

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



“Estudio químico biodirigido del efecto antiinflamatorio
de *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae)
en el edema de la oreja inducido por TPA”

TESIS

Que para obtener el grado de Doctora en Biología Experimental

Presenta:

M. en C. Ana del Carmen Susunaga Notario

Comité tutorial:

Codirector Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.

Codirectora Dra. María Salud Pérez Gutiérrez.

Asesor Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.

Asesor Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez.

(Julio/2014)



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

Nº. 00054

México 23/07/2014

ESTUDIO QUIMICO BIODIRIGIDO DEL EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE *Senna villosa* (MILLER) H.S. IRWIN & BARNEBY (LEGUMINOSAE) EN EL EDEMA DE LA OREJA INDUCIDO POR TPA

En México, D.F., se presentaron a las 10:00 horas del día 25 del mes de julio del año 2014 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. RUBEN ROMAN RAMOS
- DR. MARIO GARCIA LORENZANA
- DR. EDUARDO GONZALEZ ZAMORA
- DR. MIGUEL ANGEL ZAVALA SANCHEZ

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

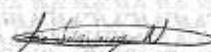
DOCTORA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: ANA DEL CARMEN SUSUNAGA NOTARIO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

ANA DEL CARMEN SUSUNAGA NOTARIO
ALUMNA



RENSO
LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS



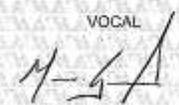
DRA. EDITH PONCE ALCÁZAR

PRESIDENTE



DR. RUBEN ROMAN RAMOS

VOCAL



DR. MARIO GARCIA LORENZANA

VOCAL



DR. EDUARDO GONZALEZ ZAMORA

SECRETARIO



DR. MIGUEL ANGEL ZAVALA SANCHEZ

“El programa de Doctorado en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 001482, en el Nivel Consolidado y cuenta con apoyo del mismo consejo, clave DAFCYT-2003IDPTNN0020.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT 208292

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-Iztapalapa, aprobó la tesis titulada: "Estudio químico biodirigido del efecto antiinflamatorio de *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) en el edema de la oreja inducido por TPA", que presentó la M. en C. Ana del Carmen Susunaga Notario.

El día 25 de julio del año 2014.

Sinodales:

Dr. Rubén Román Ramos.

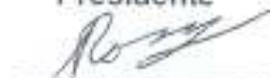
Profesor titular C

Depto. Ciencias de la Salud D.C.B.S

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

rr@xanum.uam.mx

Presidente



Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez

Profesor titular C.

Depto. Sistemas biológicos D.C.B.S

Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco

mzavala@correo.xoc.uam.mx

Secretario



Dr. Mario García Lorenzana

Profesor titular C

Depto. de Biología de la Reproducción D.C.B.S

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

mglo@xanum.uam.mx

Vocal



Dr. Eduardo González Zamora

Profesor titular C

Depto. de Química D.C.B.I

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

egz@xanum.uam.mx

Vocal



Comité tutorial:

Codirector Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar.
Profesor titular C.
Depto. Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
aaaf@xanum.uam.mx

Codirectora Dra. María Salud Pérez Gutiérrez.
Profesor titular C.
Depto. Sistemas biológicos.
msperez@correo.xoc.uam.mx
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Asesor Dr. Julio Cesar Almanza Pérez.
Profesor titular C.
Depto. Ciencias de la Salud.
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.
icap@xanum.uam.mx

Asesor Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez.
Profesor titular C.
Depto. Sistemas biológicos.
mzavala@correo.xoc.uam.mx
Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.

Dedicatorias

Gracias a Dios por permitirme cumplir un sueño más.

A mi familia, a mi madre por apoyarme pese a todas las adversidades; a mi padre por mantener mis pies siempre en el suelo; a mi hermano Roberto, quien siempre ha creído en mí y ha apoyado cada uno de mis sueños de forma incondicional.

A mi comité tutorial: Dr. Alarcón por recibirme y escucharme cuando más lo necesité. Dr. Almanza por recordarme el valor del compañerismo y la importancia del trabajo en equipo. Dra. Salud por todas y cada una las lecciones de vida enseñadas y compartidas. Dr. Zavala por todo lo aprendido a lo largo de todos estos años.

A mis sinodales: Dr. Rubén, de antemano gracias por todo su apoyo durante mi estancia en la UAM-I y la paciencia en la revisión de mi tesis. Dr. Mario por la confianza brindada y por permitirme conocer el maravilloso mundo de la histología. Dr. Eduardo, no tengo manera de agradecer el apoyo e interés mostrado a lo largo de este proyecto.

A mis amigos de UAM-X: (COPLADA) Gaby, Rebe, Lety, Lupita y Lázaro por mostrarme el verdadero valor de la amistad.

A mis amigos de UAM-I: Ana, Janet, Selene, René, Héctor, Gerardo, Angeles, Gerardito, Vladimir, Jose, Emma, Ale. A mis niños de servicio social: Toño, Chava y Bety por la paciencia y apoyo brindado. Y a cada uno de los compañeros del Laboratorio de Farmacología.

Dra. Rosy, amiguita aún a la distancia nunca dejaste de estar presente.

Dra. Carmen, por escucharme y animarme cuando las cosas no marchaban.

Dr. Fausto por el apoyo brindado a lo largo de este proyecto.

Al maestro Atilano por ser un ejemplo en mi vida profesional y personal, gracias de verdad por apoyarme y escucharme cuando ni yo podía entenderme.

Dra. Rocío por todo el apoyo brindado a lo largo de este proyecto y su invaluable amistad.

Isadora, gracias por escucharme y apoyarme en este tiempo y no dejarme caer.

Nelson, primo, gracias por TODO, definitivamente este proyecto no se hubiese realizado sin tu apoyo.

Gina, Sandra y Lucia, mis psicólogas de cabecera; pero sobre todo amigas incondicionales.

A todos mis amigos que faltaron por mencionar y que permitieron que este sueño sea una realidad.

A mis angelitos que siempre me cuidan: Abuelito Odilón, Tía Bety y abuelita Dominga.

Tomasa y Layla: el claro ejemplo del amor incondicional, gracias por llegar a mi vida.

No olvidemos que a veces es necesario hacer un alto.
Cuando los pies están doloridos,
la mente se distrae y el cansancio empobrece la Búsqueda.

Solo conseguirás llegar al final de tu camino
si obedeces tu ritmo personal.
Puede que tardes más que otros o tengas que avanzar solo,
pero es necesario respetar tu propio ritmo.
Cuando percibas esto, quizá lo apliques
a todo lo que tienes que hacer en la vida:
respetar tu tiempo."
-Paulo Coelho

Resumen: *Senna villosa* (Miller) es una planta que crece en México. En la medicina tradicional Mexicana esta planta es usada tópicamente para tratar infecciones de la piel, pústulas, erupciones y cicatrización de heridas. Sin embargo, estudios acerca de su potencial efecto antiinflamatorio no han sido realizados. El objetivo del presente trabajo fue realizar un estudio químico biodirigido de las hojas de *Senna villosa*, en el modelo del edema de la oreja inducido por el 13-acetate de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), para determinar la acción antiinflamatoria de los principios activos. Los resultados mostraron que el extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa* tiene propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas. Nueve fracciones fueron obtenidas de este extracto, incluyendo un precipitado blanco de las fracciones 2 y 3. El precipitado blanco mostró la mayor actividad antiinflamatoria, por lo que fue químicamente caracterizado usando espectrometría de masas y espectroscopía infrarroja y de resonancia magnética nuclear. Los resultados arrojaron una mezcla de ésteres alifáticos, los cuales fueron identificados como los principales constituyentes activos: tetradecanoato de hexilo ($C_{20}H_{40}O_2$), tetradecanoato de heptilo ($C_{21}H_{42}O_2$) y tetradecanoato de octilo ($C_{22}H_{44}O_2$). Esta investigación aporta evidencias, por primera vez, de las propiedades antiinflamatorias y antiproliferativas de estos compuestos, los cuales también modulan la migración leucocitaria a nivel local (por análisis histológico). Además, se muestran evidencia de que la actividad antiinflamatoria de estos ésteres alifáticos puede ser explicada a través de la participación compleja entre el óxido nítrico, IL-6 y TNF- α . Una ruta de síntesis para obtener estos compuestos también fue propuesta.

Abstract: *Senna villosa* (Miller) is a plant that grows in México. In traditional Mexican medicine, it is used topically to treat skin infections, pustules and eruptions and to heal wounds by scar formation. However, studies about its potential anti-inflammatory effect have not been performed. The aim of the present work was to perform a bioassay-guided chemical study from the leaves of *Senna villosa*, in a model of ear edema induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA), to determine the anti-inflammatory action of the active principles. The results revealed that the chloroform extract from *Senna villosa* leaves has anti-inflammatory and anti-proliferative properties. Nine fractions were obtained from the bioassay-guided chemical study, including a white precipitate from fractions 2 and 3. Although none of the nine fractions presented anti-inflammatory activity, the white precipitate exhibited pharmacological activity. It was chemically characterized using mass spectrometry and infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy, resulting in a mixture of three aliphatic esters, which were identified as the principal constituents: hexyl-tetradecanoate (C₂₀H₄₀O₂), heptyl-tetradecanoate (C₂₁H₄₂O₂) and octyl-tetradecanoate (C₂₂H₄₄O₂). This research provides, for the first time, evidence of the anti-inflammatory and anti-proliferative properties of compounds isolated from *Senna villosa*, which also modulate the local leucocytes migration by histological analysis. In addition, the activity anti-inflammatory of these three aliphatic esters may be explained throughout of the complex participation among the nitric oxide, IL-6 and TNF- α . Finally, a route of synthesis to obtain these compounds also was proposed.

Keywords: *Senna villosa*; anti-inflammatory and anti-proliferative properties; bioassay-guided chemical study

Índice

1. Introducción	1
2. Antecedentes	
2.1 Inflamación	4
2.1.2 Clasificación del proceso inflamatorio.	
2.1.2.1 Inflamación aguda	5
2.1.2.2 Inflamación crónica	6
2.1.3 Manifestaciones locales de la inflamación	7
2.1.4 Manifestaciones sistémicas de la inflamación	8
2.1.5 Etapas del proceso inflamatorio	
2.1.5.1 Etapa vascular	8
2.1.5.1.2 Cambios en el flujo sanguíneo y en el calibre de los vasos	9
2.1.5.1.3 Aumento de la permeabilidad vascular	10
2.1.5.2 Etapa celular	11
2.1.6 Acontecimientos celulares: extravasación y función de fagocitosis de los leucocitos	13
2.1.7 Mediadores inflamatorios	14
2.1.7.1 Mediadores derivados del plasma	14
2.1.7.2 Mediadores derivados de las células	14
2.1.7.3 Aminas vasoactivas	14
2.1.7.3.1 Histamina	14
2.1.7.3.2 Serotonina	15
2.1.7.4 Proteasas plasmáticas	16
2.1.7.4.1 Sistema del complemento	16

2.1.7.4.2 Sistema de cininas	16
2.1.7.4.3 Sistema de coagulación	17
2.1.7.5 Metabolitos del ácido araquidónico: prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas (Autacoides)	17
2.1.7.4.6 Factor activador de plaquetas (PAF)	20
2.1.7.4.7 Citocinas	20
2.1.7.4.8 Las quimiocinas	21
2.1.7.4.9 Óxido nítrico (NO)	22
2.2 Tratamiento farmacológico para la inflamación	22
2.2.1 Agentes antiinflamatorios de uso clínico	23
2.2.2 Efectos adversos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la inflamación	24
2.2.3 Plantas medicinales	26
2.2.3.1 Agentes antiinflamatorios de origen vegetal	27
2.2.3.2 Plantas medicinales en el estado de Yucatán	27
2.2.3.3 Género Senna	28
2.2.3.4 Senna villosa	29
2.2.3.4.1 Compuestos químicos identificados en Senna villosa	31
2.3. Modelo experimental para la inducción de la inflamación aguda	32
2.3.1 Edema auricular inducido con TPA	32
3 Justificación	35
4 Pregunta de investigación	36
5 Hipótesis	36
6 Objetivo general	36
7 Objetivos particulares	36

8 Material y Métodos	37
8.1 Material vegetal	37
8.2 Preparación de los extractos	37
8.3 Animales de experimentación	37
8.4 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos en el modelo de edema auricular inducido con TPA	38
8.5 Conteo diferencial leucocitario	39
8.6 Fraccionamiento del extracto clorofórmico	40
8.7 Purificación del precipitado blanco	40
8.8 Evaluación del efecto antiinflamatorio de las fracciones en el modelo de edema auricular inducido con TPA	41
8.9 Elucidación estructural	41
9.9.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	41
8.9.2 Espectroscopia Infrarroja (ATR-FTIR)	41
8.9.3 Espectrometría de masas de alta resolución ionización por electroespray	42
8.10 Determinación de la acción antiinflamatoria del compuesto activo	42
8.10.1 Evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido por TPA en animales adrenalectomizados y sham	42
8.10.2 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en suero	43
8.10.3 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en el tejido auricular	43
8.10.4 Análisis histológico	44
8.11 Proponer una ruta de síntesis orgánica de los compuestos activos	45
8.12 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos sintetizados	45
8.13 Análisis estadístico	45
9 Resultados y discusión	46

9.1 Efecto antiinflamatorio	46
9.2 Conteo diferencial leucocitario	48
9.3 Fraccionamiento del extracto clorofórmico	55
9.4 Estudio químico biodirigido del efecto antiinflamatorio en el modelo del edema auricular inducido con TPA	56
9.5 Elucidación estructural	58
9.5.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)	58
9.5.2 Espectroscopia Infrarroja (ATR-FTIR)	61
9.5.3 Espectrometría de masas de alta resolución ionización por electroespray	62
9.6 Determinación de la acción antiinflamatoria del compuesto activo	66
9.6.1 Evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido por TPA en animales sham y adrenalectomizados	66
9.6.2 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en suero	70
9.6.3 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en el tejido auricular	75
9.6.4 Análisis histológico	79
9.7 Síntesis orgánica de los compuestos activos	84
9.8 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos sintetizados	85
10 Conclusiones	87
11 PERSPECTIVAS	89
12 Bibliografía	90
Anexo 1	

1. Introducción:

La prevalencia de la dermatitis atópica ha incrementado significativamente, causando considerables costos económicos y disminuyendo la calidad de vida de las personas que la padecen (Galli y col., 2008; Julián-González y col., 2012; Kim y col., 2103). Diferentes terapias son usadas en combinación para el tratamiento de la dermatitis atópica para recobrar: la funcionalidad de la piel (cremas hidratantes), para reducir la picazón (antihistamínicos), para la prevención de infecciones secundarias (antibióticos) y para el control del proceso inflamatorio (antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales) (Wollenberg y col., 2012).

Los fármacos esteroidales pueden causar diversos efectos adversos, tales como constipación, sedación, depresión respiratoria y alucinaciones, que pueden ser molestas o hasta peligrosas para los pacientes (Guatam y col., 2009). Estos agentes pueden interrumpir la liberación de diversas citocinas (TNF- α , IL1- α y β , IL-2, IL-22) y éstas a su vez modifican la función leucocitaria, causando inmunosupresión y, tras la administración crónica, un decremento en la síntesis de colágeno, produciendo atrofia epidermal (Palfreemam y col., 2013).

Los antiinflamatorios no esteroideos si son administrados de forma prolongada pueden causar úlcera gástrica, bloqueo de la agregación plaquetaria, inhibición de la motilidad uterina, prolongación del periodo de gestación e inhibición de la función renal (Morgan y col., 2013; Sinha y col., 2013). Esto justifica la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiinflamatoria.

Actualmente la investigación de plantas medicinales es una fuente de moléculas prototipo para el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos (Balunas y col., 2005; Calixto y col., 2004). En este sentido, los estudios de productos naturales con actividad antiinflamatoria están dirigidos a la búsqueda de nuevos agentes que no presenten los efectos adversos mencionados anteriormente y a la producción de derivados sintéticos con actividad mejorada. (Guatam y col., 2009; Balunas y col., 2005; Calixto y col., 2004; Pérez, 2001).

En México la información etnobotánica indica una gran variedad de plantas medicinales que se utilizan para tratar la inflamación y los síntomas relacionados con el proceso inflamatorio (Marín y col., 2013; Bautista y col., 2011). En particular, en el estado de Yucatán, ubicado al sureste de la República Mexicana, el uso de estas plantas es una práctica común.

Senna villosa (Miller) H.S. Irwin and Barneby (Syn.: *Cassia villosa* Miller, *Cassia articulate* Rose, *Cassia geniculata* Sesse y Mosino, *Cassia geniculata* Don, *Cassia stellata* Jones, *Chamaefistula astroites* Cham and Schidl) es una planta que crece en la República Mexicana en los estados de Baja California, Campeche, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Veracruz y Yucatán. Su nombre popular maya en Yucatán es: Salche, Saalche, box saalch'e, tsalche, tuy'ache, tu' ja' ché, boxsaal y zalche, cuyo significado en español es frijol negro (Flores 2001).

En la medicina tradicional mexicana esta planta se utiliza tópicamente en el tratamiento de infecciones de la piel, pústulas y como cicatrizante. El extracto acuoso es usado en tratamiento de dismenorrea, trastornos menstruales y

problemas inflamatorios (Flores 2001; Mena y col., 1997). Su actividad tripanocida y antiprotozoaria ha sido reportada (Polanco y col., 2012; Jiménez y col., 2011 a y b; Jiménez y col., 2010; Guzmán y col., 2008; Calzada y col. 2006).

Sin embargo, la actividad antiinflamatoria de la planta, así como de sus componentes activos, no ha sido estudiada.

Antecedentes

2.1 Inflamación

En la antigüedad se definía a la inflamación como aquella respuesta que desencadena el organismo ante el estímulo producido por la acción de agentes extraños. Los signos y consecuencias de la inflamación eran ya bien conocidos desde las culturas antiguas; Celsus introdujo cuatro de los cinco signos característicos del proceso inflamatorio, a saber: rubor, tumor, calor y dolor. Más tarde, Galeno de Pérgamo incorporaría como quinto signo la pérdida de la función (Ley 2001).

La inflamación es una respuesta defensiva fisiológica del organismo ante una agresión, ya sea de tipo infeccioso, inmunológico, o mecánico (Gallin y col., 1992), a través de la cual un tejido vascularizado responde a los estímulos internos o externos que han lesionado su integridad. La respuesta inflamatoria tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado, e implica al plasma, las células circulantes, los vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares.

Las células circulantes son los leucocitos (neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos) y plaquetas. Las células del tejido conjuntivo son las células cebadas, que se sitúan alrededor de los vasos sanguíneos; los fibroblastos formadores del propio tejido conjuntivo, macrófagos ocasionales y linfocitos residentes (Abbas 2000).

La acumulación y subsecuente activación de leucocitos es el evento central en la patogénesis de todas las formas de inflamación. Inmunológicamente la eliminación del material causante de la inflamación está mediada por una serie de pasos:

Reconocimiento: que puede ser específico o no específico.

El reconocimiento específico está mediado por inmunoglobulinas (anticuerpos) o por receptores de linfocitos T.

El reconocimiento no específico (reconocimiento de proteínas desnaturalizadas o endotoxinas) puede estar mediado directamente por la vía alternativa del complemento o por fagocitos. La unión del componente de reconocimiento del sistema inmune con el antígeno generalmente conduce a la activación y amplificación del sistema, iniciando la producción de sustancias proinflamatorias.

Destrucción: está mediada por células fagocíticas, como los fagocitos mononucleares; éstos pueden migrar libremente o encontrarse fijos en los tejidos. Otra forma de destrucción está mediada por leucocitos (neutrófilos o monocitos) los cuales son reclutados de la circulación sanguínea (Gallin y col., 1992; Cruse y Lewis, 1995; Decker, 2000).

2.1.2 Clasificación del proceso inflamatorio.

La inflamación manifiesta dos fases bien definidas, la aguda y la crónica.

2.1.2.1 Inflamación aguda.

La inflamación aguda es aquella que se presenta en un lapso relativamente corto con una duración de minutos, horas o de pocos días. Tiene como principales características la exudación de fluidos y de proteínas plasmáticas formadoras del edema y el flujo de leucocitos (principalmente neutrófilos) hacia el sitio de la lesión.

En los estadios tempranos de la respuesta inflamatoria (respuesta inflamatoria aguda), los neutrófilos juegan un papel importante. La infiltración de los neutrófilos en el tejido lesionado ocurre dentro de las primeras 6 horas después del estímulo. Una vez en el tejido, estos leucocitos aumentan la expresión de receptores para sustancias quimioattractantes, entre ellas, las quimiocinas IL-8 y NAP-2, los fragmentos C3a, C5a y C5b67, fibrinopéptidos, prostaglandinas y leucotrienos (Daffer y col., 1995).

Asimismo, los neutrófilos fagocitan al patógeno invasor y liberan mediadores como la proteína inflamatoria para macrófagos (MIP-1a y MIP-1b) que es una quimiocina atractante de macrófagos. Los macrófagos activados secretan las citocinas IL-1, IL-6 y TNF- α , que incrementan la permeabilidad vascular e inducen la coagulación; el TNF- α y la IL-1 aumentan la expresión de moléculas de adhesión en las células del endotelio vascular, así como la producción de la quimiocina IL-8. Cabe señalar que otro factor quimiotáctico para macrófagos es el interferón gama (IFN- γ), capaz de activar otras células del sistema inmune, como a las células NK y linfocitos B (Ley 2001; Tracey 2002; Murphy y col., 2003).

