Porcentaje de Inhibición
Vehículo	0	7.55 ± 0.65	0
Indometacina	2	2.66 ± 0.11 *	62.12 ± 4.56
Fracción 1	2	8.82 ± 0.17	NA
Fracción 2	2	7.98 ± 0.26	NA

Los resultados se expresan como formación de edema y porcentaje de inhibición, son el promedio de 8 determinaciones ± error estándar. Se usó la prueba de Dunnett; *p<0.05 para la comparación entre grupos.

Tabla 4. Actividad antiinflamatoria de las fracciones 3 a 6 obtenidas de la separación del residuo de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Formación de Edema (mg)	Porcentaje de Inhibición
Vehículo	0	6.787 ± 0.331	0
Indometacina	2	2.45 ± 0.139 *	63.82 ± 1.39
Fracción 3	2	6.862 ± 0.38	1.19 ± 3.17
Fracción 4	2	5.35 ± 0.31	21.28 ± 2.86
Fracción 5	2	4.075 ± 0.025	38.8 ± 3.38
Fracción 6	2	2.6 ± 0.15 *	62.32 ± 2.93

Los resultados se expresan como formación de edema y porcentaje de inhibición, son el promedio de 8 determinaciones ± error estándar. Se usó la prueba de Dunnett; *p<0.05 para la comparación entre grupos.

Tabla 5. Actividad antiinflamatoria de las fracciones 7 y 8 obtenidas de la separación del residuo de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Formación de Edema (mg)	Porcentaje de Inhibición
Vehículo	0	13.92 ± 1.43	0
Indometacina	2	2.75 ± 0.847 *	77.24 ± 8.64
Fracción 7	2	4.1 ± 0.215 *	68.67 ± 3.04
Fracción 8	2	3.887 ± 0.367 *	68.08 ± 5.87

Los resultados se expresan como formación de edema y porcentaje de inhibición, son el promedio de 8 determinaciones ± error estándar. Se usó la prueba de Dunnett; *p<0.05 para la comparación entre grupos.

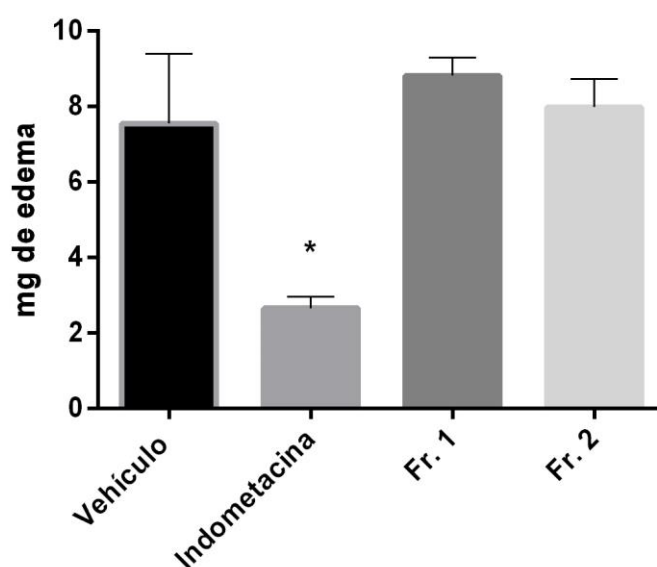


Figura 3. Evaluación de las fracciones 1 y 2 obtenidas de la separación del residuo de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett ± error estándar; * p<0.05 con respecto al vehículo, n=8.

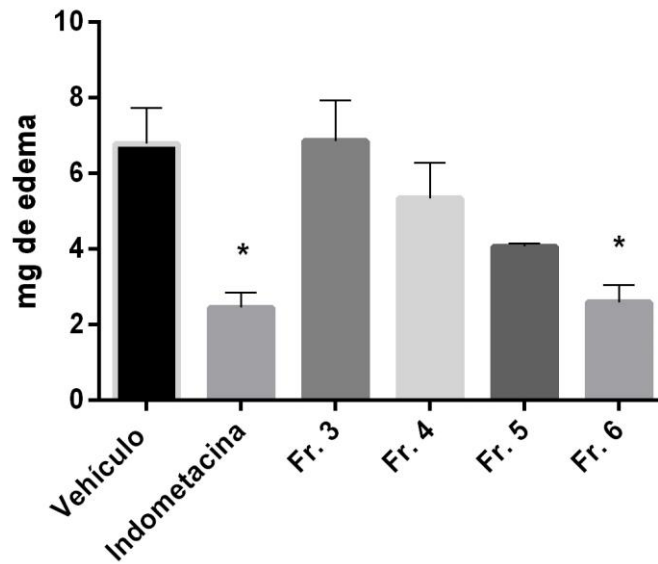


Figura 4. Evaluación de las fracciones 3 - 6 obtenidas de la separación del residuo de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett \pm error estándar; * $p < 0.05$ con respecto al vehículo, $n=8$.

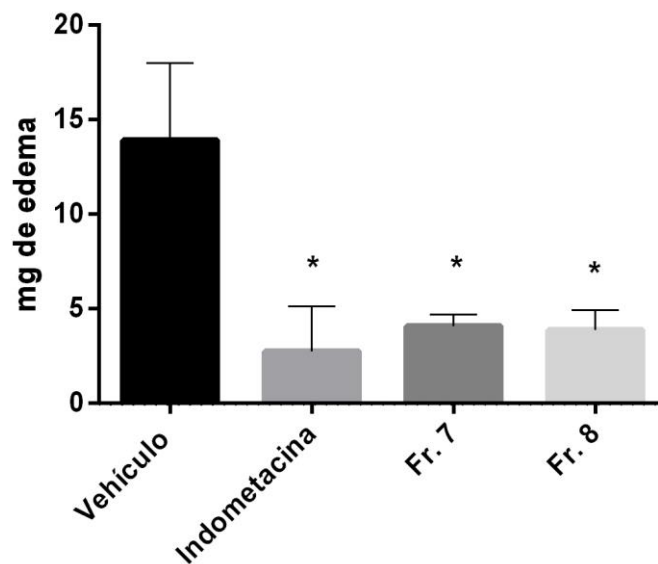


Figura 5. Evaluación de las fracciones 7 y 8 obtenidas de la separación del residuo de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido con TPA. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett \pm error estándar; * $p < 0.05$ con respecto al vehículo, $n=8$.

La fracción número 8 una de las que presentó mayor actividad fue sometida a un tratamiento con carbón activado y se evaluó su actividad en el modelo de edema auricular inducido con TPA, los resultados se muestran en la Tabla 4.

Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de la fracción 8 después del tratamiento con carbón activado en el edema auricular en ratón inducido con TPA.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Formación de edema (mg)	Porcentaje de Inhibición
Vehículo	0	15.25 ± 1.02	0
Indometacina	2	5.41 ± 0.36 *	62.14 ± 5.59
Tratamiento Carbón Activado	2	8.66 ± 1.002 *	42.55 ± 5.82

Los resultados se expresan como formación de edema y porcentaje de inhibición, son el promedio de 8 determinaciones ± error estándar. Se usó la prueba de Dunnett; *p<0.05 para la comparación entre grupos.

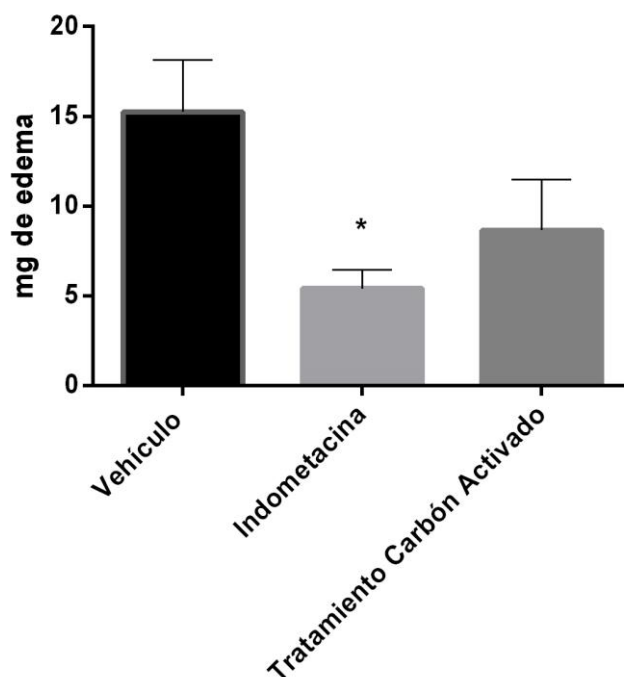


Figura 6. Evaluación de la fracción 8 después del tratamiento con carbón activado en el edema auricular en ratón inducido con TPA. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett ± error estándar; * p<0.05 con respecto al vehículo, n=8.

El efecto citotóxico de la fracción 8 sobre las células J774A.1 se determinó mediante el ensayo de MTT, usando diferentes concentraciones de dicha fracción (25, 50, 100 y 200 $\mu\text{g}/100 \mu\text{L}$). Los datos se expresaron como porcentaje de funcionalidad celular en comparación con el control.

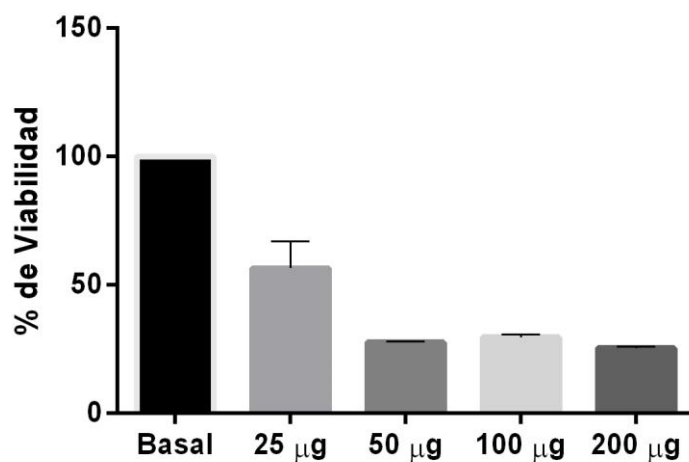


Figura 7. Prueba de viabilidad celular de la fracción 8 en la línea celular J774A.1. Los valor se expresa como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto grupo basal, $n=3$.

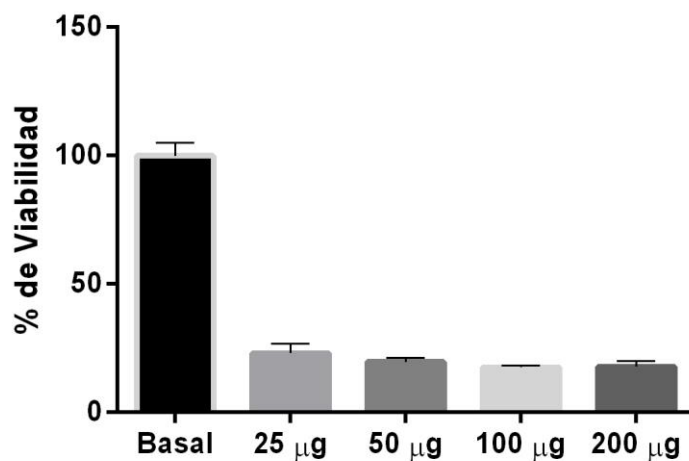
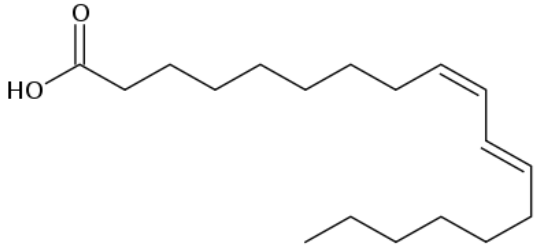
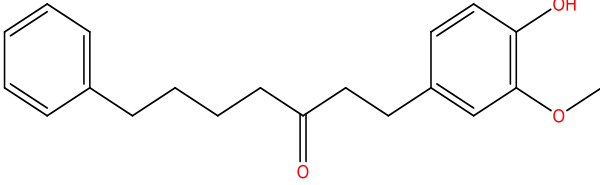
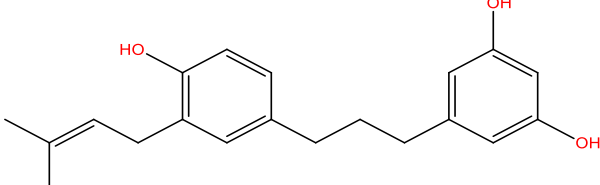
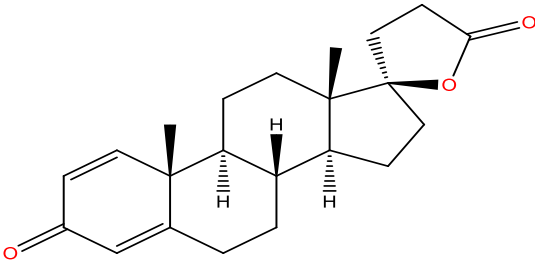


Figura 8. Prueba de viabilidad celular de la fracción 8 en la línea celular J774A.1 después del tratamiento con carbón activado. Los valor se expresa como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto grupo basal, $n=3$.

A la fracción 8 se le realizó un análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de masas para la identificación de los compuestos mayoritarios (Tabla 7).

Tabla 7. Estructuras identificadas presentes en la fracción 8, obtenidas en el análisis por cromatografía líquida acoplada a masas.

Nombre	Estructura
Ácido Linoleico	
	
	
	<p style="text-align: right;">Chiral</p> 

La fracción número 8 se sometió a una separación en un cartucho comercial C18 obteniendo un total de 30 fracciones las cuales fueron sometidas a cromatografía en capa fina para agruparlas de acuerdo a la similitud que presentaron, quedando únicamente 5 fracciones.

Se evaluó la actividad antiinflamatoria de las subfracciones obtenidas de la separación por cromatografía de la fracción 8 del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* en el modelo de edema auricular, los resultados se muestran en la Tabla 8.

Se evaluó el efecto citotóxico de las subfracciones obtenidas de la separación de la fracción 8 sobre la viabilidad celular en la línea de macrófagos J774A.1, se determinó mediante un ensayo colorimétrico. Los datos se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en comparación con el control, los resultados se muestran en las Figuras 10-14.

Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas de la separación de la fracción 8 (Metanol) en el edema auricular en ratón inducido con TPA.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	Formación de Edema (mg)	Porcentaje de Inhibición
Vehículo	0	7.6 ± 0. 21	0
Indometacina	2	3.27 ±0. 35 *	56.65 ± 4.75
Fracción 8.1	2	7.0 ± 0.15	7.54 ± 3.85
Fracción 8.2	2	6.1 ± 0.16	19.71 ± 2.55
Fracción 8.3	2	5.25 ± 0.52	30.72 ± 6.83
Fracción 8.4	2	5.28 ± 0.39	30.6 ± 4.93
Fracción 8.5	2	3.75 ± 0.2 *	50.91 ± 1.99

Los resultados se expresan como formación de edema y porcentaje de inhibición, son el promedio de 8 determinaciones ± error estándar. Se usó la prueba de Dunnett; *p<0.05 para la comparación entre grupos.

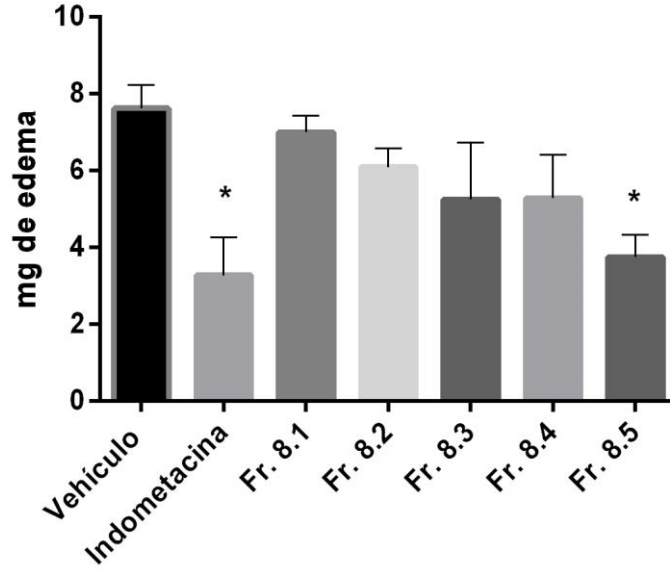


Figura 9. Evaluación de las subfracciones obtenidas de la separación de la fracción 8 del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett \pm error estándar; * $p < 0.05$ con respecto al vehículo, $n = 8$.

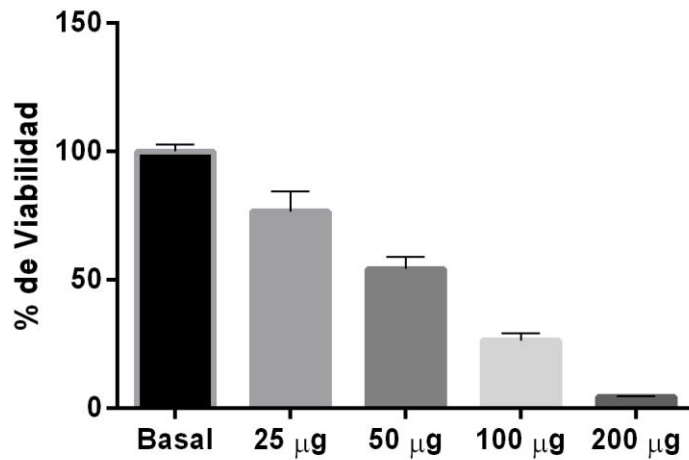


Figura 10. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.1 en la línea celular J774A.1. Los valores se expresan como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto al grupo basal, $n = 3$.

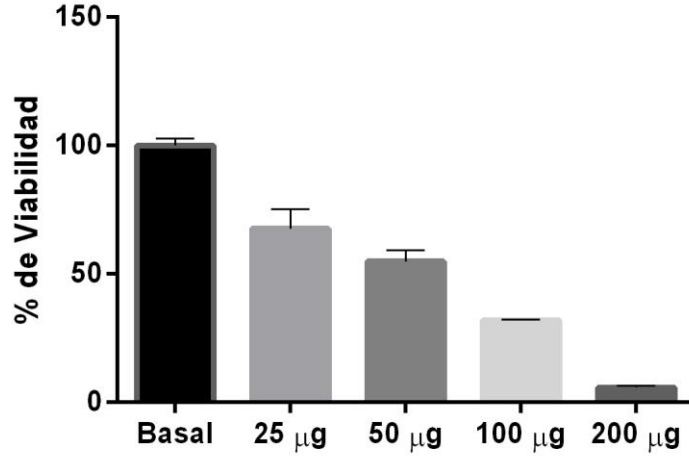


Figura 11. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.2 en la línea celular J774A.1. Los valores se expresan como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto al grupo basal, $n=3$.

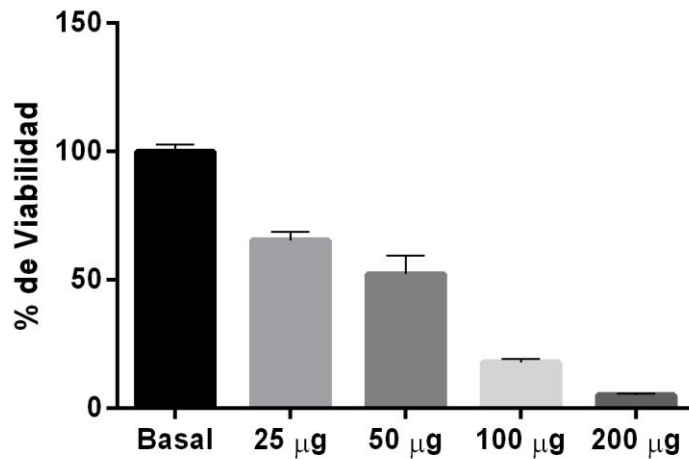


Figura 12. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.3 en la línea celular J774A.1. Los valores se expresan como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto al grupo basal, $n=3$.