2.1.2.2 Inflamación crónica.

La inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza por la presencia de linfocitos y de macrófagos, así como por la proliferación de vasos sanguíneos y de tejido conjuntivo. En las respuestas vascular y celular de la inflamación aguda o crónica, los mediadores actúan de forma aislada, secuencial o en combinación y

en fases crónicas amplifican la respuesta inflamatoria e influyen en su evolución (Robbins y Cotran, 1995).

La inflamación crónica se desarrolla cuando persiste la acción del antígeno. Esta situación se observa en enfermedades autoinmunes en las que los propios antígenos activan de manera continua a los linfocitos T. En la respuesta inflamatoria crónica, la activación de macrófagos es una característica. Los macrófagos activados aumentan su capacidad para expresar moléculas MHC II para producir citocinas e incrementar la actividad microbicida. Por lo tanto, son células presentadoras de antígenos muy efectivas. En la respuesta inflamatoria crónica, la acumulación de altas concentraciones de macrófagos activados produce lesión tisular severa ya que dichas células liberan enzimas hidrolíticas y radicales libres. Asimismo, secretan $\text{TNF-}\alpha$, citocina que ejerce actividad citotóxica contra células tumorales. La activación de los macrófagos por el $\text{IFN-}\gamma$ incrementa la síntesis del $\text{TNF-}\alpha$ y la acción sinérgica de ambas citocinas propicia el inicio de la respuesta inflamatoria crónica (Johansson y col., 2001).

2.1.3 Manifestaciones locales de la inflamación

Las manifestaciones locales de la inflamación dependen de su causa y del tejido particular afectado. Estas manifestaciones pueden variar desde la tumefacción y formación de exudado hasta la formación de un absceso o de una úlcera.

La respuesta inflamatoria aguda se caracteriza por la producción de exudados, los cuales varían respecto al líquido, las proteínas plasmáticas y el recuento celular. La inflamación aguda puede producir exudado seroso, hemorrágico,

fibrinoso, membranoso o purulento. El exudado inflamatorio a menudo está compuesto por una combinación de estos tipos.

2.1.4 Manifestaciones sistémicas de la inflamación.

En condiciones óptimas la respuesta inflamatoria permanece confinada en un área localizada. Sin embargo, cuando los mediadores inflamatorios son liberados en la circulación, la lesión local puede producir manifestaciones sistémicas importantes, como en la inflamación aguda lo son: las alteraciones del recuento de glóbulos blancos (leucocitosis o leucopenia) y la fiebre (Gallin y col.,1992).

2.1.5 Etapas del proceso inflamatorio.

La inflamación incluye dos etapas principales: la vascular y la celular. A nivel bioquímico los mediadores inflamatorios, que actúan juntos o en secuencia, amplían la respuesta inicial e influyen en su evolución mediante la regulación de las respuestas vascular y celular posteriores.

2.1.5.1 Etapa vascular.

Los cambios vasculares o hemodinámicos asociados con la inflamación comienzan casi inmediatamente después de la lesión y se manifiestan por una constricción momentánea de los vasos sanguíneos de pequeño calibre presentes en el área. Esta vasoconstricción es seguida con rapidez por la vasodilatación de las arteriolas y las vénulas que irrigan la zona. Como se observa en la figura 1.

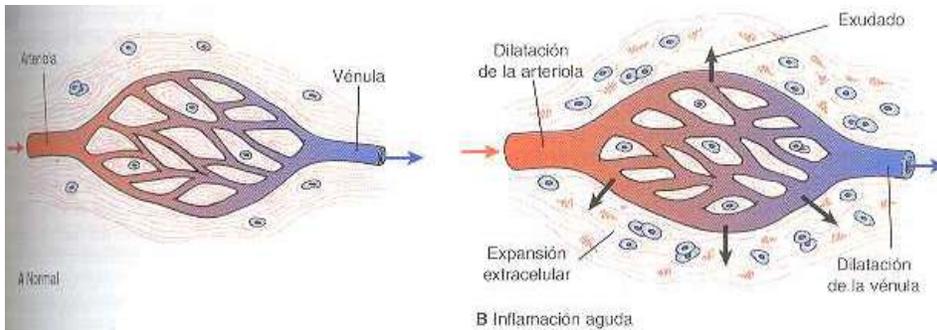


Fig.1 Fase vascular de la inflamación aguda. A lecho capilar normal. B inflamación aguda con dilatación vascular que causa aumento del enrojecimiento (eritema) y calor. Movilización del líquido en los espacios intersticiales (tumefacción) y extravasación de proteínas plasmáticas en los espacios extracelulares (exudado).

2.1.5.1.2 Cambios en el flujo sanguíneo y en el calibre de los vasos.

Los cambios en el flujo sanguíneo y en el calibre de los vasos se inician de forma muy rápida tras la lesión y evoluciona a un ritmo que depende de la intensidad de la misma. El orden que siguen las alteraciones es el siguiente:

Después de un periodo inconstante y transitorio de vasoconstricción arteriolar (suele durar unos pocos segundos), se produce vasodilatación que afecta inicialmente a las arteriolas y que posteriormente da lugar a la apertura de nuevos lechos capilares en la zona de la lesión. Esta es la causa del aumento del flujo sanguíneo, que a su vez es la causa del enrojecimiento y del incremento de calor en la zona de la lesión. La duración del periodo de vasodilatación depende del propio estímulo.

Después del periodo de vasodilatación se produce el retraso de la circulación, el cual se debe al aumento de la permeabilidad de la microvasculatura, con la salida de líquido rico en proteínas desde la circulación hasta los tejidos extravasculares.

La disminución de líquido en el compartimiento intravascular da lugar a la concentración de hematíes en los vasos de pequeño calibre y el aumento de la viscosidad sanguínea, lo que se refleja en la presencia de pequeños vasos dilatados y repletos de hematíes; a lo que se le denomina estasis.

A medida que evoluciona la estasis, se empieza a observar la orientación periférica de leucocitos, principalmente neutrófilos a lo largo del endotelio vascular, un proceso que se denomina marginación leucocitaria. Más adelante los leucocitos se adhieren al endotelio, de forma transitoria al principio (rodamiento) y con mayor intensidad después, atravesando la pared vascular en un corto periodo de tiempo y dirigiéndose hacia el intersticio (Johnston y Kubes., 2001).

La cronología y duración de los cambios en el calibre de los vasos es variable. En los casos en los que el estímulo es leve las distintas fases de la estasis pueden no aparecer hasta transcurridos 15 a 30 minutos, mientras que cuando el estímulo es intenso lo hacen al cabo de pocos minutos.

2.1.5.1.3 Aumento de la permeabilidad vascular.

El aumento de la permeabilidad vascular que ocasiona la salida de un fluido rico en proteínas (exudado) hacia el intersticio es la característica principal y de mayor especificidad de la inflamación aguda. Esta pérdida reduce la presión osmótica del líquido intersticial y el aumento de la presión hidrostática secundaria a la vasodilatación, este mecanismo conduce a una importante salida y acumulación de líquido en el tejido intersticial, el cual constituye el edema.

2.1.5.2 Etapa celular.

La etapa celular de la inflamación aguda se caracteriza por la movilización de los glóbulos blancos fagocíticos (leucocitos) hacia el área de la lesión. Cualquier célula que participa en las reacciones inflamatorias se puede llamar célula inflamatoria (Terr, 1994). Al igual que la respuesta inmunitaria, la inflamación puede ser generada por dos tipos de leucocitos: monocitos/macrófagos y polimorfonucleares (granulocitos); este último grupo incluye a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. También participan en el proceso proteínas circulantes que son derivadas de los sistemas del complemento, de la coagulación, de la fibrinólisis y de la vía de las cininas.

Por otra parte, las células inflamatorias se clasifican en circulantes de vida corta, como es el caso de los neutrófilos, eosinófilos y basófilos y células que preexisten en los tejidos como residentes no circulantes de vida larga, como es el caso de las células cebadas y los macrófagos. Según la función prioritaria que ejercen estas células, se clasifican en fagocitarias (neutrófilos y macrófagos) o secretoras de mediadores de la inflamación (células cebadas y basófilos), capaces de incrementar la permeabilidad vascular y liberar factores quimiotácticos (Broide 1994). A su vez, las células cebadas (mastocitos) responden a diferentes estímulos secretando mediadores inflamatorios diferentes (Welle 1997) y movilizan leucocitos desde el vaso hacia el tejido afectado.

Entre los activadores de estas células cabe mencionar a los fragmentos C3a y C5a del complemento, la sustancia P, el superóxido, PAF, LTC₄, LTB₄, PGD₂, las citocinas IL-1, MCP-1, MIP-1 α y bradicina, entre otros.

Asimismo, las células cebadas pueden producir mediadores antiinflamatorios como NO, IL-10, IL-13 y TGF- β los que, en el proceso crónico, inhiben la función de los leucocitos (Johnston y Kubes, 2001).

Los linfocitos son leucocitos que juegan un papel importante en el proceso inflamatorio: son células blancas que poseen una gran capacidad de recircular y de movilizarse desde el torrente sanguíneo hacia los órganos linfáticos. Los linfocitos B que se forman en la médula ósea, así como los linfocitos T formados en el timo, constituyen células fundamentales en la respuesta inflamatoria de origen inmunitario. El linfocito B tiene como función prioritaria el reconocimiento de un antígeno y para ello, expresa moléculas receptoras específicas en la superficie de la membrana. La interacción entre el antígeno y el receptor activa al linfocito B, convirtiéndolo en célula plasmática productora de anticuerpos. A su vez, los linfocitos T se dividen en linfocitos T “cooperadores” (T_H) y linfocitos T “citotóxicos” (T_C). Los T_H liberan citocinas que activan a los fagocitos, induciéndolos a destruir células extrañas; se dividen a su vez en TH_1 que ayudan a la diferenciación celular de los linfocitos B y en células TH_2 estimuladoras de fagocitos. Los T_C se encargan de la destrucción de las células anormales (tumoraes o infectadas por virus) y liberan sustancias tóxicas con el propósito de destruirlas, tal es el caso de TNF- α , linfocinas y células asesinas naturales (natural killers o NK). Las células NK son linfocitos citotóxicos que se caracterizan por tener un contenido mayor de citoplasma, carecen de receptores antigénicos y expresan marcadores específicos en su membrana (CD7, CD2, NK1 y NK2). La función principal de las NK es la destrucción de células infectadas cubiertas de anticuerpos IgG a este proceso se

le denomina citotoxicidad celular-dependiente de anticuerpo. Otra función de estas células es la de regular la respuesta inmune mediante la liberación de citocinas (IL-1 e IL-2) y tienen la capacidad de sobrevivir después de atacar a la célula blanco, liberando el proteoglicano que almacena en sus vesículas (Roitt y col., 1993; Stites y Abba, 1994; Ley, 2001).

Los macrófagos que se encuentran en los tejidos y que constituyen la forma madura de los monocitos en la sangre, son células versátiles que secretan una gran variedad de mediadores químicos y tienen un papel relevante en la activación de los linfocitos T (Ley, 2001).

2.1.6 Acontecimientos celulares: extravasación y función de fagocitosis de los leucocitos.

Una de las funciones más características e importantes de la inflamación es el aporte de leucocitos a la zona de la lesión. Los leucocitos fagocitan a los agentes patógenos, destruyen a las bacterias y otros microorganismos, y degradan el tejido necrótico y los antígenos extraños. También pueden prolongar la inflamación e inducir lesión tisular al liberar enzimas, mediadores químicos y radicales del oxígeno.

La secuencia de acontecimientos en la respuesta celular a la inflamación involucra al leucocito en los siguientes procesos: marginación, migración, quimiotaxis, fagocitosis (Stites 1998). Tras haber descrito los acontecimientos de la inflamación se describirán los mediadores químicos que son la causa de dichos acontecimientos.

2.1.7 Mediadores inflamatorios.

2.1.7.1 Mediadores derivados del plasma.

Los mediadores derivados del plasma (sistema de complemento) están presentes en el plasma en formas precursoras que deben ser activadas, habitualmente a través de una serie de fragmentaciones proteolíticas, para adquirir sus propiedades biológicas.

2.1.7.2 Mediadores derivados de las células.

Los mediadores derivados de las células permanecen normalmente secuestrados en gránulos intracelulares (histamina en los gránulos de los mastocitos) y deben ser secretados o sintetizados de *novo* (prostaglandinas, citocinas) en respuesta a un estímulo. La mayor parte de los mediadores realizan su actividad biológica uniéndose inicialmente a receptores específicos situados en las células diana. A continuación se describen los mediadores específicos más importantes.

2.1.7.3 Aminas vasoactivas

Dos aminas, histamina y serotonina, son especialmente importantes debido a que están disponibles en reservas preformadas y son los primeros mediadores liberados durante la inflamación.

2.1.7.3.1 Histamina.

En el ser humano causa la dilatación de las arteriolas y el incremento de la permeabilidad vascular de las vénulas; sin embargo, produce constricción de las arterias de mayor calibre. Se considera que es el principal mediador de la fase

inmediata de incremento de la permeabilidad vascular, dando lugar a contracción endotelial y ensanchamiento de las uniones entre las células endoteliales de las vénulas (Roitt y col., 1993). La histamina está ampliamente distribuida en los tejidos, aunque es más abundante en los mastocitos que están presentes normalmente en el tejido conjuntivo adyacente a los vasos sanguíneos. También se puede observar en los basófilos y en las plaquetas. En los gránulos de los mastocitos existe histamina que es liberada por la degranulación que presentan estas células en respuesta a diversos estímulos: 1) lesiones de tipo físico como los traumatismos, el frío y el calor, 2) reacciones inmunitarias en las que se produce la unión o fijación de anticuerpos a los mastocitos, 3) fragmentos del complemento denominados anafilatoxinas, 4) proteínas liberadoras de histamina y derivados de los leucocitos y 5) neuropéptidos.

2.1.7.3.2 Serotonina.

La serotonina es una sustancia liberada por las plaquetas y células mastoides durante la inflamación. Uno de los estímulos para su liberación es la producción del factor de crecimiento nervioso. Los efectos fisiológicos de la serotonina en los tejidos son mediados por una familia de receptores, los cuales están divididos en tres grandes grupos designados como: 5HT₁, 5HT₂ y 5HT₃. Varios tipos de receptores se ubican en las terminaciones nerviosas libres y median los efectos de la serotonina sobre las neuronas. Su unión al receptor 5HT₃ activa un canal catiónico selectivo para el Na⁺ y causa una acción directa de los nociceptores. La serotonina puede también sensibilizar a los receptores y disminuir su umbral de respuesta a estímulos térmicos y mecánicos.

2.1.7.4 Proteasas plasmáticas.

Diversos fenómenos de la respuesta inflamatoria están mediados por tres sistemas relacionados entre sí y derivados del plasma: los sistemas del complemento, de las cininas y de la coagulación.

2.1.7.4.1 Sistema del complemento.

Está constituido por veinte proteínas (junto a sus productos de fragmentación), cuya concentración mayor se observa en el plasma. Este sistema actúa en los procesos inmunitarios innatos y adaptativos de defensa frente a microorganismos, y su objetivo final es la lisis de los mismos a través del denominado complejo de ataque de membrana. En el proceso se elaboran diversos componentes del complemento que producen aumento de la permeabilidad vascular, quimiotaxis y opsonización.

Las funciones biológicas del sistema del complemento se incluyen en dos categorías generales: lisis celular a través del complejo de ataque de membrana y efectos biológicos de los fragmentos proteolíticos del complemento. Los factores derivados del complemento afectan a diversos fenómenos en la inflamación aguda: fenómenos vasculares, adhesión, quimiotaxis, activación de leucocitos y fagocitosis.

2.1.7.4.2 Sistema de cininas.

Este sistema genera péptidos vasoactivos a partir de proteínas plasmáticas denominadas cininógenos y mediante proteasas específicas llamadas calicreínas. El sistema de cininas produce la liberación del nonapéptido vasoactivo bradicinina,

un potente agente que incrementa la permeabilidad vascular. Cuando se inyecta en la piel, la bradicinina causa contracción del músculo liso, dilatación de los vasos sanguíneos y dolor.

2.1.7.4.3 Sistema de coagulación.

El sistema de coagulación y la inflamación son procesos íntimamente conectados. El sistema de la coagulación se divide en dos vías que confluyen, culminando en la activación de la trombina y la formación de la fibrina. Este sistema contribuye a la fase vascular de la inflamación (Decker 2000; Linden 2001; Mycek y col., 2004).

2.1.7.5 Metabolitos del ácido araquidónico: prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas (Autacoides)

Cuando las células son activadas por diversos estímulos, los lípidos de sus membranas se remodelan rápidamente para generar mediadores lipídicos biológicamente activos que actúan como señales intra o extracelulares. Estos tienen una distribución muy amplia y se han detectado en casi todos los tejidos y líquidos corporales. Su producción aumenta en reacción a diversos estímulos y generan efectos biológicos muy heterogéneos. Los productos derivados del ácido araquidónico (AA) ejercen su acción sobre diversos procesos biológicos, como la inflamación y la homeostasis.

El AA se libera de los fosfolípidos de la membrana por la acción de fosfolipasas celulares, a través de estímulos mecánicos, químicos o físicos o por acción de otros mediadores. Los metabolitos del AA, también denominados eicosanoides,

son sintetizados mediante dos clases principales de enzimas: ciclooxigenasas (prostaglandina y tromboxanos) y lipoxigenasas (leucotrienos y lipoxinas).

Los eicosanoides pueden mediar casi cualquier paso de la inflamación. Se pueden encontrar en los exudados inflamatorios y su síntesis es aumentada en las zonas de inflamación. Los puntos intracelulares sobre los que actúan las enzimas para dar lugar a la producción de mediadores eicosanoides son las regiones especializadas, conocidas como cuerpos lipídicos, que contienen todas las principales enzimas generadoras de eicosanoides y que se forman rápidamente en respuesta a agentes como el factor activador de plaquetas (FAP). Se considera que la compartimentalización de la formación de eicosanoides en los cuerpos lipídicos proporciona una reserva de araquinodato que podrá ser utilizada para producir mediadores sin afectar a otras membranas celulares.

La vía de la ciclooxigenasa es mediada por dos enzimas (COX-1 y COX-2), y genera prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. Las prostaglandinas se clasifican en diversas series según sus características estructurales y se codifican por una letra (PGD, PGE, PGF, PGG y PGH), y por un subíndice numérico que indica el número de dobles enlaces del compuesto. Los prostanoides más importantes en la inflamación son PGE, PGD₂, PGF₂α, (prostaglandinas) y PGI₂ (prostaciclina) y TxA₂ (tromboxano), todos los cuales proceden de la acción de una enzima específica. Algunas de estas enzimas muestran una distribución tisular restringida. Las prostaglandinas también participan en la patogenia del dolor y la fiebre en la inflamación.

En la vía de la lipoxigenasa, los productos iniciales son generados por tres lipoxigenasas diferentes, 5, 12 y 15, que están presentes en sólo algunos tipos

celulares. La 5-lipoxigenasa (5-LO) es la enzima predominante en los neutrófilos. Durante la activación celular, ésta se transloca a la membrana nuclear e interactúa con una proteína reguladora asociada con la membrana para formar el complejo enzimático activo que convierte el AA en el precursor (5-HPETE) del producto principal 5-HETE, que es un quimiotáctico para los neutrófilos, se convierte en una familia de compuestos denominada en conjunto leucotrienos.

Las interacciones célula-célula son importantes en la biosíntesis de los leucotrienos. Los productos del ácido araquidónico pueden pasar de un tipo celular a otro, y tipos celulares diferentes pueden colaborar entre sí para generar eicosanoides. De esta manera, las células que no son capaces de generar un tipo particular de eicosanoide pueden producir estos mediadores a partir de productos intermedios generados en otras células, incrementando de esta manera los tipos y cantidades de eicosanoides producidos en las zonas de inflamación.

Las lipoxinas son miembros de la familia de productos bioactivos generados a partir del AA y los mecanismos de biosíntesis transcelular son clave para su producción. Por si solas las plaquetas no pueden formar lipoxinas, pero cuando interactúan con los leucocitos pueden generar estos metabolitos a partir de productos intermedios derivados de los neutrófilos. Los contactos célula-célula incrementan el metabolismo transcelular y el bloqueo de la adhesión inhibe la producción de lipoxina. Las lipoxinas tienen diferentes acciones proinflamatorias y antiinflamatorias. Inhiben la quimiotaxis y adhesión de los neutrófilos, pero estimulan la adhesión de los monocitos. Existe una relación inversa entre la cantidad de lipoxina y la cantidad de leucotrieno que se forma (Hla y col., 1999).

2.1.7.4.6 Factor activador de plaquetas. (PAF)

Es otro mediador bioactivo derivado de los fosfolípidos. Actúa a través de un receptor acoplado a la proteína G y su acción está regulada por una familia de acetilhidrolasas PAF de inactivación. Diversas células, como plaquetas, basófilos (y mastocitos), neutrófilos, monocitos/macrófagos y células endoteliales, pueden elaborar PAF en forma secretada y en forma intracelular. Además de la estimulación plaquetaria, el PAF produce vaso y broncoconstricción, y en concentraciones extremadamente bajas induce vasodilatación e incremento de la permeabilidad venular, con una potencia de 100 a 10 000 veces superior a la de la histamina. Este mediador puede dar lugar a la mayor parte de las características cardinales de la inflamación; también estimula la síntesis de otros mediadores.