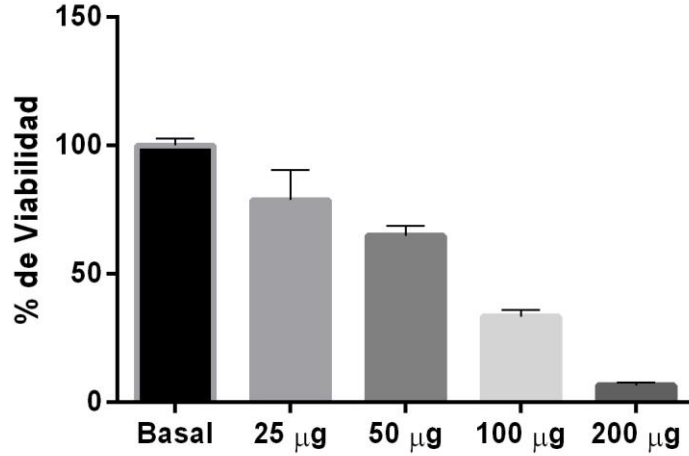


Figura 13. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.4 en la línea celular J774A.1. Los valores se expresan como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto al grupo basal, $n = 3$.

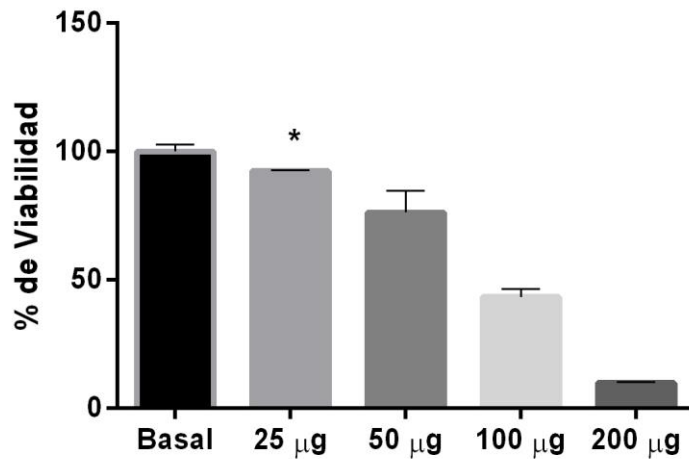


Figura 14. Prueba de viabilidad celular de la subfracción 8.5 en la línea celular J774A.1. Los valores se expresan como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto al grupo basal, $n = 3$.

La expresión de los mediadores que participan en la respuesta inflamatoria se determinó en el cultivo de la línea de macrófagos J774A.1 tratados con LPS por análisis de Q-PCR. Usando como tratamiento la subfracción 8.5.

En la Figura 15 se observa que el grupo tratado con indometacina presenta un aumento en la expresión génica de IL-6 con respecto al control que es el grupo estimulado con LPS mientras que el grupo tratado con *S. crotalarioides* no presenta un aumento significativo en los niveles de IL-6. La Figura 16 muestra una disminución en los niveles de TNF- α tanto en el grupo de células tratadas con indometacina como el grupo tratado con *S. crotalarioides* con respecto al grupo tratado con LPS.

La cuantificación de los mediadores se determinó en el sobrenadante de los cultivos de macrófagos tratados con LPS por ensayo de ELISA. Usando como tratamiento la subfracción 8.5.

Tanto en la Figura 17 y 18 se observa una disminución de los niveles de IL-6 y TNF- α en los grupos tratados con *S. crotalarioides* y el grupo tratado con indometacina, esto debido a que la línea celular de macrófagos estimulados con LPS dejó de liberar las citocinas al medio donde se encontraba.

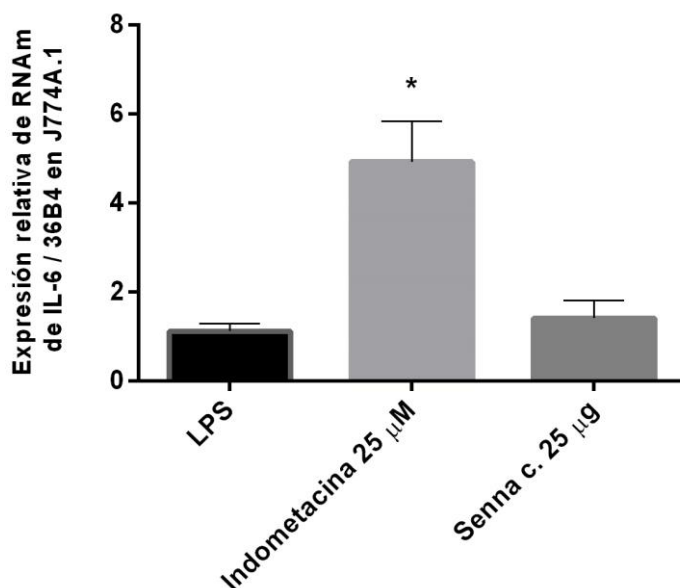


Figura 15. Efecto de *S. crotalarioides* sobre la expresión génica de IL-6 en células J774A.1 estimuladas con LPS. Los valores se expresan como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto al grupo tratado con LPS, $n = 6$.

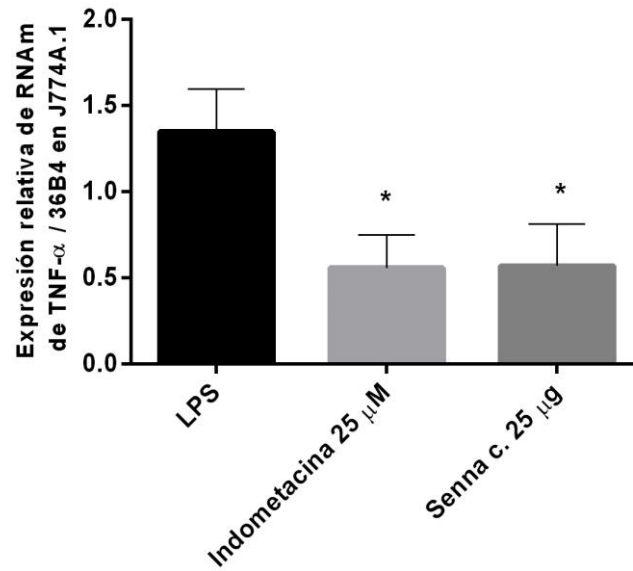


Figura 16. Efecto de *S. crotalarioides* sobre la expresión génica de TNF- α en células J774A.1 estimuladas con LPS. Los valor se expresa como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto grupo tratado con LPS, $n = 6$.