2.1.7.4.7 Citocinas

Es un término genérico que se utiliza para designar a las moléculas mensajeras que son secretadas por las células linfoides y no linfoides, las cuales forman una red de mediadores que regulan el crecimiento, la diferenciación y las funciones de las células involucradas en la inmunidad, hematopoyesis e inflamación. Están implicadas en las respuestas inmunitarias celulares y producen efectos adicionales que desempeñan un papel importante en la inflamación aguda y crónica.

En la tabla 1 se enlistan la principales citocinas involucradas en el proceso inflamatorio.

Tabla 1 Citocinas involucradas en la respuesta inflamatoria

Citocinas	Fuente
IL-1	Macrófagos
IL-2	Células T activadas
IL-3	Células T activadas
IL-5	Células T activadas
IL-6	Células T activadas y macrófagos
IL-10	Células T activadas
IFN γ	Células T activadas
TNF- α	Células T activadas, macrófagos y NK

2.1.7.4.8 Las quimiocinas

Son un grupo de polipéptidos pequeños que funcionan como quimioattractores de varios tipos de leucocitos; además, regulan la expresión y la conformación de las integrinas en la membrana de los leucocitos. Las quimiocinas inducen la adhesión de varios leucocitos al endotelio vascular, seguido de la migración de éstos al tejido (Kuby 1997).

2.1.7.4.9 Óxido nítrico (NO)

Es un mediador pleiotrópico de la inflamación. El NO es un gas sintetizado no solamente por las células endoteliales, sino también por los macrófagos y grupos neuronales específicos del cerebro. Este mediador desempeña un importante papel en la función vascular durante las respuestas inflamatorias, es un potente vasodilatador, reduce la agregación y adhesión plaquetaria, inhibe varias características de la inflamación inducida por mastocitos, y actúa como regulador en el reclutamiento de leucocitos. Actúa también en la respuesta del huésped frente a la infección (Cines y col., 1998)

2.2 Tratamiento farmacológico para la inflamación.

2.2.1 Agentes antiinflamatorios de uso clínico

La búsqueda de agentes antiinflamatorios se enfoca prioritariamente al bloqueo de la acción de moléculas mediadoras de la iniciación y amplificación de la respuesta inflamatoria. Actualmente existe un gran número de fármacos empleados para tratar los procesos inflamatorios agudos y crónicos, siendo los más ampliamente utilizados los antiinflamatorios no esteroideos (AINES). El mecanismo de acción de un importante número de los AINES ocurre vía la enzima ciclooxigenasa (COX), cuya inhibición produce inhibición de la síntesis de las prostaglandinas. A partir del ácido araquidónico presente en las células, la COX sintetiza prostaglandinas (PGs) y tromboxanos (TXs). Coexisten dos isoformas de la COX, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 se expresa normalmente en el organismo (constitutiva) y es responsable, en gran medida, de las funciones fisiológicas de las PGs y de los TXs, entre éstas, de la integridad de la mucosa gástrica y de la

agregación plaquetaria. A su vez, la COX-2 se expresa en células inflamatorias como los macrófagos y las células cebadas (inducida); las citocinas proinflamatorias y/o los lipopolisacáridos de las bacterias estimulan su expresión. La COX-2 es la responsable de la síntesis de las PGs que participan en la respuesta inflamatoria aguda y crónica (Needleman y col., 1997; Brombacher y col., 2003).

Como inhibidores inespecíficos de las COX, los AINES presentan efectos secundarios indeseables. Si bien, la acción antiinflamatoria de estos fármacos se debe a la inhibición que ejercen sobre la COX-2, los efectos adversos característicos de estos fármacos son el resultado de su efecto inhibitorio sobre la COX-1.

Los glucocorticoides son potentes antiinflamatorios que inhiben la expresión de citocinas proinflamatorias y de moléculas de adhesión. El mecanismo de acción se basa en la interacción del complejo cortisol-receptor glucocorticoide con el factor de transcripción nuclear NF- κ B, que es el activador de los genes que codifican para citocinas y moléculas de adhesión (Bourke y Moynagh, 1999; Rhen y Cidlowski, 2005). El NF- κ B se une a las secuencias del DNA y estimula la transcripción de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y factores del complemento, así como la transcripción de la COX-2 (Tanabe y Tohnai, 2002).

Los glucocorticoides pueden inducir un efecto sobre la inflamación no mediada por cambios en la expresión génica y que involucra la activación de la sintasa del óxido nítrico del endotelio (eNOS) (Hafezi-Moghadam y col., 2002). La potencia de los glucocorticoides como inhibidores de diversas enfermedades inflamatorias

sustenta el uso continuo que ha tenido este agente terapéutico, aun cuando con frecuencia se presentan efectos colaterales indeseables.

2.2.2 Efectos adversos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la inflamación.

Los principales efectos adversos de los AINES son los gastrointestinales, renales, hematológicos y del sistema nervioso central. Dentro de los efectos adversos gastrointestinales se encuentra la úlcera gástrica o duodenal con hemorragia o perforación, sangre oculta en heces, gastritis, pirosis, ardor, malestar epigástrico indigestión y sensación de llenado, dolor abdominal, sangrado profuso.

Los estudios endoscópicos muestran lesiones de un 20-30% de los casos, las cuales se caracterizan por eritema de mucosa, erosiones, y hasta ulceraciones pépticas. La ausencia o presencia de esta sintomatología no es una buena predicción del riesgo de sangrado grave, y hay una falta de correlación más evidente en el anciano; este riesgo también aumenta en casos con antecedentes de sangrado, úlcera péptica o administración simultánea de corticoides y AINEs y dosis altas de ambos. Se requiere confirmar la presencia de *Helicobacter pylori* y las complicaciones gastrointestinales. Estos síntomas se reducen si los AINEs se toman con alimentos, antiácidos o ambos. Los efectos adversos renales son: infección urinaria, hematuria, cistitis, azoemia, nicturia, proteinuria, poliuria, disuria, variación de la frecuencia urinaria, oliguria y anuria.

Los AINEs afectan la función del riñón y producen daño tisular. Las alteraciones funcionales son las más importantes y de mayor prevalencia. La insuficiencia renal aguda y las alteraciones de líquidos y electrolitos, (retención de sodio e

hiperpotasemia) se producen de manera principal en el anciano, en alteraciones de la función renal preexistente o en reducciones de la perfusión renal, como en la hipovolemia e insuficiencia cardiaca.

El daño tisular es más raro y sus manifestaciones incluyen nefritis aguda intersticial con o sin proteinuria en la nefrosis de origen inmunológico, posiblemente mediado por células T; mínimos cambios de glomerulonefritis con síndrome nefrótico, necrosis papilar, necrosis tubular aguda y vasculitis.

La terapia simultánea con diuréticos constituye otro factor de riesgo. La insuficiencia renal puede conducir a un aumento en la creatinina plasmática a los pocos días de iniciada la terapia con AINEs; en casos graves, el potasio se incrementa y se presenta aumento de peso conforme el flujo renal disminuye. La identificación y suspensión temprana del AINEs por lo general conlleva una mejoría. La retención de sodio y agua, un efecto adverso de los AINEs, puede presentarse en el 25% de los pacientes, dependiendo de su estado de salud, edad, presencia de alteraciones renales, diabetes, uso simultáneo de inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, diuréticos conservadores de potasio y ciclosporina. Efectos adversos hematológicos: neutropenia, eosinofilia, leucopenia, pancitopenia, trombocitopenia, agranulocitosis, granulocitopenia, anemia aplásica, anemia hemolítica, epistaxis, menorragia, hemorragia, magulladuras, hemólisis y equimosis (Gallin,1992; Lombardino y Lowe; 2004).

Los antiinflamatorios esteroideos presentan los siguientes efectos adversos: estreñimiento, sedación, depresión respiratoria, alucinaciones inducen disminución

de la competencia inmunológica, supresión inespecífica de la respuesta inflamatoria, incrementan la producción de ácido clorhídrico y pepsina, reducen la barrera protectora de moco en el estómago, la absorción de Ca^{2+} y la consolidación de las fracturas, retrasan el crecimiento en niños y crean tolerancia y dependencia. (Bourke y Moynagh, 1999; Rhen y Cidlowski, 2005).

2.2.3 Plantas medicinales.

Actualmente la investigación encaminada al desarrollo y búsqueda de nuevos fármacos provenientes de productos naturales es un trabajo de carácter multidisciplinario en el que se abordan aspectos etnobotánicos, fitoquímicos, farmacológicos y biotecnológicos.

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

Las plantas tienen importantes aplicaciones en la medicina moderna. Entre otras, son fuente directa de agentes terapéuticos, se emplean como materia prima para la fabricación de medicamentos semisintéticos más complejos, la estructura química de sus principios activos puede servir como modelo para la elaboración

de fármacos sintéticos y tales principios se pueden utilizar como marcadores taxonómicos en la búsqueda de nuevos medicamentos (Bluter 2004).

2.2.3.1 Agentes antiinflamatorios de origen vegetal.

Los estudios de productos naturales con actividad antiinflamatoria están dirigidos a la búsqueda de nuevos agentes que no presenten los efectos adversos mencionados anteriormente y la producción de derivados sintéticos con actividad mejorada (Guatam y col., 2009; Balunas y col., 2005; Calixto y col., 2004; Pérez., 2001).

En México, los bancos de información etnobotánica señalan un número muy importante de plantas medicinales que son utilizadas para tratar la inflamación y/o síntomas relacionados con un proceso inflamatorio. Los estados pertenecientes a las zonas Sur y Sureste del país son considerados entre los más ricos en cuanto a diversidad biológica y cultural, en donde las antiguas civilizaciones desarrollaron sistemas avanzados para el cuidado de la salud basados fundamentalmente en el uso de plantas medicinales (Bluter, 2004).

2.2.3.2 Plantas medicinales en el estado de Yucatán.

En el Estado de Yucatán el uso de plantas medicinales es una práctica muy arraigada de la región. De acuerdo con estudios etnobotánicos, existen aproximadamente 460 plantas descritas como medicinales que pertenecen a 72 familias botánicas. Así mismo, se encuentra referido a la familia *Fabaceae*, antes conocida como *Leguminosae*, como una de las que poseen más especies con aplicaciones en medicina maya. La subfamilia *Caesalpinoideae* está representada

por 13 géneros y 58 especies. Entre los géneros con mayor presencia en número de especies destacan *Senna* con 24, *Caesalpinia* con 8 y *Bauhinia* con 7 (Flores y col., 2001).

2.2.3.3 Género *Senna*.

El género *Senna* está integrado por más de 350 especies, principalmente como resultado de la nueva combinación taxonómica. De éstas, el 80% se encuentra en el continente americano, mientras que otros miembros se encuentran en África tropical, Madagascar y Australia, con sólo unas pocas especies en el sureste de Asia y algunos en la isla del Pacífico (Irwin y col., 1982; Randell y col., 1998).

Estudios químicos indican que las especies del género *Senna* contienen flavonoides, fenoles, alcaloides, cromonas, lactonas, estilbenos, triterpenos, quinonas y antraquinonas, de las hojas fueron aislados polisacáridos, flavonoides, esteroides, terpenos, antocianinas y proantocianidinas, catequinas, epicatequinas, un glicósido flavonol, ácido fistúlico, crisofanol, ácido ascórbico, quercetina, aminoácidos y glicósidos cardiacos. Varios de estos compuestos se han asociados con diversas actividades biológicas, por ejemplo: laxante, antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, hepatoprotectiva, antígenotóxica, hipolipídica, espasmogénica y antinociceptiva, antiproliferativa, inmunoestimuladora, hipotensiva, antidiabética, estrogénica y antiestrogénica, antiulcerosa, antihistamínica, anticancerígena, antiinflamatoria, antipirética y agregante plaquetario (Boni y col., 2010; Iwuanyanwuy col., 2011; Rao y col., 2012; Dave y col., 2012; Da Silva y col., 2012; Sheeba y col., 2010; Choudhary y col., 2011;

Amalesh y col., 2011; Sermakkani y col., 2012; Bhalodia y col., 2011; Abdul y col., 2010; Basha y col., 2011; Ekwueme y col., 2011; Ntandou y col., 2011).

En la tabla 2 se muestran las diferentes especies del género *Senna* con las diferentes actividades farmacológicas relacionadas con el proceso inflamatorio.

Tabla 2 Diferentes especies del género *Senna* con las diferentes actividades farmacológicas relacionadas con el proceso inflamatorio.

Actividad	Especie
Enfermedades de la piel	<i>Senna alata</i> (Mohideen y col., 2005, Kingsley y col., 2011) <i>Cassia tora</i> (Choudhary y col., 2011).
Antioxidante	<i>Cassia siamea</i> (Chantong y col., 2008) <i>Cassia tora</i> (Amalesh y col., 2011) <i>Senna spectabilis</i> (Viegas y col., 2007) <i>Senna crotalariodes</i> (García y col., 2011) <i>Cassia auriculata</i> (Sucheta y col., 2010) <i>Cassia fistula</i> (Rahul y col., 2011) <i>Senna macronthera</i> (Guarize y col., 2012) <i>Cassia occidentalis</i> (Boni y col., 2010).
Antigotosa	<i>Cassia alata</i> (Hernandez y Apaya., 2010)
Antiinflamatoria	<i>Senna alata</i> (Kingsley y col., 2011) <i>Cassia tora</i> (Amalesh y col., 2011, Choudhary y col., 2011) <i>Senna spectabilis</i> (Da Silva y col., 2012) <i>Senna mimosoides</i> (Ekwueme y col., 2011) <i>Senna crotalariodes</i> (García y col., 2011) <i>Cassia occidentalis</i> (Boni y col., 2010; Sheeba y Sreekanth., 2011; Basha y col., 2011) <i>Senna macronthera</i> (Guarize y col., 2012) <i>Cassia sophera</i> (Sumangala y Suresh., 2012)

2.2.3.4 *Senna villosa*

Senna villosa (Miller) H.S. Irwin & Barneby es una planta que crece en los estados de Chiapas, Oaxaca, Puebla, Baja California, Veracruz, Tabasco, Campeche y Yucatán; es una especie que pertenece a la subfamilia *Caesalpinoideae*, sus sinónimos son los siguientes: *Cassia villosa* Miller, *Cassia articulata* Rose, *Cassia geniculata* Sesse y Mosino, *Cassia geniculata* G. Don, *Cassia stellata* M.E. Jones, *Chamaefistula astroides* (Barneby 1982). En la península de Yucatán los mayas le otorgaron nombres como: Salche, Saalche, box saalch'e, tsalche, tuy'ache, tu' ja' ché, boxsaal y zalche, cuyo significado en español es frijol negro.



Figura 2. *Senna villosa* conocida comúnmente como Salché

En la medicina tradicional mexicana esta planta se utiliza en el tratamiento de infecciones en la piel, en la aparición de pústulas, erupciones y en el proceso de cicatrización. En todos los casos su aplicación es tópica. El extracto acuoso se utiliza para el tratamiento de dismenorrea y problemas inflamatorios (Flores 2001).

La actividad biológica de los extractos hexánico y metanólico de las hojas de *Senna villosa* se ha evaluado frente a bacterias y hongos, encontrándose que éstos poseen actividad moderada (Mena y col., 1997).

El extracto diclorometánico de la hojas presentó actividad *in vitro* sobre la velocidad de crecimiento de *Trypanosoma cruzi* en sus formas epimastigote y tripomastigote (Fajardo 1998; Guzmán y col., 2004); el extracto etanólico de las hojas de *S. villosa* presentó actividad *in vivo* e *in vitro* sobre la velocidad de crecimiento en la duplicación del parásito de *T. cruzi* (Mena y col., 1997; Polanco y col., 2012).

El extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa* presentó actividad inhibitoria sobre ratones Balb/C infectados con *T. cruzi* en la fase subaguda de infección (Jimenez y col., 2011). Se aisló el acetato de 8-hidroximetilenticosanilo, el cual presentó actividad *in vitro* e *in vivo* sobre la velocidad de crecimiento de *T. cruzi* en sus formas epimastigote, tripomastigote y amastigote (Guzmán y col., 2008; Jimenez y col., 2010). Se evaluó la toxicidad de los extractos hexánicos, diclorometánico y etanólico frente a nauplios de *Artemia salina*, demostrando que éstos son inocuos. Estudios *in vivo* con ratones de las hojas de *Senna villosa* mostraron que éstas no poseen efectos tóxicos a una dosis de 5 g/Kg (Chan 2008).

2.2.3.4.1 Compuestos químicos identificados en *Senna villosa*

Pruebas fitoquímicas detectaron la presencia de quinonas, esteroides, flavonoides y taninos, del extracto hexánico describen el aislamiento de dos quinonas antracénicas, identificadas como crisofanol y fisción como componentes

mayoritarios (Mena y col., 1997); del extracto diclorometánico se aislaron tres componentes: escualeno (triterpeno), crisofanol y fisción (antraquinonas); de una fracción de acetato de etilo se logró el aislamiento y la identificación de siete metabolitos secundarios: emodina (quinona antracénica), apigenina, luteolina y crisoeriol (flavonas), kaempferol y quercetina (flavonoles) y demetoxicapilarisina (neoflavona) (Chan 2008); el aceite esencial de las semillas reveló la presencia de los ésteres etílicos de los ácidos palmítico y esteárico, del éster metílico del ácido linoleico, estigmasterol, δ -sitosterol y vitamina E (Baquedano 1999).

2.3. Modelo experimental para la inducción de la inflamación aguda

2.3.1 Edema auricular inducido con TPA

Múltiples son las patologías en cuya fisiopatología se encuentran asociados eventos característicos de la reacción inflamatoria, aumentando crecientemente el número de especies intermediarias que se descubren asociadas con sus mecanismos y que se consideran vinculadas a la etiología de muchas enfermedades. Por estas y otras razones, estudiar los procesos inflamatorios resulta un hecho imprescindible y necesario, con gran repercusión en el campo terapéutico.

Uno de los agentes flogísticos más utilizado para inducir inflamación es el 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA), que es uno de los constituyentes activos presentes en el aceite de *Croton tiglium* L (Euphorbeaceae). La aplicación tópica del compuesto induce inflamación de la piel y una respuesta hiperproliferativa en los animales de experimentación, manifestaciones que se asemejan a enfermedades tales como la psoriasis.

El mecanismo de acción del TPA no es del todo claro, pero se ha asociado con la liberación de eicosanoides. En la respuesta inflamatoria aguda el TPA estimula a la fosfolipasa A_2 liberando ácido araquidónico, con lo que se inicia la síntesis de prostaglandinas y de leucotrienos (Fürstenberger y col., 1981; Carlson y col., 1985; Schadow y col., 2001). entre los cuales la PGE_2 es el mediador relevante. Ashendel y Boutwell (1979) reportan un pico elevado de PGE_2 en la epidermis a las 6 y 24 h después de administrar el TPA. Observaciones realizadas por Fürstenberg y col. (1994) señalan que el TPA incrementa el contenido epidermal de los cisteinil leucotrienos LTC_4 , LTD_4 y LTE_4 , pero no el del LTB_4 . Por otra parte, se sabe que TPA activa a la proteína cinasa C (PKC) induciendo la exocitosis, modulando de la conductancia iónica, la contracción de la musculatura lisa y la proliferación celular, eventos todos fuertemente implicados en el proceso inflamatorio (Recio y col., 1995).

Inhibidores de la biosíntesis de prostaglandinas y leucotrienos pueden mostrar actividad en este modelo, por lo que es utilizado para la evaluación de diferentes fármacos antiinflamatorios (Carlson y col., 1985).

La aplicación de TPA (1 μ L) en la oreja del ratón induce en las primeras 2 h vasodilatación, eritema, edema y agregación plaquetaria 3 a 4 h después, la oreja se engruesa como resultado de la infiltración de líquido. Entre 4 y 6 h 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). La acumulación de leucocitos en la dermis se manifiesta entre 6 y

24 h después del TPA y, a partir de las 24 h se incrementa el proceso de la división celular en la epidermis (Young y De Young, 1989; Gábor 2000).

3 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. Los agentes antiinflamatorios de uso clínico que se utilizan para el tratamiento de la inflamación pueden presentar efectos adversos. Esto justifica la búsqueda de nuevos compuestos antiinflamatorios. En este sentido, las plantas medicinales son fuente potencial para el descubrimiento de dichos compuestos y su estudio permitirá también validar con métodos científicos su uso en la medicina tradicional mexicana.

En México, la información etnobotánica indica una gran variedad de plantas medicinales que se utilizan para tratar la inflamación y los síntomas relacionados con el proceso inflamatorio (Marín y col., 2013, Bautista y col., 2011). En particular en el estado de Yucatán, ubicado en el sureste de la República Mexicana, el uso de estas plantas es una práctica común.

Senna villosa (Miller) H.S. Irwin and Barneby se utiliza tópicamente en el tratamiento de infecciones de la piel, pústulas y como cicatrizante. Sin embargo la actividad antiinflamatoria de esta planta así como de sus componentes activos no ha sido estudiada.

4 Pregunta de investigación

¿Presentará *Senna villosa* compuestos con actividad antiinflamatoria?

5 Hipótesis

Senna villosa contiene sustancias con actividad antiinflamatoria

6 Objetivo general

Determinar la acción antiinflamatoria de diferentes extractos de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA, así como aislar, purificar y elucidar la estructura química de los compuestos activos.