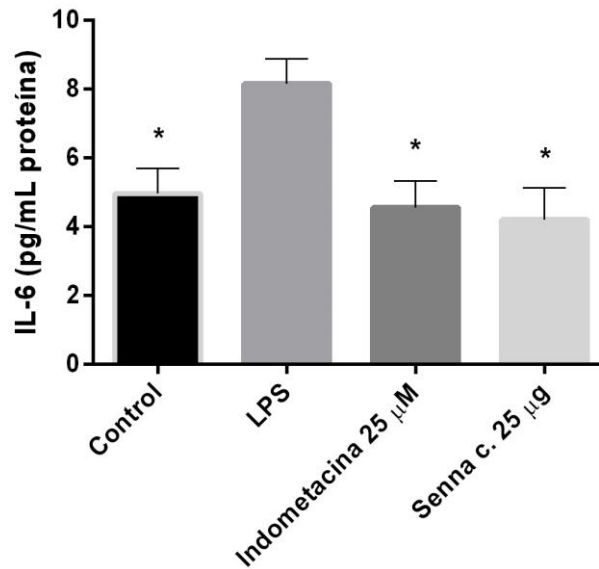


Figura 17. Efecto de *S. crotalarioides* sobre la liberación al medio de IL-6 en células J774A.1 estimuladas con LPS. Los valor se expresa como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto grupo tratado con LPS, $n = 6$.

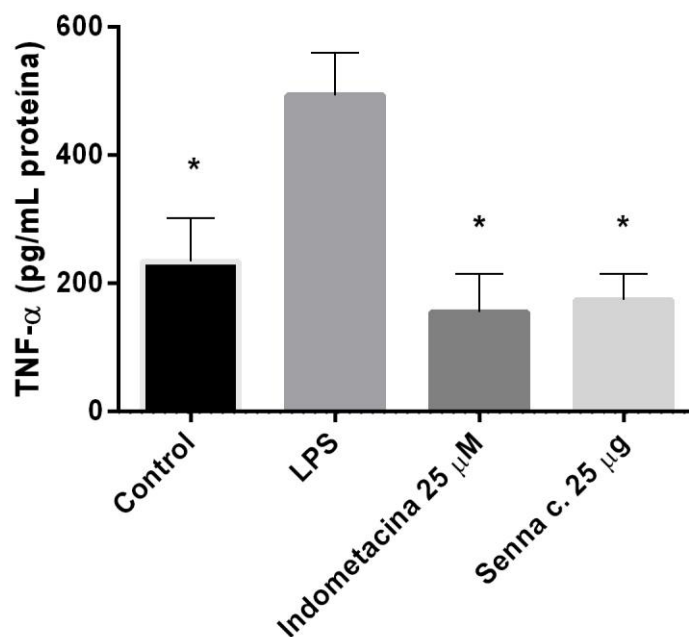


Figura 18. Efecto de *S. crotalarioides* sobre la liberación al medio de TNF- α en células J774A.1 estimuladas con LPS. Los valores se expresan como media \pm error estándar, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Dunnett; * $p < 0.05$ con respecto al grupo tratado con LPS, $n = 6$.

A la subfracción 8.5 se le realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a un detector selectivo de masas para la identificación de los compuestos presentes, mediante la comparación con los espectros reportados en la base de datos (Tabla 9).

Tabla 9. Lista de los compuestos identificados presentes en la subfracción 8.5, obtenidas en el análisis por cromatografía de gases acoplada a masas.

Compuesto	% Total
Glicerol	0.810
Ácido nonánico	0.203
Ácido decanoico	0.228
Ácido dodecanóico	0.166

Ácido subérico	0.145
Ácido azelaico	0.524
Ácido mirístico	0.450
1- Hexadecanol	0.318
Ácido palmítico	2.418
1-Octadecanol	0.236
Ácido oléico	0.288
Ácido esteárico	0.596
1-Octacosanol	1.133
Ácido oleanólico	0.590
Ácido ursólico	83.401

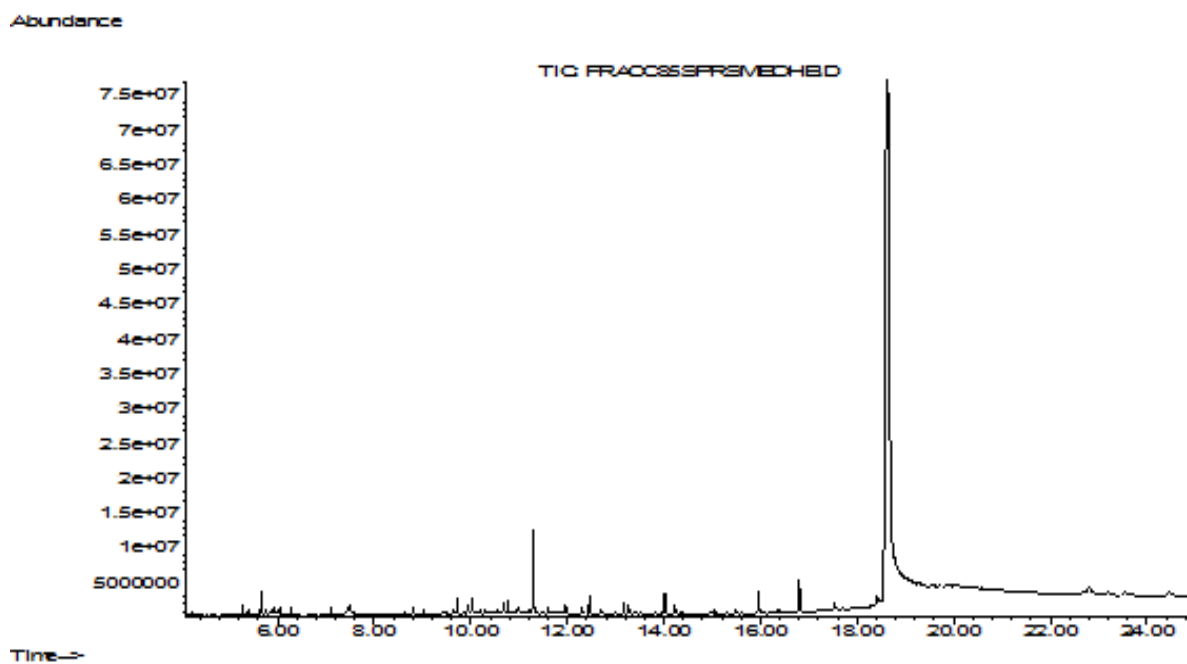


Figura 19. Cromatograma de la subfracción 8.5 obtenida de la separación de *S. crotarioides*.

8. Discusión

La mayoría de las enfermedades que presentan etapas inflamatorias, donde la inflamación así como la reparación pueden ser potencialmente perjudiciales ya que subyacen en la génesis de enfermedades crónicas que provocan morbilidad y/o mortalidad. Numerosos investigadores han buscado nuevos agentes antiinflamatorios derivados de la síntesis química o del metabolismo de organismos vivos. Los AINEs se encuentran entre los más utilizados, se sabe que existen decenas de estos medicamentos en el mercado y continuamente surgen nuevas preparaciones. El uso excesivo de estos puede causar efectos secundarios en el organismo. Por lo que, un tratamiento ideal sería aquel que disminuyera los signos de la inflamación, controlando sus secuelas perjudiciales (Pérez *et al*, 2012).

El estudio de las plantas medicinales tiene como objetivo contribuir al conocimiento químico, farmacológico y toxicológico de las especies vegetales, propiciar su uso como alternativa terapéutica, además, de conducir al descubrimiento de nuevos fármacos, candidatos para evitar o disminuir los síntomas de una variedad de enfermedades que amenazan la salud humana.

Para llevar a cabo la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos: clorofórmico y metanólico, y de las fracciones obtenidas del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* en el edema auricular en ratón inducido por TPA. Este método es ampliamente utilizado para evaluar sustancias antiinflamatorias; en el cual el proceso inflamatorio es desencadenado por la aplicación tópica del TPA, este método está basado en la activación de la proteína cinasa C dérmica y la fosfolipasa A2 así como la producción de prostaglandinas y leucotrienos, mediadores que podrían intervenir en el efecto antiinflamatorio (García *et al.*, 2004). Una gran cantidad de agentes antiinflamatorios muestran actividad en este modelo, pero principalmente los encargados de inhibir las enzimas ciclooxigenasa y lipoxigenasa aunque los inhibidores de la ciclooxigenasa parecen ser más efectivos que los inhibidores de la lipoxigenasa para reducir la respuesta edematosa (García *et al.*, 2004).

La indometacina es un AINE que actúa sobre la cascada del ácido araquidónico inhibiendo no selectivamente a la COX, lo cual suprime la formación de prostaglandinas y TXA2, también inhibe la marginación, adhesión y migración de leucocitos, por lo que se considera un potente agente antiinflamatorio con buena biodisponibilidad, motivo por el cual se empleó como fármaco de referencia (Pérez *et al.*, 2005)

Los resultados obtenidos indican que el extracto clorofórmico inhibe significativamente el edema auricular, con valores de 64.29 % similar al obtenido con indometacina (67.62 %). Las fracciones VI, VII y VIII del residuo del lavado con hexano del extracto clorofórmico de *S. crotalarioides* inhiben significativamente el edema, con valores de 62.32, 68.67 y 68.08 % respectivamente.

De acuerdo con los análisis realizados a la fracción activa se pudo identificar el compuesto que aparece en mayor porcentaje, el cual es ácido ursólico. La actividad antiinflamatoria mostrada puede deberse probablemente a que muchos triterpenos pueden modular la síntesis de prostaglandinas, funcionando como inhibidores enzimáticos. Unos pueden inhibir la enzima ciclooxigenasa como es el caso de los triterpenos pentacíclicos. En cuanto al mecanismo de acción antiinflamatorio del ácido ursólico se ha descrito que estos compuestos inhiben la liberación de histamina, inhiben a la 5 -lipooxigenasa, a la ciclooxigenasa 2 (Ismaili *et al.*, 2004).

Para descartar la posibilidad de que el compuesto en estudio sea perjudicial, es necesario realizar una serie de pruebas que nos permitan conocer la seguridad del metabolito en el organismo, una de ellas es la evaluación de la actividad citotóxica. Los resultados observados en esta prueba, permiten conocer la concentración a la cual el compuesto comienza a ser tóxico para las células.

En los datos obtenidos en la prueba de la funcionalidad celular se observa que únicamente la subfracción 8.5 nos muestra que en la concentración más baja las células continúan siendo metabólicamente activas.

El TNF- α e IL-6 son citosinas proinflamatorias importantes y, tal como el NO, está implicado en los procesos inmunes e inflamatorios fisiológicos normales. Sin embargo, cuando se expresa inapropiadamente, TNF- α también desempeña un papel en el desarrollo de la inflamación crónica y enfermedades asociadas (Szekanecz, 2008).

Se sabe que los trastornos inflamatorios se caracterizan entre otros eventos, por la producción de cantidades significativas de radicales libres y especies reactivas de nitrógeno, así como citocinas tales como TNF- α e IL-6. En particular, IL-6 es un componente importante en la iniciación de la respuesta inflamatoria. TNF- α es también una citocina proinflamatoria fundamental y es considerado como un mediador endógeno inducido por LPS.

Se ha demostrado el efecto antioxidante in vivo de la molécula de ácido ursólico, encontrando que presenta un efecto protector sobre la peroxidación de lípidos, estrés oxidativo y evita el daño al DNA inducido por radiación ultravioleta. También se ha demostrado que el ácido ursólico posee efecto antioxidante no enzimático, al secuestrar al anión superóxido, al quelar iones metálicos. Se ha demostrado el efecto antioxidante y antiinflamatorio del ácido ursólico sobre distintos tipos de líneas celulares al inducir estos efectos con peróxido de hidrógeno y con el ion 1-metil-4-fenilpiridinio; estos compuestos provocan la muerte celular por liberación de citosinas proinflamatorias como IL-6 y TNF- α y por disminución de la actividad de las enzimas superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa. El tratamiento de las células con ácido ursólico disminuye la liberación de IL-6 y TNF- α (Tsai *et al*, 2008).

El efecto de *S. crotalariaoides* en la producción de citocinas se midió por ELISA en los sobrenadantes de las células tratadas con LPS. Los resultados muestran que la subfracción 8.5 disminuyó los niveles de TNF- α e IL-6. Se sabe que la producción de citocinas puede ser inducida por diversos estímulos inflamatorios como el LPS en macrófagos, la inhibición de estos compuestos es importante en el tratamiento de las enfermedades inflamatorias, debido a que con ello el reclutamiento celular se ve disminuido y los niveles de los mediadores también, dando como consecuencia una

disminución en la formación de edema y desaparición del dolor. Por lo cual podemos decir que *S. crotalarioides* puede ayudar en la disminución o desaparición de los signos de la inflamación al disminuir los niveles de los mediadores involucrados (TNF- α e IL-6).

9. Conclusiones

- El extracto clorofórmico presenta actividad antiinflamatoria en un modelo de inflamación aguda.
- Se logró fraccionar el extracto clorofórmico obteniendo un total de ocho fracciones, las cuales fueron evaluadas en el modelo de edema auricular, la fracción activa fue la número 8.
- En un posterior fraccionamiento la subfracción 5 presenta actividad antiinflamatoria en un modelo *in vitro* debido a que disminuyó los niveles de los mediadores en estudio (TNF- α e IL-6).
- Se determinó la presencia de ácido ursólico por cromatografía de gases acoplado a masas, compuesto al que se le atribuye la actividad antiinflamatoria de esta planta.

Perspectivas

Por lo anterior, este estudio es un antecedente para que se continúe con la investigación de esta planta medicinal en otros modelos de inflamación.