7 Objetivos particulares

- Seleccionar el extracto, la fracción y los compuestos con mayor efecto antiinflamatorio mediante un estudio biodirigido empleando el modelo del edema auricular inducido con TPA.
- Aislar, purificar y elucidar la estructura química de los compuestos activos.
- Determinar la acción antiinflamatoria de los compuestos activos a través de la cuantificación de parámetros inflamatorios.
- Proponer una ruta de síntesis orgánica de los compuestos activos.

8 Material y Métodos

8.1 Material vegetal.

La planta completa de *Senna villosa* se colectó en la comunidad rural de Komchem, pueblo que se encuentra a 17 km de Mérida, Yucatán, en septiembre de 2011 y fue autenticada por el Dr. Salvador Flores Guido en el herbario de la Universidad Autónoma de Yucatán (número de voucher 10284).

El material biológico fue secado a temperatura ambiente durante siete días hasta la deshidratación total. Las hojas de la planta fueron trituradas en un molino manual (ROTTER).

8.2 Preparación de los extractos.

En matraces balón de 5 L se colocaron 500 g de la planta seca y molida con 3.5 L de cloroformo, metanol y agua, calentando a reflujo durante 4 h. Al término de este periodo los extractos se filtraron y el disolventes orgánicos se eliminaron a presión reducida en un evaporador rotatorio, el extracto acuoso fue liofilizado.

8.3 Animales de experimentación.

Se utilizaron ratones machos, sanos, cepa CD-1, de aproximadamente de seis semanas de edad, de 25 a 30 g de peso. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa (UAM-I), en el cual se criaron y mantuvieron bajo condiciones de temperatura, ambiente y ciclos de luz-oscuridad 12X12 h, y con suministro de agua y alimento (Harlan®) *ad libitum*. El manejo de los animales de laboratorio se llevó a cabo de acuerdo con los estatutos de la CICUAL (Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los

Animales de Laboratorio) basados en las normas internacionales y nacionales establecidas en la "Norma Oficial Mexicana" para el cuidado y uso de la animales de laboratorio "[NOM-062-ZOO-1999, revisado en 2001).

8.4 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Los animales fueron separados en cinco grupos de 10 animales, el edema fue inducido con TPA (Sigma Aldrich), el cual se aplicó tópicamente en la oreja izquierda del ratón a una dosis de 2.5 µg de TPA/oreja, disueltos en 25 µL de acetona; en la oreja derecha se administró 25 µL de acetona o del vehículo usado en el extracto correspondiente (cloroformo, metanol o agua).

En todos los casos, después de 30 minutos de la aplicación del TPA, se administraron tópicamente 2 mg de extracto en ambas caras de la oreja tratada con TPA (clorofórmico, metanólico y acuoso) disueltos en 25 µL del disolvente (cloroformo, metanol y agua). La indometacina (2 mg/oreja), se administró de la misma manera como control positivo.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 6 h después de la aplicación del TPA, realizando una perforación de 6 mm de diámetro del tejido atrial del centro del pabellón auricular con un sacabocados, en ambas orejas; se registró el peso del tejido auricular. El edema inducido se cuantificó en relación con la diferencia del peso entre el tejido auricular que recibió TPA y el tejido que recibió únicamente vehículo.

La inhibición del edema se determinó como por ciento respecto al edema formado en los animales del grupo control, con la siguiente fórmula

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(w - w_0) - (w' - w_0')}{(w - w_0)} * 100$$

Donde:

W = Peso de la oreja con TPA (Control)

W₀ = Peso de la oreja con vehículo (Control)

W' = Peso de la oreja con TPA (tratada)

W₀' = Peso de la oreja con vehículo (tratada)

8.5 Conteo diferencial leucocitario.

Fue tomada una muestra de sangre de la vena safena de cada ratón en cuatro tiempos diferentes (0, 240, 300 y 360 min). El tiempo cero se muestrreó antes de la aplicación de TPA. Los frotis de las muestras sanguíneas se prepararon en portaobjetos limpios de tamaño estándar, los cuales fueron teñidos de acuerdo con el método de Wright.

El recuento diferencial de leucocitos se realizó utilizando un microscopio Olympus CX41 equipado con una cámara fotográfica Olympus u-CMAD3. El recuento de las células en los portaobjetos teñidos fue de 100, la cuenta de leucocitos se inició inspeccionando la extensión sanguínea con el objetivo de bajo aumento, para así seleccionar la región con la mejor distribución de leucocitos. Posteriormente se cambió al objetivo de inmersión, colocándolo en el extremo superior de la extensión sanguínea, iniciándose el recuento y clasificación de los leucocitos en dirección del extremo inferior en campos sucesivos. Cuando fue necesario, se continuó con el recuento de más campos desde el extremo superior al inferior, hasta completar el número de células requeridas (Bauer 1983). Se diferenciaron y

cuantificaron: neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos en las extensiones sanguíneas. Los resultados obtenidos se expresaron en valores absolutos de cada tipo celular estudiado.

8.6 Fraccionamiento del extracto clorofórmico.

El extracto clorofórmico se separó por cromatografía en columna empacada en sílica gel 60 malla 70-230. La columna se eluyó con hexano, incrementando la polaridad con acetato de etilo. Se colectaron 9 fracciones, la primera fue obtenida con hexano únicamente, de la segunda a la sexta con una mezcla de hexano - acetato de etilo en una proporción 98:2, a todas las fracciones se les eliminó el disolvente en un evaporador rotatorio a presión reducida, hasta un volumen de 50 mL, dejando reposar. Las fracciones dos y tres arrojaron un precipitado de color blanco.

8.7 Purificación del precipitado blanco.

El sólido blanco fue filtrado y disuelto en cloroformo, posteriormente se agregó acetato de etilo para inducir su precipitación, finalmente fue filtrado y se colocó 6 horas en una estufa de vacío para eliminar cualquier traza de disolvente.

8.8 Evaluación del efecto antiinflamatorio de las fracciones en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

La evaluación del efecto antiinflamatorio de las nueve fracciones así como del precipitado blanco, obtenidas de la separación cromatográfica del extracto clorofórmico, fue desarrollada de acuerdo a lo descrito en la sección 8.4 (Evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido con TPA).

8.9 Elucidación estructural.

8.9.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

Los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , gradiente-(COSY, HSQC y HMBC) y DEPT, se obtuvieron en un espectrómetro de 500MHz, Bruker AVANCE-III, empleando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna y CDCl_3 (cloroformo deuterado) y DMSO-d_6 (dimetilsulfoxido deuterado) como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) son reportados en partes por millón (ppm) respecto al TMS y las constantes de acoplamiento en Hertz ($J = \text{Hz}$). Las asignaciones de los espectros de RMN ^1H , ^{13}C , se realizaron de manera sistemática.

8.9.2 Espectroscopia Infrarroja (ATR-FTIR).

La espectroscopia infrarroja fue desarrollada en un espectrómetro micro-Raman (HORIBA Jobin Yuan) con un ATR con un rango de excitación de 400-4000 nm.

8.9.3 Espectrometría de masas de alta resolución ionización por electroespray.

Los espectros se obtuvieron usando un espectrómetro de masas micrOTOF-QII (Bruker Daltonics) equipado con una fuente de ionización por electroespray (ESI). Los parámetros se establecieron de la siguiente manera: capilar 2.700 V, la presión del nebulizador 5.8 psi, flujo de gas seco 40 L/min, y la temperatura del gas seco 180 °C. La muestra se llevó a cabo en el modo de iones negativos. El rango de barrido fue de 50 a 3000 m/z.

8.10 Determinación de la acción antiinflamatoria del compuesto activo

8.10.1 Evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido con TPA en animales adrenalectomizados y sham.

Se utilizaron 60 ratones macho, 30 se adrenalectomizaron y en 30 sólo se simuló la cirugía (sham). Los animales fueron anestesiados con xilacina (5 mg / Kg) y ketamina (50 mg/Kg) por vía intraperitoneal. A continuación fueron fijados en la mesa quirúrgica, se rasuraron de forma bilateral en la zona retroperitoneal la cual fue limpiada con jabón quirúrgico, se realizó una incisión entre la tercera y cuarta costilla; se abrió y se expuso el riñón para así localizar la glándula adrenal posteriormente se llevó a cabo la enucleación bilateral de dichas glándulas, con ayuda de un electrocauterio. Se procedió a suturar la incisión con suturas quirúrgicas reabsorbibles (Atramat). Los animales sham fueron sometidos al mismo procedimiento, excepto por la enucleación bilateral de las glándulas adrenales. Se llevó a cabo un tratamiento de profilaxis con amikacina (2 mg/Kg cada 24 h) durante tres días consecutivos por vía intraperitoneal. Al cuarto día los

ratones fueron divididos en tres grupos (10 animales por grupo) y se procedió a la evaluación del efecto antiinflamatorio del compuesto activo de acuerdo a la metodología descrita en la sección 8.4.

8.10.2 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en suero.

Antes de que los animales utilizados en la sección 8.10.1 fueran sacrificados, se obtuvo una muestra de sangre de 1.5 mL del seno orbital del ojo, la cual se centrifugó a 3500 rpm por 10 minutos y a 4 °C. El sobrenadante se utilizó para la cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico según las especificaciones del proveedor (Kit de ELISA para ratón; Thermo Scientific).

8.10.3 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en el tejido auricular.

Se utilizó la muestra obtenida de 6 mm de diámetro del tejido atrial del pabellón auricular de los animales utilizados en la sección 8.10.1. Las biopsias fueron homogeneizadas en un buffer 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) con EDTA 1 mM y un inhibidor de proteasas. El homogeneizado fue incubado en hielo por 15 min en presencia de 0.1% de triton X-100, posteriormente los homogeneizados fueron centrifugados a 10000 g/min. Después de centrifugar los sobrenadantes fueron utilizados para la cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico, siguiendo las instrucciones del proveedor (Kit de ELISA para ratón Thermo Scientific).

8.10.4 Análisis histológico.

Se procesaron muestras de 6 mm de diámetro del tejido atrial del centro del pabellón auricular de animales procesados según lo descrito la sección 8.10.1. Las biopsias se fijaron en Bouin Dubosq por inmersión. Posteriormente se lavaron con etanol 70° GL, antes del procesamiento e inclusión en el procesador de tejidos. Los fragmentos se procesaron e incluyeron con ayuda del programa del procesador automático de tejidos "Histoquinet" marca Leica cuyos pasos fueron: deshidratación (etanol de 80°, 96° y 100° GL), aclaración (etanol-xileno -1:1-, xileno 1 y xileno 2) e infiltración de las muestras en ParaplastTissue extra Marca McCormickScientific en 2 pasos, el paso uno de 2 horas y el paso dos de 8 horas. Para la inclusión de los fragmentos se colocaron en escuadras de Leukart, en las que se orientaron para definir el área de corte del tejido, con Paraplast Tissue extra Marca McCormick Scientific que solidificó por un periodo de 24 horas (García, 2007).

Se realizaron cortes con la ayuda de un micrótopo rotatorio de la marca Leica, a un espesor de 7 µm y fueron montados en portaobjetos con pantalla esmerilada. Posteriormente fueron desparafinados con Neoclear; se tiñeron con la técnica de Hematoxilina Eosina (H&E) (Fortoul y col., 2010; García., 2007), con el objetivo de analizar la estructura del tejido y detectar posibles cambios que se originaron por acción de los diferentes tratamientos. Se montaron de manera permanente utilizando resina artificial "Entellan" Merk sobre el tejido y colocando su cubreobjetos respectivo; a partir de estas muestras y por medio de un microscopio óptico marca Carl Zeiss, se analizaron y diagnosticaron histológicamente las alteraciones encontradas en los tejidos auriculares de estudio. Los cortes fueron

digitalizados con la cámara axioCamMRc5 y el programa axiovision 4.8 de Carl Zeiss.

8.11 Síntesis orgánica de los compuestos activos.

Se realizó la síntesis de los esteres correspondientes por el método de Fisher, mediante el uso de agentes acoplantes, así como reacción en seco en microondas.

8.12 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos sintetizados.

Se utilizó la metodología descrita en el apartado 8.4

8.13 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (E.E.M.). Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para determinar diferencias significativas entre los grupos con respecto del control, utilizando como prueba complementaria la prueba Tukey según la distribución de los datos ($p < 0.05$).

9 Resultados y discusión.

9.1 Efecto antiinflamatorio de los extractos

En la tabla 3 mostramos los datos obtenidos de la evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA. Las orejas tratadas sólo con el vehículo (orejas derechas), exhibieron un peso de 9.37 ± 0.29 mg (estas orejas no desarrollaron edema).

Las orejas que recibieron solo TPA/vehículo (grupo control) desarrollaron un edema 6 horas después de la aplicación del TPA de 10.23 ± 0.29 mg. Las orejas tratadas con indometacina mostraron un edema significativamente menor en comparación con el grupo de control, el edema se inhibió por $36.15 \pm 4.75\%$. El grupo tratado con el extracto de clorofórmico mostró un porcentaje de inhibición del edema de $57.96 \pm 5.21\%$, el cual fue superior en relación al porcentaje de inhibición que presentó la indometacina ($p < 0.0001$).

El extracto metanólico no mostró actividad anti-inflamatoria, mientras que el extracto acuoso mostró un porcentaje de inhibición de $23.42 \pm 5.78\%$, que fue menor en comparación con los valores exhibidos por el extracto clorofórmico.

Tabla 3 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos de las hojas de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Grupo	Dosis tópica /oreja (mg)	Edema (mg)	% de inhibición
Control – TPA	Vehículo	10.23 ± 0.39	-----
Indometacina	2	6.53 ± 0.48 **	36.15 ± 4.75
Extracto clorofórmico	2	4.30 ± 0.55 ** ♦	57.96 ± 5.21♦
Extracto metanólico	2	9.11 ± 0.29	10.90 ± 2.88
Extracto acuoso	2	7.83 ± 0.59 *	23.42 ± 5.78

Media ± E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (*p<0.05, **p<0.0001; n=10).

Diferencias significativas comparadas con indometacina (♦p<0.0001; n=10).

Basándose en estos resultados, el recuento diferencial leucocitario y la separación cromatográfica se realizaron sólo del extracto clorofórmico, ya que éste fue el más activo. Nuestros resultados revelan que la aplicación tópica del extracto clorofórmico inhibe el desarrollo del edema en el modelo de inflamación aguda en una magnitud mayor que la indometacina (p<0.05).

Vale la pena mencionar que el extracto clorofórmico de *Senna villosa* también inhibe la inflamación asociada con la dermatitis alérgica este modelo experimental, lo que demuestra que este extracto es eficaz tanto contra la respuesta inmune innata y adaptativa.

La epidermis está expuesta a estímulos, tanto fuera como dentro del cuerpo, los cuales afectan la producción de citocinas. Las cuales tienen un impacto importante en la capacidad del cuerpo para reaccionar adecuadamente a su entorno y superar las enfermedades sistémicas. Estudios *in vivo* proporcionan importantes evidencias sobre el posible papel de las citocinas en diversas enfermedades de la piel y también permiten la evaluación de las citocinas como posibles agentes terapéuticos (Trepicchio y col., 1999). El edema inducido con TPA se utiliza rutinariamente para evaluar si los anti-inflamatorios aplicados tópicamente inhiben el desarrollo de la irritación inducida químicamente (Van Arman., 1974; Young y col., 1984; Young y col., 1983; Carlson y col., 1985; De Young., 1989; Kotyut y col., 1993; Rao y col., 1993; Tramosch y col., 1999) o la respuesta inmune adaptativa, tal como en la dermatitis alérgica (Crowle y col., 1975; Garrigue y col., 1994; Saint-Mezardy col., 2003).

Este modelo induce la hiper-proliferación celular que se observa en las enfermedades de la piel, tales como psoriasis y dermatitis atópica (Gabor 2003).

Para comprender el proceso inflamatorio inducido por TPA, y establecer el posible mecanismo de acción de los compuestos probados, es importante conocer la estructura de la piel, incluyendo su composición celular y las vías de señalización que son activadas por este agente.

9.2 Conteo diferencial leucocitario

El conteo diferencial leucocitario desarrollado en las muestras de los animales tratados con el extracto clorofórmico se muestra en la tabla 4. El tiempo cero representa la media de los leucocitos cuantificados antes de la aplicación del TPA.

Dichos valores resultaron similares a los reportados por los laboratorios de Harlan para cada tipo celular; no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos ($P > 0.05$).

Los animales correspondientes al grupo control-TPA mostraron un descenso significativo en el conteo de linfocitos y un incremento de neutrófilos, eosinófilos y basófilos a los 360 minutos.

Comparando con el tiempo cero, los animales tratados con indometacina después de la aplicación de TPA no mostraron cambios en el conteo diferencial leucocitario durante el experimento. Los animales administrados con el extracto clorofórmico exhibieron un incremento significativo en el conteo de neutrófilos y monocitos. Así como una reducción significativa de linfocitos, eosinófilos y basófilos.

La piel no sólo sirve como una barrera física y química, también es un órgano inmunológicamente competente que provoca la respuesta inmune innata y adaptativa para proteger el cuerpo. Las células de la dermis y la epidermis, incluyendo las células dendríticas dermales, células epidérmicas de Langerhans, melanocitos, queratinocitos y la migración de linfocitos, son importantes en este proceso y son conocidos por producir una gran variedad de citocinas (Gröne y col., 2000).

La inflamación de la piel comprende una plétora de reacciones fisiológicas, involucrando principalmente los vasos sanguíneos y el tejido conectivo subyacente. Esta respuesta está caracterizada por la hiperproliferación de la capa epidérmica de la piel, la cual es atribuida a la maduración prematura de los queratinocitos y a los infiltrados inflamatorios dérmicos, que comprenden células dendríticas, macrófagos y células T. El proceso inflamatorio es mantenido por las

interacciones de los tipos celulares locales, tales como las terminales nerviosas, queratinocitos, fibroblastos, mastocitos, células endoteliales y macrófagos. La inflamación inducida por la administración tópica de TPA está mediada por la proteína cinasa C (PKC) y la estimulación de la fosfolipasa A₂ y la ciclooxigenasa. Estos eventos causan la liberación de ácido araquidónico y prostaglandinas E₂ (Carlson y col., 1985; Liu y col., 1998). El TPA induce cambios en la permeabilidad vascular, en paralelo al aumento del edema, con acumulación local de los neutrófilos, monocitos y macrófagos (Loret y col., 1995) y la hiperplasia epidérmica (Bradley y col., 1982; Griffiths y col., 1988; Reynolds y col., 1997; Wang y col., 1999; Jansen y col., 2001; Hara y col., 2005). No existen reportes de cambios a nivel sistémico.

Tabla 4 Curso temporal del conteo diferencial leucocitario en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Tipo celular	Tiempo	Control-TPA	Indometacina	Extracto clorofórmico
Neutrófilos	0	54.50 ± 9.75	37.53 ± 2.91	46.72 ± 6.21
	240	34.69 ± 4.13	40.11 ± 6.84	80.72 ± 1.63 * ♦ ●
	300	38.77 ± 1.72	55.88 ± 6.99	66.32 ± 2.90 ♦
	360	91.15 ± 2.98*	40.37 ± 2.21	81.04 ± 1.95 * ♦ ●
Monocitos	0	3.17 ± 1.10	2.01 ± 0.24	1.50 ± 0.62
	240	1.23 ± 0.24	2.39 ± 0.60	1.75 ± 1.28
	300	1.23 ± 0.24	0.67 ± 0.37	5.75 ± 1.75 ♦ ●
	360	1.65 ± 0.30	3.32 ± 0.33	8.99 ± 1.76 * ♦ ●
Linfocitos	0	54.98 ± 1.24	55.37 ± 3.39	51.72 ± 6.17
	240	50.93 ± 2.53	53.75 ± 6.99	18.13 ± 1.76* ♦ ●
	300	43.00 ± 1.61	38.88 ± 6.40	30.48 ± 3.30*
	360	35.55 ± 4.25 *	54.80 ± 1.54 ♦	14.15 ± 2.04 * ♦ ●
Eosinófilos	0	0.33 ± 0.22	0.59 ± 0.07	0.58 ± 0.31
	240	1.06 ± 0.44	0.46 ± 0.14	0.12 ± 0.12
	300	1.60 ± 0.37 *	0.44 ± 0.21	0.37 ± 0.18
	360	2.21 ± 0.41 *	0.55 ± 0.12 ♦	0.12 ± 0.12 ♦
Basófilos	0	0.65 ± 0.25	0.38 ± 0.21	0.27 ± 0.18
	240	63.02 ± 4.69 *	0.59 ± 0.26 ♦	0.12 ± 0.12 ♦
	300	58.45 ± 1.85 *	2.13 ± 1.89 ♦	0
	360	53.54 ± 2.45 *	0.10 ± 0.10 ♦	0

Media ± E.S.M, ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey's
Diferencias significativas comparadas con el tiempo cero (*p<0.05; n=10).

Diferencias significativas comparadas con Control – TPA (♦p <0.05; n=10).

Diferencias significativas comparadas con indometacina (● p <0.05; n=10).