10. Bibliografía

- Abbas Abul, K., Lichtman Andrew, H., & Pober Jordan, S. (2002). Inmunología celular y molecular. Inmunología Celular y Molecular.
- Alvarado, A., & Beirana, A. (2003). Pimecrolimus, opción terapéutica. *Revista del Centro Dermatológico Pascua*. 12(1) 7 -14.
- Barrett, K. E. (2013). Ganong fisiología médica 24a. McGraw Hill Mexico.
- Bhaskar, H., Kapoor, P. & Ragini. (2010). Comparison of transdermal diclofenac patch with oral diclofenac as an analgesic modality following multiple premolar extractions in orthodontic patients: A cross over efficacy trial. *Contemporary clinical dentistry*, 1(3), 158-163.
- Borazan, A., & Binici, D. N. (2010). Relationship between insulin resistance and inflammation markers in hemodialysis patients. *Renal failure*, 32(2), 198-202.
- Boukthir, S., Mazigh, S. M., Kalach, N., Bouyahya, O., & Sammoud, A. (2010). The effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs and Helicobacter pylori infection on the gastric mucosa in children with upper gastrointestinal bleeding. *Pediatric surgery international*, 26(2), 227-230.
- Butler, M. S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of natural products*, 67(12), 2141-2153.
- Chakraborty, A., Devi, R., Rita, S., Sharatchandra, K., & Singh, T. (2004). Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. *Indian Journal of Pharmacology*. 36(4) 148 - 150.
- Cuevas Q. A., Brambila H.B.; (2003); Química I; Editorial Umbral; México; pp. 23- 25.
- Duggan, K. C., Walters, M. J., Musee, J., Harp, J. M., Kiefer, J. R., Oates, J. A., & Marnett, L. J. (2010). Molecular basis for cyclooxygenase inhibition by the non-steroidal anti-inflammatory drug naproxen. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 34950-34959.
- Durts H. D., Gokel G. W.; (2007); Química Organica Experimental; Editorial Reverté; Barcelona; pp. 79-96.
- Fernández, F., & Torres, M. (2006). Evaluation of *Pluchea carolinensis* extracts as antioxidants by the epinephrine oxidation method. *Fitoterapia* 77(3), 221 - 226.

- Fonseca, F. A., França, C. N., Póvoa, R. M., & Izar, M. C. (2010). Estatinas y accidente cerebrovascular: posibles mecanismos de acción de la protección neurovascular. *Revista de Neurología*, 51, 551- 560.
- Forman, H. J., & Torres, M. (2001). Redox signaling in macrophages. *Molecular aspects of medicine*, 22(4), 189-216.
- Gábor, M. (2003). Models of acute inflammation in the ear. In *Inflammation Protocols* (pp. 129-137). Humana Press.
- Garcia, M. D., Fernandez, M., Alvarez, A., & Saenz, M. (2004). Antinociceptive and antiinflammatory effect of the aqueous extract from leaves of pimenta racemosa var ozua (Mirtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 91, 69-73
- García-Rodríguez, R. V., Zavala-Sánchez, M. Á., Notario, S., del Carmen, A., & Pérez-Gutierrez, S. (2011). Anti-inflammatory evaluation and antioxidant potential of Senna crotalarioides and Penstemon roseus. *Bol. latinoam. Caribe plantas medicinae. aromát*, 10(1), 23-29.
- Goldenberg, N. A., Jacobson, L., & Manco-Johnson, M. J. (2005). Brief communication: duration of platelet dysfunction after a 7-day course of ibuprofen. *Annals of internal medicine*, 142(7), 506-509.
- Gonzalez, E., Villca, T., & Loza, R. (2007). Evaluacion de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género Baccharis: B. articulata, B. dracunculifolia, B. salicifolia, B. ulcina, B. latifolia, B. pentlandii, B. obtusifolia, B. subalata. *Revista Boliviana de Química*, 24 (4), 41-44.
- Halachmi, S., Toubi, A., & Meretyk, S. (2006). Inflammation of the testis and epididymis in an otherwise healthy child: Is it a true bacterial urinary tract infection?. *Journal of pediatric urology*, 2(4), 386-389.
- Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon, Gilman AG (1996) Goodman Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol.1 Novena edición. Ed. McGrawil-Hill Interamericana. México. p.p. 325-369.
- Hawkey, C. J., Laine, L., Harper, S. E., Quan, H. U. I., Bolognese, J. A., & Mortensen, E. (2001). Influence of risk factors on endoscopic and clinical ulcers in patients taking rofecoxib or ibuprofen in two randomized controlled trials. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 15(10), 1593-1601.
- Hebert, A. A., Warken, K. A., & Cherill, R. (2001). Pimecrolimus cream 1%: A new development in nonsteroid topical treatment of inflammatory skin diseases. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*. 20(4) 260 - 267.
- Herbología (2002) [<http://herbologia.altervista.org/tinturas/cassia.html>]
- Hetter, G. P. (2000). An examination of the phenol-croton oil peel: Part I. Dissecting the formula. *Plastic and reconstructive surgery*, 105(1), 227-239.

- Huang, J. C., Wun, W. S., Goldsby, J. S., Matijevic-Aleksic, N. & Wu, K. K. (2004) Cyclooxygenase-2-derived endogenous prostacyclin enhances mouse embryo hatching. *Human reproduction*, 19 (12) 2900-2906.
- Ismaili, H., Milella, L., Fkih-Tetouani, S., Ildrissi, A., Camporese, A., Sosa, S., ... & Aquino, R. (2004). In vivo topical anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of two extracts of *Thymus satureioides* leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 91(1), 31-36.
- Janeway, Ch. A., Travers, P., Walport, M., Schlomchik, M.J. (2005). *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad*". Ed. Masson. España. pp 1233-1253
- Kawabata, T., Cui, M. Y., Hasegawa, T., Takano, F., & Ohta, T. (2011). Anti-inflammatory and anti-melanogenic steroidal saponin glycosides from Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds. *Planta medica*, 77(7), 705-710.
- Kayhan, S., Guzel, A., Duran, L., Tutuncu, S., Guzel, A., Gunaydin, M., ... & Selcuk, M. Y. (2013). Effects of leflunomide on inflammation and fibrosis in bleomycine induced pulmonary fibrosis in wistar albino rats. *Journal of thoracic disease*, 5(5), 641.
- Kuklinski C., (2003) *Farmacognosia, estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Ediciones omega, Barcelona, pp. 32-41
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Fausto, N. (2004). *Pathologic basis of disease*. Robbins and Contran (Eds), pp. 47-86
- Ley K. (2001). *Physiology of inflammation*. Oxford University Press, NY, pp: 1-10.
- Li, Q., & Verma, I. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2(10), 725-734
- Massó González, E. L., Patrignani, P., Tacconelli, S., & Rodríguez, L. A. G. (2010). Variability among nonsteroidal antiinflammatory drugs in risk of upper gastrointestinal bleeding. *Arthritis & Rheumatism*, 62(6), 1592-1601.
- Mattson C. P. (2006) *Fisiopatología*. 7a edición. Editorial Médica Panamericana. p.p. 387-402
- Miyazaki, D., Nakamura, T., Toda, M., Cheung-Chau, K. W., Richardson, R. M., & Ono, S. J. (2005). Macrophage inflammatory protein-1 α as a costimulatory signal for mast cell-mediated immediate hypersensitivity reactions. *Journal of Clinical Investigation*, 115(2), 434.
- Murakami, A., Nakamura, Y., Ohto, Y., Yano, M., Koshihara, T., Koshimizu, K., & Ohigashi, H. (2000). Suppressive effects of citrus fruits on free radical

generation and nobiletin, an anti-inflammatory polymethoxyflavonoid. *Biofactors*, 12(1-4), 187-192.