El crecimiento y la diferenciación de los queratinocitos epidérmicos han demostrado ser regulados por PKC (Jetten y col., 1989; Dlugosz y col., 1993). Alternativamente, los mediadores liberados por queratinocitos podrían afectar la señalización de los receptores acoplados a proteínas G y otras células dérmicas que participan en la atracción y extravasación de neutrófilos. En este modelo, algunos mediadores importantes participan en la reacción inflamatoria y el TPA

parece inducir la expresión de citocinas proinflamatorias en los queratinocitos (Wilmer y col., 1994; Redondo y col., 1997). Estos datos fueron confirmados *in vitro* por Murakama y col. (2006), mostrando que la aplicación de TPA a queratinocitos humanos da como resultado un aumento en la cantidad de TNF- α .

A través del conteo diferencial leucocitario fue posible establecer el efecto sistémico causado por la aplicación tópica de TPA en las orejas de los ratones. Además, esta técnica permitió establecer la correlación de los cambios de los diferentes leucocitos con los diversos mediadores inflamatorios implicados en este modelo experimental.

Las citocinas liberadas al sitio de la inflamación facilitan, tanto la adherencia de las células del sistema inmune al endotelio vascular como su migración a través de la pared de los vasos sanguíneos hacia los tejidos. Esto se ve reflejado en los resultados obtenidos en el recuento diferencial de leucocitos.

Los animales control tratados con TPA mostraron una disminución significativa en los linfocitos y aumento de los neutrófilos, eosinófilos y basófilos en 360 min. Muchos tipos de leucocitos se mueven de una parte del cuerpo a otra. Los linfocitos circulan continuamente en la sangre y la linfa, y otros tipos de leucocitos migran hacia los tejidos lesionados. Los linfocitos son capaces de un notable nivel de recirculación, se mueven continuamente a través de la sangre y la linfa a los diversos órganos linfoides. Esta recirculación de los linfocitos podría explicar la disminución observada después de la administración de TPA.

El sitio de la lesión también atrae granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) que migran hacia el tejido inflamado. Esto explica el aumento de estos leucocitos; que a su vez inducen la liberación de citocinas y mediadores inflamatorios creando

así un sistema de retroalimentación complejo. El resultado es un influjo de los linfocitos, neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos y mastocitos al sitio del daño tisular, donde estas células participan en la reparación del tejido. Los procesos de adhesión leucocitaria son de gran importancia en la respuesta inflamatoria. El comportamiento de estos leucocitos nos permite entender y correlacionar otros mediadores inflamatorios que están estrechamente relacionados.

Estos resultados nos permiten establecer los tiempos apropiados para la cuantificación de mediadores inflamatorios a nivel sistémico, tales como histamina, serotonina, enzimas lisosomales, prostaglandinas, leucotrienos, factor activador de plaquetas, especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y citocinas; los cuales mantienen una estrecha relación con los cambios leucocitarios en la sangre.

Para poder dilucidar el mecanismo de acción antiinflamatorio a nivel sistémico (en el suero) y local (en el tejido auricular), se propone la cuantificación de estrés oxidante (óxido nítrico total) y la cuantificación de citocinas (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10 e IL-12, PGE₂ y la COX-2) entre los 240 y 360 min después de la administración del TPA (la figura 3 describe esta idea).

Dada la estructura y la composición de la piel de las orejas de los ratones, sabemos que las principales células estimuladas después de la aplicación de TPA son los queratinocitos y mastocitos, sin embargo, algunas de las citocinas identificadas son producidas por los queratinocitos, otras son constitutivas y otras son liberadas tras la inducción por diversos estímulos.

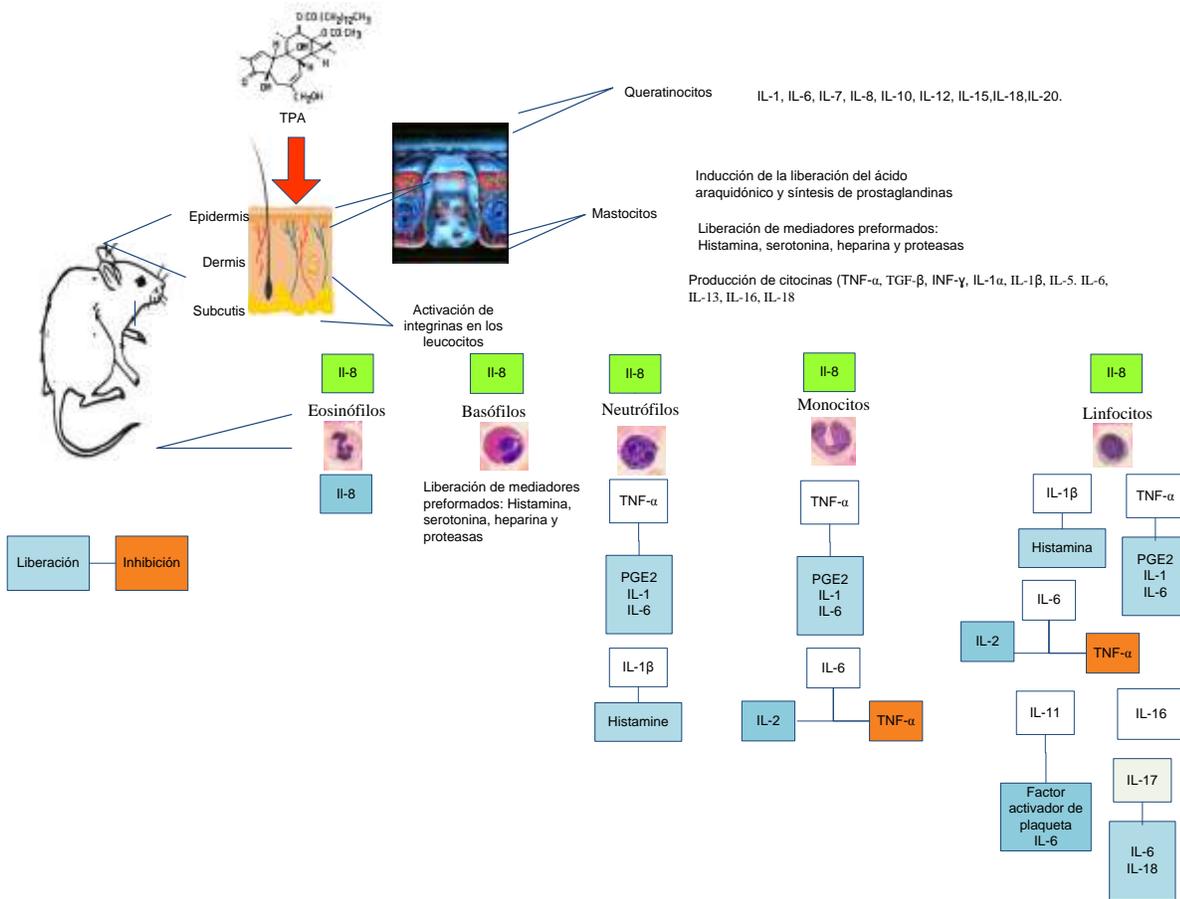


Figura 3 Mediadores inflamatorios liberados después de la aplicación de TPA.

La producción de citocinas por los queratinocitos tiene múltiples consecuencias para la migración de las células inflamatorias, que pueden tener efectos sistémicos sobre el sistema inmune, factores que influyen en la proliferación de queratinocitos en los procesos de diferenciación, y, finalmente, afectan la producción de otras citocinas por los queratinocitos. El sitio de la lesión también atrae granulocitos que migran al tejido inflamado (Palfrerman y col., 2013); que a su vez inducen la liberación de mediadores inflamatorios tipo citocinas y creando así un sistema de retroalimentación compleja.

9.3 Fraccionamiento del extracto clorofórmico.

Basados en el hecho de que el extracto clorofórmico fue el que presentó mayor efecto antiinflamatorio, se realizó la separación cromatográfica obteniendo 9 fracciones. En las fracciones 2 y 3, se observó la presencia de un precipitado blanco el cual fue filtrado y purificado. En la tabla 5 presentamos los rendimientos obtenidos de dichas fracciones.

Tabla 5 Rendimiento de las diferentes fracciones obtenidas tras la separación cromatográfica del extracto clorofórmico de *Senna villosa*.

Fracción	Rendimiento (g)
1	0.063
2	0.075
3	0.1803
4	0.0116
5	0.0666
6	0.0972
7	0.5751
8	0.3659
9	0.1279
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	0.1874

9.4 Efecto antiinflamatorio de las fracciones.

Las orejas que sólo recibieron TPA y vehículo (control-TPA) desarrollaron un edema de 12.18 ± 0.68 mg después de 6 h de la aplicación del TPA (Tabla 6).

Las orejas tratadas con TPA e indometacina (2 mg/oreja) mostraron una reducción significativa del edema de $43.90\% \pm 5.81\%$ (6.83 ± 0.70 mg).

Aunque las nueve fracciones obtenidas a partir del extracto de cloroformo no mostraron disminución significativa del edema, la mayoría mostró una tendencia a reducir el edema. De las nueve fracciones, la fracción 4 exhibió la mayor tendencia, con 28.90 ± 4.82 de porcentaje de inhibición del edema, sin embargo, al igual que con las otras 8 fracciones, la diferencia con respecto al control no fue significativa ($p > 0.05$).

La composición química de los extractos de plantas medicinales es muy variada, y diferentes estudios químicos muestran la presencia de más de un compuesto con diversas propiedades farmacológicas de interés. El extracto clorofórmico de *Senna villosa* contiene varios compuestos no identificados que pueden tener actividad sinérgica. De hecho, la mayoría de las nueve fracciones obtenidas a partir *Senna villosa*, que pueden contener diferentes tipos de compuestos que, al administrarse juntos, podrían presentar efecto antiinflamatorio significativo.

Es claro que la administración de todos los compuestos juntos contenidos en el extracto de cloroformo, presenten mejor actividad que la indometacina y el precipitado de color blanco. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren un efecto sinérgico probable entre estos diferentes compuestos químicos presentes en el extracto clorofórmico de *Senna villosa*.

Tabla 6 Evaluación del efecto antiinflamatorio de las nueve fracciones y del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Fracción	Dosis administrada tópicamente (mg/oreja)	Edema (mg)	% de inhibición
Control	Control-TPA	12.18 ± 0.68	—
Indometacina	2	6.83 ± 0.70 *	43.90 ± 5.81
1	2	11.46 ± 0.63	5.91 ± 5.42
2	2	9.18 ± 0.79	24.63 ± 6.55
3	2	10.10 ± 0.88	17.08 ± 7.29
4	2	8.66 ± 0.58	28.90 ± 4.82
5	2	10.16 ± 0.66	16.58 ± 5.45
6	2	9.51 ± 0.91	24.88 ± 7.51
7	2	10.05 ± 0.49	17.49 ± 4.05
8	2	10.98 ± 0.47	9.82 ± 3.93
9	2	11.13 ± 0.35	8.66 ± 2.94
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	2	6.30 ± 0.93 *	48.28 ± 7.64

Media ± E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (*p<0.001; n=10)

El precipitado blanco aislado a partir de las fracciones 2 y 3 fue activo, mostrando un porcentaje de inhibición del edema de 48.28 ± 7.64 (con un peso 6.30 ± 0.93 mg). El precipitado blanco se sometió a una curva dosis respuesta. Las dosis ensayadas fueron 0,5, 1 y 2 mg/oreja (datos no mostrados). Todas las dosis mostraron inhibición del edema ($p < 0.05$). La dosis con la que se observó mayor actividad fue de 2 mg/oreja. Por esta razón, esta dosis se eligió para continuar los experimentos con el precipitado blanco.

9.5 Elucidación estructural

9.5.1 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

El análisis de RMN de ^1H y ^{13}C , los espectros de RMN, DEPT (135) y gradiente- (COSY, HSQC, HMBC) (figura 4 y tabla 7) el espectro de ^{13}C mostró un δ 173.85 confirmando la presencia del grupo carbonilo del éster, una señal con δ 64.3 que corresponde al carbono adyacente y una señal δ 31.85 correspondiente al carbono adyacente al del grupo carbonilo

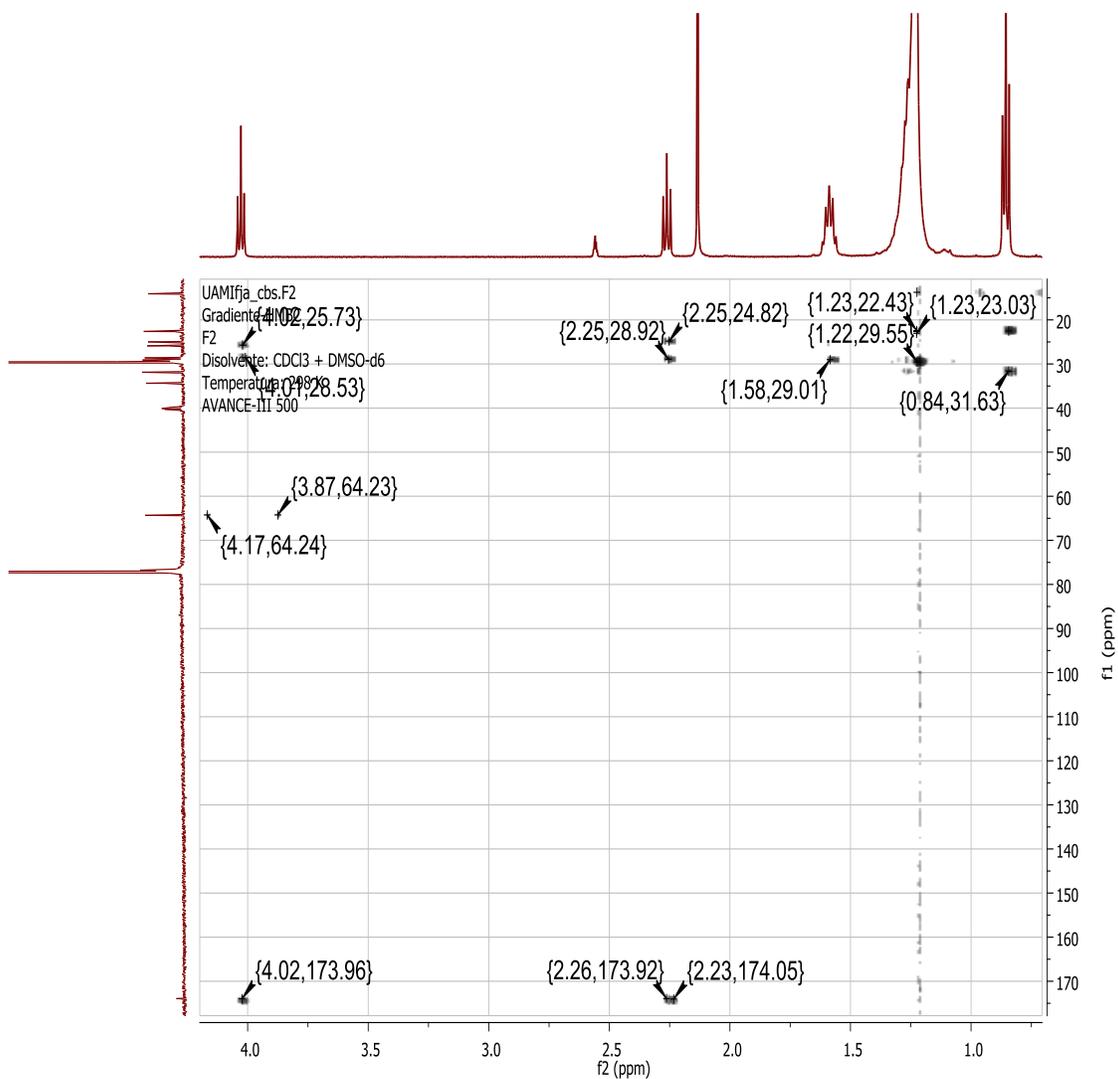


Figura 5 Espectro de RMN de gradiente – HMBC del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa*.

Tabla 7 A partir de los espectros de ^1H , ^{13}C , COSY, HSQC Y HMBC se asignaron las siguientes correlaciones a partir de los desplazamientos químicos observados.

^1H Multiplicidad	^1H Integración	^1H δ (ppm)	Grupo asignado	^{13}C δ (ppm)
(t)	3H	0.88	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	14.02
(t)	3H	0.90	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-}$	14.07
(m)	28	1.254 a 1.37	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	34.399 31.913 31.722 29.668 29.639 29.595 29.466 29.344 29.268 29.157 25.894 25.028 22.674 22.562
(m)	4	1.61	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(=O)-}$ $\text{-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	28.91 28.66
(t)	2	2.28	$\text{-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	31.85
(t)	2	4.06	$\text{-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	64.350
—	—	—	$\text{-C(=O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	173.937

9.5.2 Espectroscopia Infrarroja (ATR-FTIR)

La presencia del grupo éster en las estructuras propuestas se confirmaron con el Espectro de ATR-FTIR del precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3 del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa*. (Figura 5 y tabla 8); la banda intensa correspondiente a 1729.632 cm^{-1} se asocia con el alargamiento del grupo carbonilo, la presencia de dos bandas intensas en 1171.6862 con la presencia del grupo alquilo.

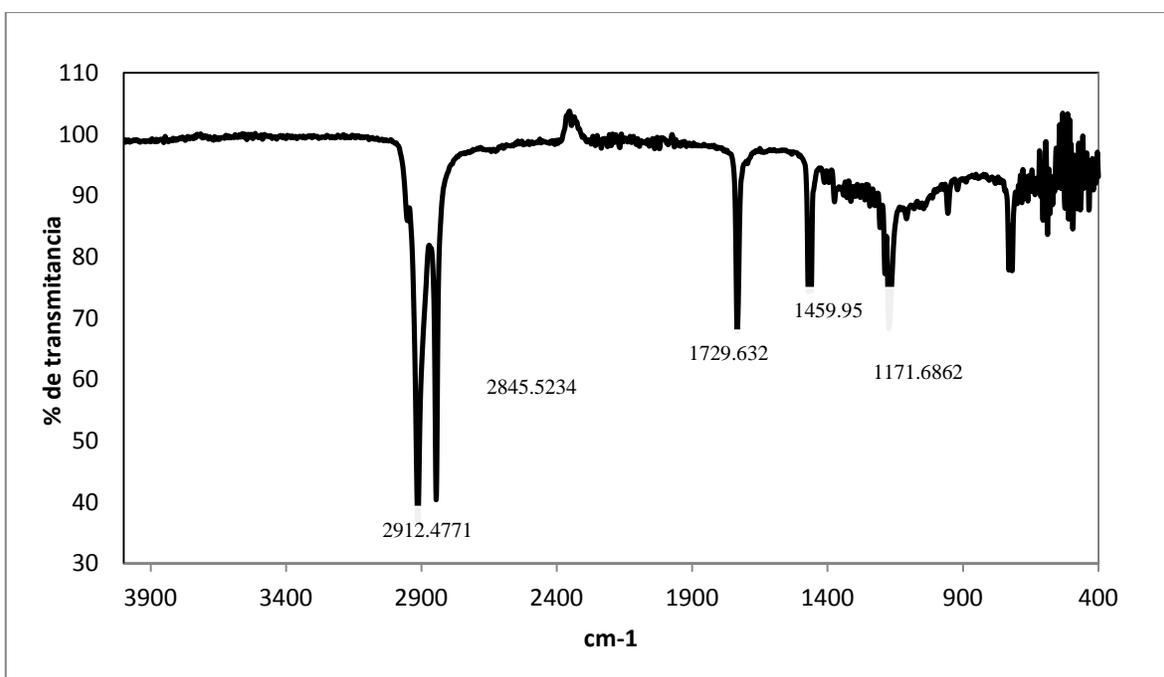


Figura 6 Espectro de ATR-FTIR del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa*.

Tabla 8 Asignación de los grupos funcionales con base en la banda de absorción cm^{-1} del espectro ATR-FTIR del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa*.

Banda de absorción cm^{-1}	Grupo asignado
2912.4771	CH_3
2845.5234	CH_2
1729.632	
1459.95	CH_3

9.5.3 Espectrometría de masas de alta resolución (ionización por electroespray).

En la figura 7 se observa el espectro de masas de alta resolución con ionización por electroespray del precipitado blanco purificado en el modo de ion negativo. Se observa la presencia de tres iones moleculares $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 113.0289, 265.2494 y 325.3099, siendo este último el que se encontró en mayor proporción. En la figura 8 se observa el espectro de masas de alta resolución con ionización por electroespray del ión molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 325.3099 (ion mayoritario del precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3) en el modo de ion negativo en el cual se observa la formación de tres iones moleculares más; $[\text{M}-\text{H}]^-$ m/z 297.2587,

311.2890, 339.3308; para los cuales se proponen las siguientes estructuras (tabla 9).