- Murphy, J. E., Morales, R. E., Scott, J., & Kupper, T. S. (2003). IL-1, innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expresión of IL-1 in epidermis on chemical carcinogenesis. *The Journal Of Immunology*. 170(11), 5697-5703.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. (2003). Natural products as sources of new drugs over the period 1981 - 2002. *Journal of Natural Products*. 66(7), 1022 -1037.
- Oliveira, S. H. P., Canetti, C., Ribeiro, R. A., & Cunha, F. Q. (2008). Neutrophil migration induced by IL-1 β depends upon LTB4 released by macrophages and upon TNF- α and IL-1 β released by mast cells. *Inflammation*, 31(1), 36-46.
- Passani, M. B., Giannoni, P., Bucherelli, C., Baldi, E., & Blandina, P. (2007). Histamine in the brain: beyond sleep and memory. *Biochemical pharmacology*,73(8), 1113-1122.
- Pérez González, C., Serrano Vega, R., González-Chávez, M., Zavala Sánchez, M. A., & Pérez Gutiérrez, S. (2013). Anti-inflammatory activity and composition of senecio salignus kunth. *BioMed research international*.
- Pérez, S., Meckes, M., Pérez, C., Susunaga, A., & Zavala, M. A. (2005). Anti-inflammatory activity of Lippia dulcis. *Journal of ethnopharmacology*, 102(1), 1-4.
- Pérez-Gutiérrez, S., Sánchez-Mendoza, E., Martínez-González, D., Zavala-Sánchez, M. A., & Pérez-González, C. (2012). Kramecyne a new anti-inflammatory compound isolated from Krameria cytisoides. *Molecules*, 17(2), 2049-2057.
- Petersen, A. M., & Pedersen, B. K. (2005). The anti-inflammatory effect of exercise. *Journal of applied physiology*, 98(4) 1154-1162.
- Ribeiro, R. A., Vale, M. L., Thomazzi, S. M., Paschoalato, A. B., Poole, S., Ferreira, S. H., & Cunha, F. Q. (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*. 387(1), 111-118.
- Ríos, J. L., Recio, M. C., Giner, R. M., & Máñez, S. (2004). Métodos de estudio in vivo de extractos y productos antiinflamatorios. En Nuevas Fuentes de Antioxidantes Naturales (Rosas A, ed.), CYTED, Caracas. pp. 107 - 116.
- Robbins C. (2008) Patología Estructural y Funcional. Quinta Edición. Ed. Interamericana MC.Graw-Hill. pp. 57-103.
- Sadowski, T., & Steinmeyer, J. (2002). Differential effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs on the IL-1 altered expression of plasminogen

activators and plasminogen activator inhibitor-1 by articular chondrocytes. *Inflammation Research*, 51(8), 427-433.

- Schadow, A., Scholz-Pedretti, K., Lambeau, G., Gelb, M. H., Fürstenberger, G., Pfeilschifter, J., & Kaszkin, M. (2001). Characterization of group X phospholipase A2 as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. *Journal of investigative dermatology*, 116(1), 31-39.
- Setty, A. R., & Sigal, L. H. (2005). Herbal Medications Commonly Used in the Practice of Rheumatology: Mechanisms of Action, Efficacy, and Side Effects. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*. 34(6), 773 - 784.
- Simmons, D. L., Wagner, D., & Westover, K. (2000). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, acetaminophen, cyclooxygenase 2, and fever. *Clinical infectious diseases*, 31(Supplement 5), S211-S218.
- Skoog, D. A., Stanley R., Crouch, F., James H.; (2008); Principios de Análisis Instrumental; Mc Graw Hill; España; pp. 296-298, 364-365, 491-492.
- Szekanecz, Z. (2008): "Pro-inflammatory cytokines in atherosclerosis." *Israel Medical Association Journal*, 10 (3) 529–530.
- Tanabe, T., & Tohnai, N. (2002). Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other lipid mediators*, 68, 95-114.
- Thornton, P., Pinteaux, E., Gibson, R. M., Allan, S. M., & Rothwell, N. J. (2006). Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *Journal of neurochemistry*, 98(1), 258-266.
- Tracey, K. J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature*. 420(6917) 853-859.
- Tsai, S. J., & Yin, M. C. (2008). Antioxidative and anti-inflammatory protection of oleanolic acid and ursolic acid in pc12 cells. *Journal of food science*, 73(7), H174-H178.
- Vall, O. & Castillo B. (2003). Técnicas instrumentales en farmacia y ciencias de la salud. Edición mexicana, pp. 254-272, 394-412, 456-460.
- Wang, J. H., Manning, B. J., Di Wu, Q., Blankson, S., Bouchier-Hayes, D., & Redmond, H. P. (2003). Endotoxin/lipopolysaccharide activates NF- κ B and enhances tumor cell adhesion and invasion through a β 1 integrin-dependent mechanism. *The Journal of Immunology*, 170(2), 795-804.
- Warner, T. D., & Mitchell, J. A. (2003). Nonsteroidal antiinflammatory drugs inhibiting prostanoid efflux: As easy as ABC?. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(16), 9108-9110.

- Yang, Z., & Marshall, J. S. (2009). Zymosan treatment of mouse mast cells enhances dectin-1 expression and induces dectin-1-dependent reactive oxygen species (ROS) generation. *Immunobiology*, 214(4), 321-330.
- Young, J. M., & De Young, L. M. (1989) In: Change, J.Y. Lewis, A.J.(Eds), Pharmacological methods control of inflammation. Alan R.Liss. Inc., *New York*, pp.215-231
- Yunes, R. A., Filho, V. C., Ferreira, J., & Calixto, J. B. (2005). The use of natural products as sources of new analgesic drugs. *Studies in Natural Products Chemistry*, 30, 191 - 212.
- Zambrano, SA: Inmunología: básica y clínica. 8 edn: México; 2007.