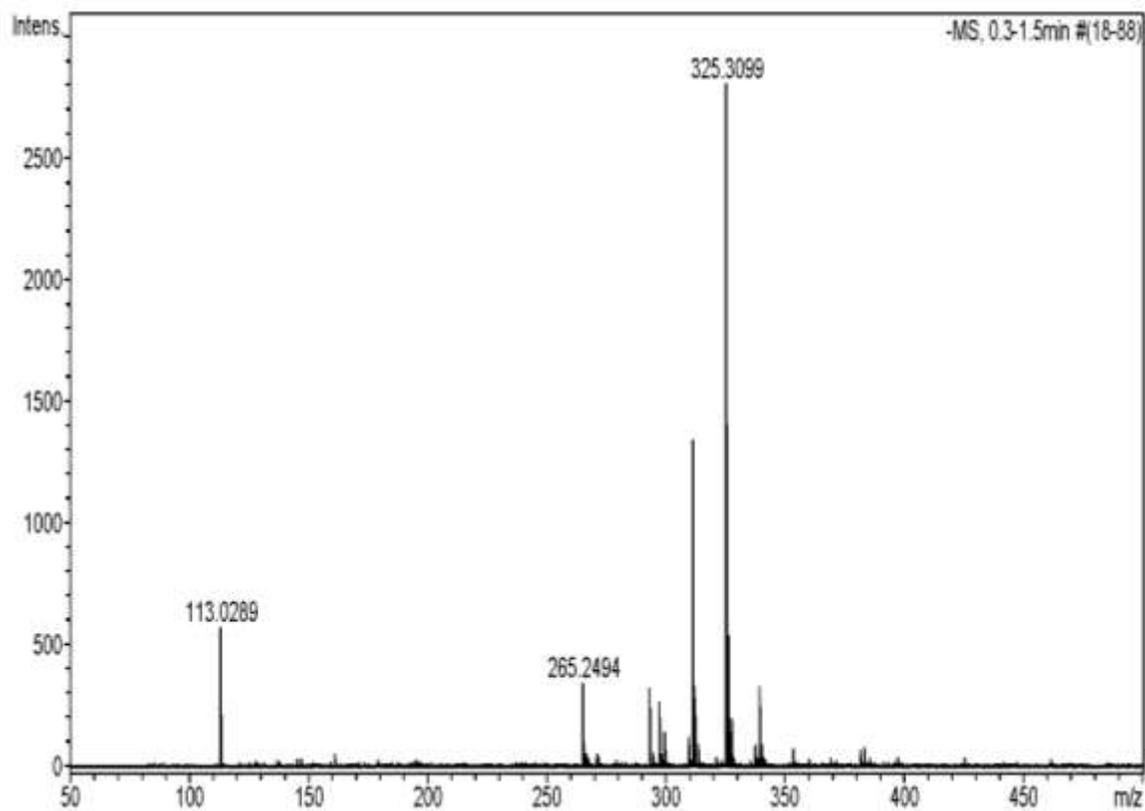


Figura 7 Espectro de masas de alta resolución con ionización por electroespray del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 en el modo de ion negativo.

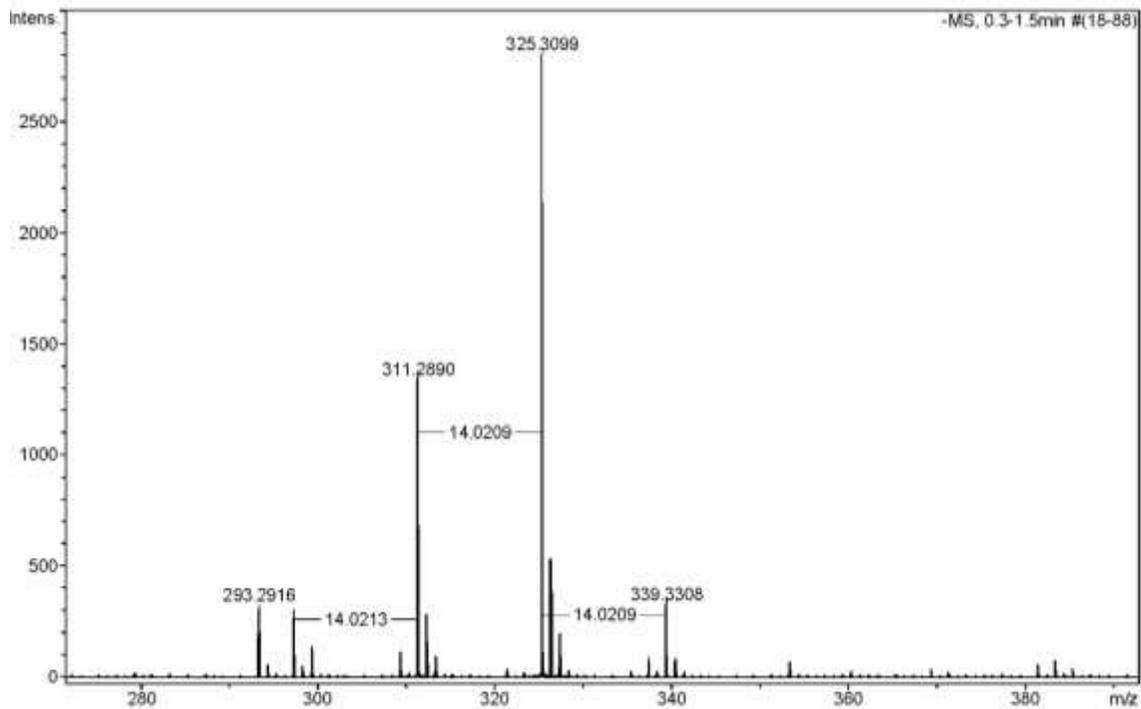


Figura 8 Espectro de masas de alta resolución con ionización por electroespray del ion molecular $[M-H]^-$ m/z 325.3099 (ion mayoritario del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3) en el modo de ion negativo.

Tabla 9. Ion molecular, fórmula molecular y estructura molecular de los componentes principales del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de las hojas de *Senna villosa*.

Ion molecular	Fórmula química	Estructura molecular
311.2890	$C_{20}H_{40}O_2$	tetradecanoato de hexilo
325.3099	$C_{21}H_{42}O_2$	tetradecanoato de heptilo
339.3308	$C_{22}H_{44}O_2$	tetradecanoato de octilo

9.6 Determinación de la acción antiinflamatoria de la mezcla de compuestos activos

9.6.1 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos activos en el modelo de edema auricular inducido con TPA en animales sham y adrenalectomizados.

Para poder determinar un posible mecanismo de acción antiinflamatoria del precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3, se llevó a cabo la adrenalectomía de los animales empleados para la evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido por TPA.

En la tabla 10 y 11 mostramos los resultados obtenidos del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3 en animales sham y adrenalectomizados (respectivamente).

Las glándulas suprarrenales cumplen múltiples funciones en el organismo, destacaremos la función inmunológica y antiinflamatoria, las cuales sabemos están íntimamente ligadas.

Las funciones inmunológicas están reguladas por los glucocorticoides, éstas incluyen acciones directas, tanto sobre los linfocitos B como los T, inhibiendo la síntesis de inmunoglobulinas y estimulando la apoptosis linfocitaria. El NF- κ B juega un rol crucial generalizado induciendo la transcripción de genes de citocinas.

Los glucocorticoides se unen directamente al NF- κ B para evitar su translocación nuclear, además, inducen la producción del inhibidor del NF- κ B en el citoplasma inactivándolo. Los efectos antiinflamatorios adicionales incluyen inhibición de la diferenciación de los monocitos en macrófagos y la fagocitosis de los macrófagos, así como su actividad citotóxica.

Los glucocorticoides reducen la respuesta inflamatoria local al evitar la acción de la histamina y de los activadores del plasminógeno. La síntesis de prostaglandinas se ve disminuida a través de la inducción de lipocortinas que inhiben la actividad de la fosfolipasa A_2 . Los glucocorticoides tienen una potente acción antiinflamatoria, sea cual sea la causa de la inflamación (química, física, inmunológica), además afectan tanto las manifestaciones inmediatas (hinchazón, calor, rubor, dolor, pérdida de función) como tardías (cicatrización y proliferación celular), pero no afectan a la causa sino al síntoma. La reacción biológica tiene lugar a nivel celular inhibiendo la biosíntesis y la liberación de las prostaglandinas. Se produce una inhibición de la fosfolipasa A_2 (mediada por una lipocortina) por lo que disminuye el factor liberador de plaquetas y los eicosanoides.

Los glucocorticoides actúan en cada una de las tres fases del proceso inflamatorio (vascular, celular y de reparación) y reducen las manifestaciones clínicas (fiebre, enrojecimiento, edema y dolor). Sobre la fase vascular actúan disminuyendo la vasodilatación y la permeabilidad endotelial, con una baja de la secreción de sustancias vasoactivas, tales como serotonina o histamina (produciendo una disminución de la fracción de complemento y una inhibición de la fosfolipasa A_2). Sobre la fase celular inhibe la síntesis y liberación de los mediadores de la inflamación (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxanos). Y sobre la fase de reparación disminuye la afluencia de macrófagos y granulocitos sobre la zona inflamatoria, aunque dichos corticosteroides inhiben la formación de los fibroblastos, el tejido de granulación y el depósito de la sustancia fundamental del tejido conectivo, retardando así el proceso de cicatrización (Gallin y col., 1992).

Los animales del grupo control-TPA adrenalectomizados mostraron un incremento significativo con respecto a los animales del grupo control-TPA sham. Tanto la indometacina como el precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3 mostraron actividad antiinflamatoria en ambas condiciones experimentales (animales sham y adrenalectomizados). Al inhibir la producción de los glucocorticoides e inducir el proceso inflamatorio y analizar que sucede en la etapa vascular y celular del proceso inflamatorio trataremos de establecer un posible mecanismo de acción.

Razón por la cual se realizó la cuantificación de citocinas y mediadores inflamatorios (TNF- α , IL-6 y óxido nítrico) a nivel local y sistémico. Finalmente se revisó la arquitectura histológica de la zona lesionada (las orejas de los ratones).

Tabla 10 Evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en animales sham en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Grupo	Dosis tópica /oreja (mg)	Edema (mg)	% de inhibición
Control – TPA	Vehículo	11.00 ± 0.32	-----
Indometacina	2	4.37 ± 0.53 **	60.22 ± 4.84
Precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3	2	6.00 ± 0.61 **	45.45 ± 5.61

Media ± E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (**p<0.0001; n=10)

Tabla 11 Evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en animales adrenalectomizados en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Grupo	Dosis tópica /oreja (mg)	Edema (mg)	% de inhibición
Control – TPA	Vehículo	12.00 ± 1.43	-----
Indometacina	2	4.60 ± 0.56 **	47.41 ± 4.68
Precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3	2	6..25 ± 0.67 **	5.62 ± 6.01

Media ± E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (**p<0.0001; n=10).

9.6.2 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en suero.

Las concentraciones de TNF- α en el suero de los animales del grupo sham incrementaron de forma significativa en el grupo control-TPA en relación con la concentración obtenida de los animales sanos (tabla 12). Tanto la indometacina como el precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3 no permitieron el incremento de esta citocina, reduciendo sus concentraciones de manera significativa con respecto a los valores obtenidos del grupo control-TPA (tabla 12).

Tabla 12 Cuantificación de TNF- α en el suero de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales Sham).

Grupo	TNF- α [pg/ μ L]
Sano	64.50 \pm 3.33
Control – TPA	95.75 \pm 4.14*
Indometacina	75.21 \pm 4.51 [•]
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	68.83 \pm 3.01 [•]

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Diferencias significativas comparadas con el sano (*p<0.05; n=5).

Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA ([•]p<0.05; n=5).

En los animales adrenalectomizados podemos observar que no existe diferencia significativa en las concentraciones de TNF- α entre los diferentes tratamientos (Tabla 13).

Tabla 13 Cuantificación de TNF- α en el suero de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales adrenalectomizados).

Grupo	TNF-α [pg/μL]
Sano	64.50 \pm 3.33
Control – TPA	72.28 \pm 3.66
Indometacina	70.50 \pm 6.92
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	73.79 \pm 5.18

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey (n=5).

No se observaron diferencias significativas en la cuantificación de IL-6 en los diferentes grupos de los animales sham, aunque se observa tendencia al incremento de esta citocina. Se sugiere incrementar el número de muestras para obtener un resultado contundente (Tabla 14).

Tabla 14 Cuantificación de IL-6 en el suero de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales sham).

Grupo	IL-6 [pg/μL]
Sano	21.78 \pm 2.22
Control – TPA	42.33 \pm 8.27
Indometacina	56.67 \pm 9.29
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	55.67 \pm 12.51

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. (n=5)

En el caso de los animales adrenalectomizados el grupo tratado con el precipitado blanco mostró un incremento significativo en la concentración de IL-6 (62.61 \pm 9.00 pg/ μ L) con respecto a la concentración observada en los animales sanos (21.78 \pm 2.22 pg/ μ L) (Tabla 15).

Tabla 15 Cuantificación de IL-6 en el suero de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales adrenalectomizados)

Grupo	IL-6 [pg/ μ L]
Sano	21.78 \pm 2.22
Control – TPA	45.00 \pm 4.13
Indometacina	35.25 \pm 4.81
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	62 .61 \pm 9.00*

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el sano (* $p < 0.05$; $n = 5$).

Las concentraciones de óxido nítrico en los animales sham y adrenalectomizados se incrementaron significativamente en los animales del grupo control-TPA e indometacina, mientras que el precipitado blanco, mantuvo concentraciones similares a las de los animales sanos (tabla 16 y 17)

Tabla 16 Cuantificación de óxido nítrico en el suero de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales sham).

Grupo	Oxido nítrico [pg/ μ L]
Sano	23.62 \pm 4.25
Control – TPA	64.25 \pm 3.98*
Indometacina	60.66 \pm 5.72*
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	46.13 \pm 5.86

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el sano (* $p < 0.05$; $n = 5$)

Tabla 17 Cuantificación de óxido nítrico en el suero de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales adrenalectomizados)

Grupo	Oxido nítrico [pg/ μ L]
Sano	23.62 \pm 4.25
Control – TPA	44.36 \pm 3.24*
Indometacina	48.44 \pm 6.82*
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	32.78 \pm 3.23

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el sano (* $p < 0.05$; $n = 5$)

9.6.3 Cuantificación de TNF- α , IL-6 y óxido nítrico en el tejido auricular.

Las concentraciones de TNF- α obtenidas del tejido auricular de los animales sham, posterior al proceso inflamatorio inducido con TPA, muestran un descenso significativo con respecto a los valores de los animales sanos y no se observó diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos (Tabla 18).

Tabla 18 Cuantificación de TNF- α en el tejido auricular de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales Sham).

Grupo	TNF- α [pg/ μ L]
Sano	256.7 \pm 33.89
Control – TPA	169.5 \pm 4.55*
Indometacina	182.0 \pm 19.6*
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	168.5 \pm 9.01*

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el sano (* $p < 0.05$; $n = 5$).

En el caso de los animales adrenalectomizados, la concentración de TNF- α de los animales del grupo control-TPA se disminuye de manera significativa, mientras que en los animales tratados con indometacina y el precipitado blanco no se incrementan durante el proceso inflamatorio (Tabla 19).

Tabla 19 Cuantificación de TNF- α en el tejido auricular de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales adrenalectomizados).

Grupo	TNF- α [pg/ μ L]
Sano	256.7 \pm 33.89
Control – TPA	168.7 \pm 2.20*
Indometacina	204.2 \pm 1.43 [•]
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	206.2 \pm 12.97 [•]

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Diferencias significativas comparadas con el sano (*p<0.05; n=5).

Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA ([•]p<0.05; n=5).

Las concentraciones de IL-6 en el tejido de los animales sham se ven incrementadas de manera significativa con respecto a las observadas en los animales sanos (tabla 20). Sin embargo, en los animales tratados con indometacina y el precipitado blanco, respectivamente, disminuye la concentración de esta citocina de forma significativa comparando con los valores del grupo control-TPA. El mismo comportamiento se observa en los animales adrenalectomizados (tabla 21)

Tabla 20 Cuantificación de IL-6 en el tejido auricular de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales sham)

Grupo	IL-6 [pg/ μ L]
Sano	229.0 \pm 27.10
Control – TPA	2164.0 \pm 184.0*
Indometacina	844.6 \pm 72.36* •
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	903.0 \pm 49.58 **

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el sano (*p<0.05; n=5). Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (•p<0.05; n=5).

Tabla 21 Cuantificación de IL-6 en el tejido auricular de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales adrenalectomizados).

Grupo	IL-6 [pg/ μ L]
Sano	229.0 \pm 27.10
Control – TPA	2285.0 \pm 511.2*
Indometacina	1010.0 \pm 154.0*•
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	926.9 \pm 196.5*•

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el sano (*p<0.05; n=5). Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (•p<0.05; n=5).

La concentración de óxido nítrico en el tejido auricular de los animales sham no incrementó en los animales del grupo control-TPA con respecto a los animales sanos. Los animales tratados con indometacina mostraron un incremento significativo (39.95 ± 4.91 pg/ μ L) con respecto a los animales sanos (16.89 ± 2.03 pg/ μ L) y al control-TPA (17.23 ± 1.03 pg/ μ L), mientras que la concentración de los animales tratados con el precipitado blanco disminuye de forma significativa (5.31 ± 1.40 pg/ μ L) en comparación con los que recibieron indometacina (Tabla 22).

En los animales adrenalectomizados las concentraciones de óxido nítrico con indometacina y el precipitado blanco no presentaron diferencias significativas con respecto a los valores de los animales sanos (tabla 23).

Tabla 22 Cuantificación de óxido nítrico en el tejido auricular de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales sham).

Grupo	Oxido nítrico [pg/ μ L]
Sano	16.89 \pm 2.03
Control - TPA	17.23 \pm 1.03
Indometacina	39.95 \pm 4.91**●
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	5.31 \pm 1.40***♦

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Diferencias significativas comparadas con el sano (*p<0.05; n=10).

Diferencias significativas comparadas con el Control-TPA (♦p<0.05; n=10).

Diferencias significativas comparadas con indometacina (●p<0.05; n=10).

Tabla 23 Cuantificación de óxido nítrico en el tejido auricular de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio del precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el modelo de edema auricular inducido con TPA (animales adrenalectomizados).

Grupo	Oxido nítrico [pg/ μ L]
Sano	16.89 \pm 2-03
Control - TPA	26.79 \pm 3.24*
Indometacina	16.58 \pm 2.80●
Precipitado blanco obtenido de las fracciones 2 y 3	12.67 \pm 1.30●

Media \pm E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey.

Diferencias significativas comparadas con el Control - TPA (♦p<0.05; n=10).

8.6.4 Análisis histológico

En la figura 9 podemos observar de forma cualitativa las modificaciones histológicas que presentaron los animales después de la administración del TPA así como de los tratamientos con indometacina y el precipitado blanco (adrenalectomizados y sham).

En los animales adrenalectomizados se observó que: el grupo control-TPA desarrolló un proceso de dilatación vascular y edema acentuado; el infiltrado leucocitario fue menor. Los animales tratados con indometacina y el precipitado blanco desarrollaron un edema e infiltración leucocitaria menor.

Los animales sham, del grupo control-TPA se observaron con un edema menor y amplio infiltrado leucocitario, mayor que en el correspondiente adrenalectomizado.

En los animales tratados con indometacina y el precipitado blanco se observó una disminución del edema, se apreciaron zonas de resolución así como un abundante infiltrado leucocitario. La abundancia de la infiltración leucocitaria en los animales sham se atribuye al efecto antiinflamatorio de las glándulas adrenales.

La presencia de proliferación celular así como el aumento de la agregación y adhesión de los leucocitos (neutrófilos principalmente) a las paredes de los vasos así como cambios en la permeabilidad vascular, en paralelo al aumento del edema y la hiperplasia epidérmica está documentado (Bradley y col., 1982; Griffiths y col., 1988; Reynolds y col., 1997; Wang y col., 1999; Jansen y col., 2001; Hara y col., 2005). Finalmente los animales tratados con el precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en ambas condiciones experimentales (animales adrenalectomizado y sham) favorecen el proceso de agregación y adhesión leucocitaria para detener el proceso inflamatorio.

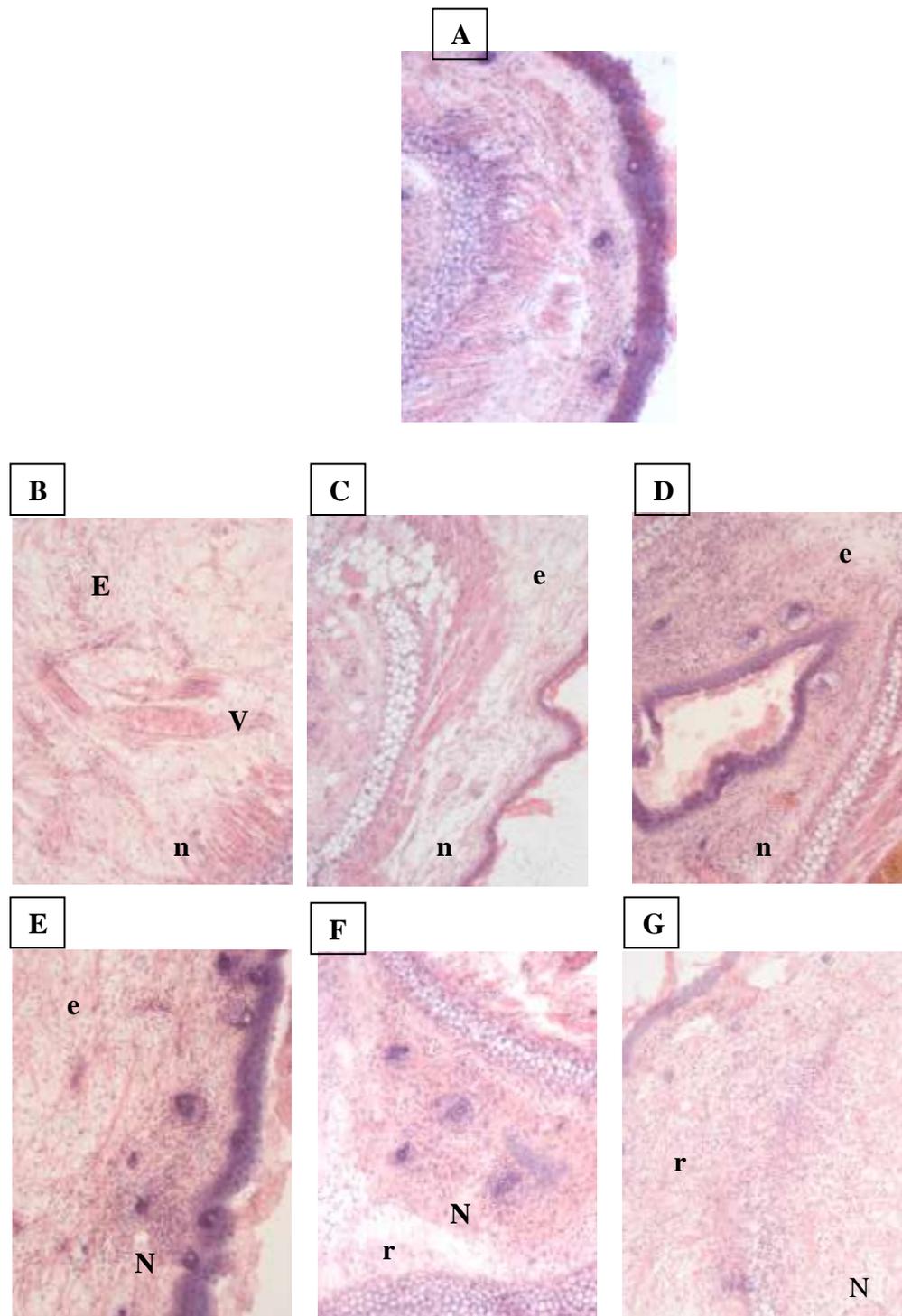


Figura 9 Secciones longitudinales de las orejas de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido por TPA. A. Sano; B. control-TPA, C. Indometacina, D. Precipitado blanco (ADRENALECTOMIZADOS); E. control-TPA, F. Indometacina, G. Precipitado blanco (SHAM). E. edema amplio, e. edema menor, V. vasodilatación mayor, N. infiltrado leucocitario abundante, n. infiltrado leucocitario escaso, r. proceso de resolución menor (H-E, aumento original X100).

En la figura 10 se muestran foto micrografías de secciones longitudinales de las orejas de los ratones de los diferentes grupos. Se indica el espesor de la epidermis después de la administración del TPA así como de los tratamientos con indometacina y el precipitado blanco (adrenalectomizados y sham).

En los animales adrenalectomizados se observó que los animales tratados con el precipitado blanco no presentaron diferencia significativa con respecto al grupo control-TPA en el espesor de la epidermis, mientras que los que recibieron indometacina presentaron un incremento del mismo. En los animales sham tratados con indometacina y el precipitado blanco se observó un descenso significativo del espesor de la epidermis con respecto al control-TPA. Estos resultados los podríamos correlacionar con el estímulo del TPA sobre la epidermis y la influencia de éste sobre los mastocitos.

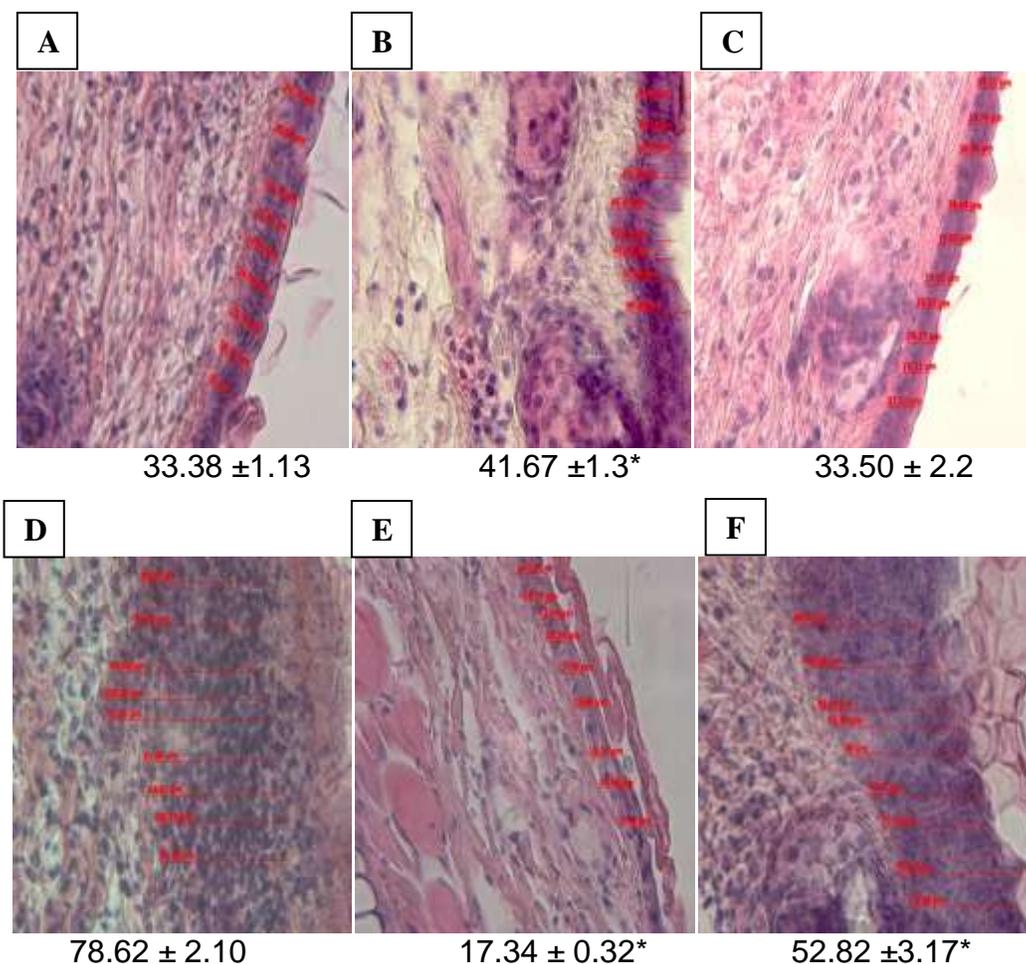


Figura 10 Secciones longitudinales de las orejas de los animales empleados en la evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido por TPA. A. control-TPA, B. Indometacina, C. Precipitado blanco (ADRENALECTOMIZADOS); D. control-TPA, E. Indometacina, F. Precipitado blanco (SHAM). Los valores representan la media \pm E.S.M. del espesor de la dermis. Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA ($p < 0.05$; $n=1$) (H-E. aumento original X100).

9.7 Síntesis orgánica de los compuestos activos.

Tras la identificación de los componentes mayoritarios del precipitado blanco obtenido de la fracción 2 y 3 del extracto clorofórmico de *Senna villosa* se decidió proponer una ruta de síntesis para la obtención del tetradecanoato de hexilo, tetradecanoato de heptilo y tetradecanoato de octilo; así como una serie de ésteres derivados del ácido mirístico y palmítico; ya que de ninguno de estos compuestos ha sido reportado su efecto antiinflamatorio.

Se emplearon diferentes métodos de síntesis de ésteres como: la esterificación de Fisher, uso de agentes acoplantes (cloroformato de etilo con trietilamina; cloruro de fosforilo con trietilamina) y reacción en seco en microondas.

La síntesis por el método de Fisher no fue satisfactoria, pues no se observó la producción del éster correspondiente.

Mientras que con el uso de agentes acoplantes si se logró la obtención del éster correspondiente; sin embargo estos ésteres no pudieron ser purificados por diferentes métodos (cristalización, cromatografía en columna y en placa preparativa). Se observaba la presencia del alcohol y del ácido carboxílico correspondiente, así como la presencia de contaminantes.

Finalmente en la reacción del ácido dodecanoico y heptanol que se llevó a cabo sin disolventes empleando un horno de microondas como fuente de calentamiento, se observó la producción del éster correspondiente, así como la presencia del alcohol, y actualmente se está trabajando en la eliminación de este, para llevar a cabo la síntesis de los otros ésteres.

9.8 Evaluación del efecto antiinflamatorio de los compuestos sintetizados.

Se evaluó el efecto antiinflamatorio de los alcoholes y ácidos carboxílicos correspondientes para la obtención de los diferentes esteres de interés; ya que ninguno de ellos contaba con reportes de su efecto antiinflamatorio. Así como del dodecanoato de heptilo (éster sintetizado sin purificar).

Los alcoholes (heptanol y nonanol) así como los ácidos carboxílicos (mirístico y palmítico) mostraron un descenso significativo en el desarrollo del edema con respecto al control (Tabla 24); el ácido dodecanoico no logró disminuir el desarrollo del edema, sin embargo el dodecanoato de heptilo (éster sintetizado sin purificar) si mostró un descenso significativo en el desarrollo del edema.

Se propone seguir trabajando en la síntesis de los otros esteres y en un método de purificación para su apropiada evaluación farmacológica, ya que observamos que aún cuando el éster impuro fue evaluado éste presentó una actividad semejante a la que presentó la indometacina.

Por esta razón resulta interesante la evaluación de los diferentes esteres derivados de los respectivos ácidos carboxílicos (palmítico, láurico y mirístico) así como de los diferentes alcoholes (heptanol y nonanol) y poder establecer una posible correlación de las variaciones de longitud de cadenas de estos compuestos, con su efecto antiinflamatorio.

Tabla 24 Efecto antiinflamatorio en el modelo de edema auricular inducido con TPA de los diferentes reactivos (alcohol y ácido carboxílico) y los ésteres correspondientes.

Grupo	Dosis tópica /oreja (mg)	Edema (mg)	% de inhibición
Control – TPA	Vehículo	11.49 ± 0.56	-----
Indometacina	2	7.10 ± 0.19 **	38.15 ± 1.70
Heptanol	2	7.65 ± 0.38 **	33.36 ± 3.39
Nonanol	2	6.25 ± 0.64**	45.33 ± 5.61
Ácido dodecanoico (láurico)	2	9.87 ± 0.78	13.98 ± 6.81
Ácido tetradecanoico (mirístico)	2	7.50 ± 1.19**	34.66 ± 10.36
Ácido hexadecanoico (palmítico)	2	7.60 ± 0.50**	33.79 ± 4.44
Dodecanoato de heptilo	2	8.14 ± 0.52*	29.09 ± 4.57

Media ± E.S.M. ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Diferencias significativas comparadas con el Control – TPA (*p<0.05, **p<0.0001; n=10).

10 Conclusiones

El extracto clorofórmico de hojas de *Senna villosa* tiene propiedades anti-proliferativas y anti-inflamatorias.

Dichas propiedades se deben en parte a la presencia de tres ésteres alifáticos: tetradecanoato de hexilo ($C_{20}H_{40}O_2$), tetradecanoato de heptilo ($C_{21}H_{42}O_2$) y tetradecanoato de octilo ($C_{22}H_{44}O_2$).

Este es el primer reporte de la presencia de dichos compuestos en *Senna villosa*.

La mezcla de ésteres modula la migración leucocitaria y los niveles de citocinas a nivel sistémico, disminuyendo así el proceso inflamatorio.

Este es el primer reporte a nivel sistémico en el modelo de TPA, utilizando compuestos con actividad antiinflamatoria.

El análisis histológico confirmó que la acción de los estéres alifáticos obtenidos del extracto clorofórmico de *Senna villosa* favorecen la migración leucocitaria a nivel local

La acción antiinflamatoria de la mezcla de ésteres es independiente de corticoides e involucra la participación compleja del óxido nítrico, IL-6 y TNF- α , tanto a nivel sistémico como a nivel local.

Estos compuestos pueden ser una fuente viable de nuevos fármacos para inhibir la inflamación de la piel en enfermedades tales como la dermatitis atópica y la psoriasis.

La ruta de síntesis en microondas resultó viable para la obtención de los ésteres activos.

11 PERSPECTIVAS

Evaluar cada componente de forma independiente y en diferentes dosis.

Elucidar los mecanismos de acción de los compuestos identificados que podrían revelar una nueva estrategia terapéutica para el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Determinar la viabilidad de la vía de síntesis propuesta.

12 Bibliografía

1. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and molecular immunology. Philadelphia: WB. Saunders, 2000, pp. 190-220
2. Abdul, L.; Abdul, R.; Sukul, R.R.; Nazish, S. Anti-inflammatory and antihistaminic study of a Unani eye drop formulation. *Ophthalmol. Eye Dis.* **2010**, 2, 17–22.
3. Amalesh, S.; Gouranga, D.; Soma, G.; Durbadal, O. *In vivo* & *in vitro* anti-inflammatory activity of the methanolic extract and isolated compound from the leaves of *Cassia tora* L. (Leguminosae/caesalpinaceae). *J. Pharm. Res.* **2011**, 4, 1999–2002.
4. Ashendel G.L., Boutwell R.K. Prostaglandin E and F levels in mouse epidermis are increased by tumor promoting phorbol esters. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**, 90, 623-627.
5. Balunas, M.J.; Kinghorn, D.A. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* **2005**, 78, 431–441.
6. Baquedano, M.A. Evaluación citotóxica y determinación del perfil de los ácidos grasos del aceite extraído de las semillas de *Senna villosa* (Miller) H. S. Irwing & Barneby. Thesis of Licenciature, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México, 1999.
7. Basha, S.I.; Somashekara, S.C.; Govindadas, D.; Naidu, D.C.M.; Devasankaraiah, G.; Mohato, R.; Yadav, K.C.H. Anti-inflammatory activity of *Cassia occidentalis* seeds in albino rats. *J. Nat. Pharm.* **2011**, 2, 88–91.
8. Bauer, D.J. *Métodos y Diagnósticos Del Laboratorio Clínico*, VIII edition; Médica Panamericana Publisher: Buenos Aires, Argentina, 1983; pp. 581–597
9. Bautista, A.; Amaud, M.R.; Martínez, G.A.; Sánchez, P.S.; Pacheco, P. The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico. *J. Med. Plants Res.* **2011**, 5, 3404–3411.
10. Benoit-Vical, F.; Abena, A.A.; Ouamba, J.M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, 127, 108–111.

11. Bhalodia, N.R.; Acharya, R.N.; Shukla, V.J. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of hydroalcoholic seed extracts of *Cassia fistula* Linn. *Free Rad. Antiox.* **2011**, *1*, 68–76.
12. Boni, A.R.; Yapi, H.F.; Zirihi, G.N.; Bidie, A.P.; Djaman, A.J.; Niamke, L.S.; N'guessan, J.D. Comparison of antioxidant activity and total phenolic content of aqueous extracts of six Ivorian medicinal plants: *Ageratum conyzoides*, *Alchornea cordifolia*, *Amaranthus spinosus*, *Cassia occidentalis*, *Chromolaena odorata* and *Spondias mombin*. *Arch. Pharm. Sci. Res.* **2010**, *2*, 337–342.
13. Bourke E, Moynagh PN. Antiinflammatory effects of glucocorticoids in brain cells, independent of NF- κ B. *J of Immunol*, **1999**, *163*, 2113-2119.
14. Bradley, P.B.; Pribat, D.A.; Christensen, R.O.; Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 206–209.
15. Broide DH. Células inflamatorias: estructura y función. En: Inmunología Humana y Básica. (Eds) Stites DP, Terr AI. Manual Moderno SA de CV, México.1994. pág 223.
16. Brombacher F, Kastelein RA, and Alber G. Novel IL-12 family members shedlight on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* **2003**, *24*, 207–212.
17. Butler MS. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* **2003**, *67*, 2141-2153
18. Calixto, J.B.; Campos, M.M.; Otuki, M.F.; Santos, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* **2004**, *70*, 93–103.
19. Calzada, F; Yépez, M.; Aguilar, A. *In vivo* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 367–370.

20. Carlson, R.P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A.J. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase and inhibitors and other pharmacological agents. *Agents Actions* **1985**, *17*, 197–204.
21. Chan, R.A. Búsqueda de compuestos con actividad antitripanosoma en las hojas de *Senna villosa* (Miller) H. S. Irwing & Barneby. Thesis of MSc. Chemistry, Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México, 2008.
22. Choudhary, M.; Gulia, Y. *Cassia tora*: Its chemistry, medicinal uses and pharmacology *Pharmacologyonline* **2011**, *3*, 78–96.
23. Cines DB, Pollak ES, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, McEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS. Endothelial cell in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood*. **1998**, *91*. 3527-3561.
24. Cruse J M, Lewis R E. Illustrated Dictionary of Immunology. CRC Press, Boca Ratón, NY.1995.
25. Da Silva, K.A.; Manjavachi, M.N.; Paszcuk, A.F.; Pivatto, M.; Viegas, C., Jr.; Bolzani, V.S.; Calixto, J.B. Plant derived alkaloid (-)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 967–977.
26. Daffer PJ, Pfeifer PH, Ember JA, Hugli TE. C3a is a chemotaxin for human eosinophils but not for neutrophils. I. C3a stimulation of neutrophils is secondary to eosinophil activation. *J. Exp. Med.* **1995**, *181*, 2119-2127.
27. Dave, H.; Ledwani, L. A review on anthraquinones isolated from *Cassia* species and their applications. *Int. J. Nat. Prod. Res.* **2012**, *3*, 291–319
28. De Young, L.M.; Kheifets, J.B.; Ballaron, S.J.; Young, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* **1989**, *26*, 335–341.
29. Decker JM. Introduction to Immunology. (Ed) Blackwell, Inc. University of Arizona.2000.

30. Dlugosz, A.A.; Yuspa, S.H. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 217–225.
31. Ekwueme, F.N.; Oje, O.A.; Nwodo, O.F.C.; Ozoemena, N.F. Anti-inflammatory capacity of the aqueous leaf extract of *Senna mimosoides* on inhibition of rat oedema, platelet aggregatory activity and prostaglandin synthase activity. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 3028–3036.
32. Flores, J.S. Leguminosae. Florística, Etnobotánica y Ecología. In *Etnoflora Yucateense: Fascículo 18*. Editor: Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science-University of Yucatan, km.15.5 carret. Xmatkuil. PO Box 4-116, Mérida, Yucatán, 97100, México, 2001.
33. Fourtoul T., Castell A. Histología y biología celular. Mc. Graw Hill. México. 2010. 307 p.
34. Fürstenberger G, Csuk-Glänzer BJ, Marks F, Keppler D.. Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis *Carcinogenesis.* **1994**,*15*, 2823-2827.
35. Fürstenberger, G, Berry, DL, Sorg, B, Marks, F: Skin tumor promotion by phorbol esters is a two-stage process. *Proc Natl Acad Sci USA.* **1981**, *78*, 7722
36. Gábor Miklós. Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications. Akadémia Kiadó, Budapest, 2000 28-37.
37. Gábor, M. Models of acute inflammation in the ear. *Methods Mol. Biol.* **2003**, *225*,129–137.
38. Galli, S.J.; Tsai, M.; Piliponsky, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 445–454.
39. Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R. Overwiev. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R.eds. *Inflammation: basic principles and clinical correlates.* 2nd ed. New York, Raven Press, 1992, 1-4.

40. García L.M. Estudio sobre algunos aspectos de la biología de la reproducción de *Peromyscus winckelmanni*. Tesis doctoral Universidad Autónoma Metropolitana. México. 2007.
41. Garrigue, J.L.; Nicolas, J.F.; Fragnals, R.; Benezra, C.; Bour, H.; Schmitt, D. Optimization of the mouse ear swelling test for *in vivo* and *in vitro* studies of weak contact sensitizers. *Contact Dermatitis* **1994**, *30*, 231–237.
42. Graul AI. The year's new drugs. *Drug new and perspectives*. **2001**, *14*, 12-31.
43. Griffiths, R.J.; Wood, B.E.; Li, S.; Blackham, A. Pharmacological modification of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation and epidermal cell proliferation in mouse skin. *Agents Actions* **1988**, *25*, 344–351.
44. Gröne, A. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunop.* **2000**, *88*, 1–12.
45. Guatam, R.; Jachak, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev.* **2009**, *29*, 767–820.
46. Gupta S, Crofford LJ. An update on specific COX-2 inhibitors: The COXIBs. *Bull. Rheum. Dis.* **2001**, *50*, 1-4.
47. Guzmán, E.S.; Pérez, C.; Zavala, M.A.; Pérez, M.S. Antiprotozoal activity of (8-hydroxymethylen)-treicosanyl acetate isolated from *Senna villosa*. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 892–895.
48. Hafezi-Moghadam A, Simoncini T, Yang Z. Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. *Nat. Med.* **2002**, *8*, 473-479.
49. Hara, T.; Saito, Y.; Hirai, T.; Nakamura, K.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Katsuki, M.; Chida, K. Deficiency of protein kinase Calpha in mice results in impairment of epidermal hyperplasia and enhancement of tumor formation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7356–7362.
50. Hla T, Bishop-Bailey D, Lliu CH, Schaerferes HJ, Trifan OC. Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* **1999**, *31*, 551-557.

51. Irwin, H.S.; Barneby, R.C. The American Cassiinae: a Synoptical Revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoirs of the New York Botanical Garden* **1982**, 35, 1–918.
52. Iwuanyanwu, P.; Kingsley, C.; Onyeike, E.N.; Ahsana, D. Anti-inflammatory effect of crude methanolic extract and fractions of ringworm plant *Senna alata* (L. Roxb) leaves. *Pharm. Sin.* **2011**, 2, 9–16.
53. Jansen, A.P.; Dreckschmidt, N.E.; Verwiebe, E.G.; Wheeler, D.L.; Oberley, T.D.; Verma, A.K. Relation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C α , $-\delta$ and $-\varepsilon$ transgenic mice. *Int. J. Cancer.* 2001, 95, 635–643
54. Jetten, A.M.; George, M.A.; Pettit, G.R.; Herald, C.L.; Rearick, J.I. Action of phorbol esters, bryostatins, and retinoic acid on cholesterol sulfate synthesis: Relation to the multistep process of differentiation in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, 93, 108–115.
55. Jiménez, M.; Acosta, K.; Guzmán, E.S.; Pérez, C.; Pérez, M.S. Anti-trypanosomal activity of (8-hydroxymethylen)-treicosanyl acetate against infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Pharm. Biol.* **2010**, 48, 666–671.
56. Jiménez,^b M.; Guzmán, E.S.; Pérez, M.S.; Polanco, G.; Acosta, K. Antitrypanosomal activity of *Senna villosa* in infected BALB/c mice with *Trypanosoma cruzi* during the sub acute phase of infection. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2011**, 8, 164–169.
57. Jiménez^a, M.; Acosta, K.; Pérez, M.S.; Guzmán, E.S. *In vivo* activity of (8-hydroxymethylen)-treicosanyl acetate against *Trypanosoma cruzi* during acute phase of the infection. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2011**, 8, 198–207.
58. Johansson AC, Hansson AS, Nandakumar KS, Backlund J, Holmdahl R. (2001). IL-10 deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *J. Immunol.* **2001**, 167, 3505-3512.
59. Johnston B, Kubes P. Mast cell in inflammation. In: Physiology of Inflammation (Ed). Ley K. Oxford University Press, N.Y. 2001, pp 480.

60. Julián-González, R.E.; Orozco-Covarrubias, L.; Durán-McKinster, C.; Palacios-Lopez, C.; Ruiz-Maldonado, R.; Sáes-de-Ocariz, M. Less common clinical manifestations of atopic dermatitis: Prevalence by age. *Pediatr. Dermatol.* **2012**, *29*, 580–583.
61. Kotyuk, B.; Raychaudhuri, A.; DiPasquale, G. Effect of anti-inflammatory compounds on edema formation and myeloperoxidase activity in the arachidonic acid-induced ear model in the mouse. *Agents Actions* **1993**, *39*, C46–C48.
62. Kuby J. Leukocyte migration and inflammation. In: Immunology. WH Freeman & Co. N.Y. 1997, pp. 357-412.
63. Ley K. Physiology of inflammation. Oxford University Press, N.Y. 2001 pp: 1-10.
64. Linden J. Blood flow regulation in inflammation. In: Physiology of Inflammation (Ed). Ley K. Oxford University Press, NY, 2001 pp 52.
65. Liu, W.S; Heckman, C.A The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* **1998**, *10*, 529–542.
66. Loret, S.; Moreno, J.J. Effects of an anti-inflammatory peptide (Antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 347–353.
67. Marín, C.J.; Nieto, A.; Cespedes, C.L. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Pittocaulon* species from Mexico. *Pharm. Biol.* **2013**, *51*, 260–266
68. Mena, J.G.; Pech, S.G.; Brito, L. Anthraquinones from *Senna villosa* Mill. *Rev. Latinoam. Quím.* **1997**, *25*, 128–131.
69. Morgan, M.S.; Arlian, L.G.; Markey, M.P. *Sarcoptes scabiei* mites modulate gene expression in human skin equivalents. *PLoSOne* **2013**, *8*, e71143.
70. Murakawa, M.; Yamaoka, K.; Tanaka, Y.; Fukuda, Y. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-

tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1331–1336.

71. Murphy JE, Morales RE, Scott J, Kupper TS. (2003). IL-1 α , innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expression of IL-1 α in epidermis on chemical carcinogenesis. *J. Immun.* **2003**, *170*, 5697-5703.
72. Needleman P, Isakson p. (1997). The discovery and function of COX-2. *J. Rheumatol.* 1997, **24**, 6-8.
73. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Available online: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> (accessed on 13 July 2014).
74. Ntandou, N.G.F.; Banzouzi, J.T.; Mbatchi, B.; Elion-Itou, R.D.; Etou-Ossibi, A.W.; Ramos, S.; Benoit-Vical, F.; Abena, A.A.; Ouamba, J.M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *J. Ethnopharmacol.* 2009, *127*, 108–111
75. Palfreeman, A.C.; McNamee, K.E.; McCann, F.E. New developments in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: A focus on apremilast. *Drug Des. Devel. Ther.* **2013**, *7*, 201–210.
76. Perez, R.M. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from plants. *Sci. World J.* **2001**, *29*, 713–784.
77. Polanco, G.; Escalante, F.; García, K.; Acosta, V.K.; Chan, M.J.; Sagua, H.; González, J.; Osorio, L.; Moo, R.E.; Peña, L.M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal of native plants from the Yucatan Peninsula. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 31–35.
78. Randell, B.R.; Barlow, B.A. *Senna*, Flora of Australia **1998**, *12*, 89–138. (CSIRO: Melbourne).
79. Rao, S.; Suresh, C. Phytochemical analysis and *in vitro* efficacy of two edible *Cassia* species on selected human pathogens. *Intern. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 4982–4988.

80. Rao, T.S.; Currie, J.L.; Schaffer, A.F.; Isakson, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa)-and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* **1993**, *17*, 723–741.
81. Recio MC, Giner RM, Máñez S, Ríos JL. Screening of topical medicinal plants for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.* **1995**, *9*: 571-574.
82. Redondo, P.; García, J.; Espana, A.; Cuevillas, F.; Quintanilla, E. Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expression in keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. *Exp Dermatol.* **1997**, *6*, 186–194.
83. Reynolds, N.J.; McCombie, S.W.; Shankar, B.B.; Bishop, W.R.; Fisher, G.J. SCH 47112, a novel staurosporine derivative, inhibits 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and epidermal hyperplasia in hairless mouse skin. *Arch. Dermatol. Res.* **1997**, *289*, 540–546.
84. Rhen T, Cidlowski JA. (2005). Antiinflammatory action of glucocorticoids—new mechanisms for old drugs. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1711-1723.
85. Robbins, Cotran. *Patología estructural y funcional*. 5ª Edic. Edit. Interamericana MC.Graw-Hill. 1995 págs: 57-103.
86. Roitt I, Brostoff J, Male D *Immunology*. Mosby-Year book Europe. 3ª Edit. 1993 London, England. pp: 12-22
87. Saint-Mezard, P.; Krasteva, M.; Chavagnac, C.; Bosset, S.; Akiba, H.; Kehren, J.; Kanitakis, J. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: evidence using a mouse model of primary ACD. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *120*, 641–647.
88. Schadow A, Scholz-Pedretti K, Lambeau G, Gelb M, Fürstenberger G, Pfeilschifter J, Kaszkin M. Characterization of grupo X phospholipase A2 as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. *J. Inv. Dermatology.* **2001**, *116*, 31-39.
89. Sermakkani, M.; Thangapandian, V. GC-MS analysis of *Cassia italica* leaf methanol extract. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2012**, *5*, 90–94.

90. Sheeba, R.M.; Emmanuel, S.; Sreekanth, M.R. Evaluation of the antipyretic and anti-inflammatory activities of methanolic fraction and chrysofenol of *Cassia occidentalis*
91. Sinha, M.; Guatam, L.; Shukla, P.K.; Kaur, P.; Sharma, S.; Singh, T.P. Current perspectives in NSAID-induced gastropathy. *Mediat. Inflamm.* **2013**, 2582209:1-2582209:11.
92. Stites DP, Abba IT. (1994). Inmunología humana y básica. Manual Moderno S.A de C.V. Argentina. 1994 pp: 93-158.
93. Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandines other lipid mediat.* **2002** 68-69: 95-114.
94. Terr A I. Mecanismos de inflamación. En: Inmunología Humana y Básica (Eds) Stites DP, Terr AI. Manual Moderno SA de CV, México, 1994, pág 206.
95. Tracey K J. The inflammatory reflex. *Nature.* **2002**, 420, 853-859.
96. Tramposch, K.M. Skin inflammation. In In Vivo Models of Inflammation; Morgan, D.W., Marshall, L.A., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 1999; pp. 179–204
97. Trepicchio, W.L.; Ozawa, M.; Walters, I.B.; Kikuchi, T.; Gilleaudeau, P.; Bliss, J.L.; Schwertschlag, U.; Dorner, A.J.; Krueger, J.G. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions. *J. Clin. Invest.* **1999**, 104, 1527–1537.
98. Turesson C, Matteson EL. (2006). Genetics of rheumatoid arthritis. *Mayo Clin. Proc.* **2006**, 81: 94-101.
99. Van Arman, C.G. Anti-inflammatory drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1974**, 16, 900–904.
100. Wang, H.Q.; Smart, R.C. Overexpression of protein kinase C- α in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF- α expression but not tumor promotion. *J. Cell Sci.* **1999**, 112, 3497–506.

101. Welle M. Development, significance, and heterogeneity of mast cells with particular regard to the mast cell-specific proteases chymase and tryptase. *J. Leukoc. Biol.* **1997**, 61, 233-245.
102. Wilmer, J.L.; Bureson, F.G.; Kayama, F.; Kanno, J.; Luster, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* **1994**, 102, 915–922.
103. Wollenberg, A.; Ehmann, L.M. Long term treatment concepts and proactive therapy for atopic eczema. *Ann. Dermatol.* **2012**, 24, 253–260.
104. Young JM, De Young LM. Cutaneous models of inflammation from the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. In: *Pharmacological methods in the control of inflammation*. Eds. Chang JY, Lewis AJ. Alan R. Liss, Inc. New York. 1989 pp: 21
105. Young, J.M.; Spires, D.A.; Bedord, C.J.; Wagner, B.; Ballaron, S.J.; de Young, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.* **1984**, 82, 367–371.
106. Young, J.M.; Wagner, B.M.; Spires, D.A. Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, 80, 48–52.

Article

Bioassay-Guided Chemical Study of the Anti-Inflammatory Effect of *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) in TPA-Induced Ear Edema

Ana del Carmen Susunaga-Notario ^{1,*}, Salud Pérez-Gutiérrez ², Miguel Ángel Zavala-Sánchez ², Julio Cesar Almanza-Pérez ³, Atilano Gutiérrez-Carrillo ⁴, Daniel Arrieta-Báez ⁵, Ana Laura López-López ¹, Rubén Román-Ramos ³, José Luis Eduardo Flores-Sáenz ³ and Francisco Javier Alarcón-Aguilar ^{3,*}

¹ Doctorado en Biología Experimental, D.C.B.S., Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No.186 Colonia, Vicentina, Iztapalapa 09340, Mexico; E-Mail: dioses_aztecas@yahoo.com.mx

² Laboratory of Productos Naturales, Departamento Sistemas Biológicos, D.C.B.S., Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Col, Villa Quietud, Coyoacán 04690, Mexico; E-Mails: msperez@correo.xoc.uam.mx (S.P.-G.); mzavala@correo.xoc.uam.mx (M.Á.Z.-S.)

³ Laboratory of Farmacología, Departamento Ciencias de la Salud, D.C.B.S., Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No.186 Colonia, Vicentina, Iztapalapa 09340, Mexico; E-Mails: jcap@xanum.uam.mx (J.C.A.-P.); rrr@xanum.uam.mx (R.R.-R.); csib@xanum.uam.mx (J.L.E.F.-S.)

⁴ Laboratory of RMN, Departamento de Química, D.C.B.I. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186, México D.F. 09340, Mexico; E-Mail: agrmn@xanum.uam.mx

⁵ Instituto Politécnico Nacional-CNMN, Calle, Luis Enrique Erro s/n, Unidad Profesional Adolfo López Mateos, Gustavo A, Madero 07738, Mexico; E-Mail: danielarrieta@hotmail.com

* Authors to whom correspondence should be addressed; E-Mails: qfbsus@yahoo.com.mx (A.C.S.-N.); aaaf@xanum.uam.mx (F.J.A.-A.); Tel.: +52-55-5804-6483 (F.J.A.-A.).

Received: 23 March 2014; in revised form: 9 July 2014 / Accepted: 10 July 2014 /

Published: 15 July 2014

Abstract: *Senna villosa* (Miller) is a plant that grows in México. In traditional Mexican medicine, it is used topically to treat skin infections, pustules and eruptions and to heal wounds by scar formation. However, studies of its potential anti-inflammatory effects have not been performed. The aim of the present study was to determine the anti-inflammatory

effect of extracts from the leaves of *Senna villosa* and to perform a bioassay-guided chemical study of the extract with major activity in a model of ear edema induced by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA). The results reveal that the chloroform extract from *Senna villosa* leaves has anti-inflammatory and anti-proliferative properties. Nine fractions were obtained from the bioassay-guided chemical study, including a white precipitate from fractions 2 and 3. Although none of the nine fractions presented anti-inflammatory activity, the white precipitate exhibited pharmacological activity. It was chemically characterized using mass spectrometry and infrared and nuclear magnetic resonance spectroscopy, resulting in a mixture of three aliphatic esters, which were identified as the principal constituents: hexyl tetradecanoate (C₂₀H₄₀O₂), heptyl tetradecanoate (C₂₁H₄₂O₂) and octyl tetradecanoate (C₂₂H₄₄O₂). This research provides, for the first time, evidence of the anti-inflammatory and anti-proliferative properties of compounds isolated from *Senna villosa*.

Keywords: *Senna villosa*; anti-inflammatory effect; anti-proliferative properties; bioassay-guided chemical study

1. Introduction

The prevalence of atopic dermatitis has increased significantly, causing considerable economic costs and a decreased quality of life for its sufferers [1–3]. Different therapies are used in combination to treat atopic dermatitis to recover the functionality of the skin (hydrating creams), reduce itching (anti-histaminergic agents), prevent secondary infections (antibacterial agents) and control the inflammation process (steroidal and non-steroidal anti-inflammatories, NSAIDs/AINEs) [4]. The steroidal drugs can have severe side effects, such as constipation, sedation, respiratory depression and hallucinations, which may be annoying or dangerous for the patient [5]. These agents can also disrupt the release of various cytokines (TNF- α , IL- α y β , IL-2, IL-22) involved in leukocyte function, causing immunosuppression and, with chronic use, a decrease in the synthesis of collagen, producing epidermal atrophy [6,7]. AINEs also have a disadvantage because their prolonged use can cause gastric ulcers, blocked platelet aggregation, inhibited uterine motility, prolonged gestation and inhibited renal function [5,8]. Therefore, the discovery of new anti-inflammatory agents is needed.

Currently, research into traditional medicinal plants is a promising source for the development of new pharmacological agents. The genus *Senna* is comprised of approximately 350 species, mainly as a result of the new nomenclatural combination of non-American taxa [9]. Of these, 80% occur on the American continent, while most of the remaining members are found in tropical Africa, Madagascar, and Australia, with only a few species in southeastern Asia and some on the Pacific Island [9,10].

Chemical studies indicate that *Senna* species contain flavonoids, phenols, alkaloids, chromones, lactones, stilbenes, triterpenes, quinones and anthraquinones; other compounds isolated from the leaves are polysaccharides, flavonoids, sterols, terpenes, anthocyanins and proanthocyanidins, catechins, epicatechin, a flavonol glycoside, fistulic acid, chrysophanol, ascorbic acid, quercetin, amino acids, and cardiac glycosides. Many of these compounds have been associated with diverse

biological activities, for example, laxative, antimicrobial, antifungal, antioxidant, hepatoprotective, antigenotoxic, hypolipidemic, spasmogenic and antinociceptive, antiproliferative, immunostimulatory, hypotensive, purgative, antidiabetic, estrogenic and antiestrogenic, antiulcer, antihistaminic, anti-cancer, anti-inflammatory, anti-nociceptive, antipyretic, platelet aggregatory and prostaglandin synthase activity [11–24].

The study of the anti-inflammatory properties of natural products has gained popularity, aimed at finding new agents without the aforementioned side effects and producing synthetic derivatives with enhanced activity [5,25–27]. In Mexico, the ethno-botanical information indicates a great variety of medicinal plants that are used to treat inflammation and the symptoms related to an inflammatory process [28,29]. Particularly in the State of Yucatán, located in southern México, the use of these medicinal plants is a common practice.

Senna villosa (Miller) H.S. Irwin and Barneby (Syn.: *Cassia villosa* Miller, *Cassia articulate* Rose, *Cassia geniculata* Sesse and Mosino, *Cassia geniculata* Don, *Cassia stellata* Jones, *Chamaefistula astroites* Cham and Schidl) is a plant that grows in México in the states of Baja California, Campeche, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco, Veracruz and Yucatán [30]. Popular Mayan names in Yucatán are salche, saalche, stall saalch'e, tsalche, tuy'ache, your 'ja' ché, boxsaal and zalche, whose meaning in Spanish is black bean (Figure 1) [31].

Figure 1. *Senna villosa*, popularly named saalche by the Mayan population.



In traditional Mexican folk medicine, this plant is used topically to treat skin infections, pustules and eruptions and to heal wounds by scar formation. An aqueous extract is also used for the treatment of irregular menstruation and inflammatory problems [32]. It has been reported to have trypanocidal and antiprotozoal activities [33–38]. However, the anti-inflammatory activity of this plant and its active components has not yet been systematically studied.

The aim of the present study was to determine the anti-inflammatory effect of different extracts obtained from the leaves of *Senna villosa* in a model of ear edema induced by 12-*O*-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA). The extract that presented the most activity was fractioned, and after isolation and purification, the chemical structure of the active compound was established.

2. Results and Discussion

2.1. Anti-Inflammatory Effect

Table 1 shows the data obtained from the evaluation of the anti-inflammatory activity of the *Senna villosa* extracts in the model of ear edema induced with TPA. The ears treated only with the vehicle exhibited a normal mean weight of 9.37 ± 0.29 mg and did not develop edema. The ears that received only TPA/vehicle (the control group) developed an edema of 10.23 ± 0.39 mg 6 h after the TPA application. The ears treated with indomethacin showed a significantly lower edema compared with the control group, in which edema was inhibited by $36.15\% \pm 4.75\%$. The group treated with the chloroform extract showed a percentage of inhibition of edema of $57.96\% \pm 5.21\%$, which was the most intense in relation to indomethacin ($p < 0.0001$).

Table 1. Anti-inflammatory effect of different extracts from *Senna villosa* leaves in TPA-induced ear edema.

Group	Topical Dose/Ear (mg)	Edema (mg)	% of Inhibition
TPA-Control	Vehicle	10.23 ± 0.39	-
Indomethacin	2	6.53 ± 0.48 **	36.15 ± 4.75
Chloroform Extract	2	4.30 ± 0.55 **♦	57.96 ± 5.21 ♦
Methanol Extract	2	9.11 ± 0.29	10.90 ± 2.88
Aqueous extract	2	7.83 ± 0.59 *	23.42 ± 5.78

Mean \pm S.E.M. ANOVA followed of Tukey's multiple comparisons test. Significant differences compared with TPA-control (* $p < 0.05$, ** $p < 0.0001$; $n = 10$). Significant differences compared with indomethacin (♦ $p < 0.0001$; $n = 10$).

The methanol extract did not show anti-inflammatory activity, while the aqueous extract showed a percentage of inhibition of $23.42\% \pm 5.78\%$, which was minor in comparison to the values exhibited by the chloroform extract. Based on these results, the leukocyte differential count and the chromatographic separation were performed only on the chloroform extract.

The present study evaluated the anti-inflammatory effect produced by different *Senna villosa* leaf extracts (chloroform, methanol and aqueous) on TPA-induced edema, finding that the chloroform extract was the most active. Our results reveal that topical application of the chloroform extract inhibits edema in a model of acute inflammation in the mouse ear. It is worth mentioning that the chloroform extract of *Senna villosa* also inhibits the inflammation associated with allergic contact dermatitis in this mouse model, showing that this extract is effective against both innate and adaptive immune responses.

The epidermis is exposed to stimuli from both outside and inside the body, which affect cytokine production. Cytokines have an important impact on the body's ability to react appropriately to its environment and to overcome systemic diseases. *In vivo* studies provide important clues about the possible role of cytokines in various skin diseases and also allow for the assessment of cytokines as possible therapeutics [39].

TPA-induced inflammation in the mouse ear has been routinely used to test whether topically applied anti-inflammatories inhibit the development of chemically induced acute dermal irritation [40–47]

or adaptive immune responses, such as allergic contact dermatitis [48–50]. This model induces cutaneous inflammation in the ear for topical applications, which induces the cellular hyper-proliferation that is observed in diseases of the skin, such as psoriasis and atopic dermatitis [51]. To understand the inflammatory process induced by TPA, and thus establish the possible mechanism of action of the tested compounds, it is important to know the structure of the skin, including its composition of cell types and which signaling pathways are activated by this agent.

2.2. Leukocyte Differential Count

The results of the leukocyte differential count performed on blood smears from the animals treated with the chloroform extract are shown in Table 2. The time zero represents the mean number of quantified leukocytes before TPA application, which were similar to those reported by Harlan Laboratories for each cellular type and did not show significant differences between the different treatments ($p > 0.05$).

Table 2. Temporal course of the leukocyte differential count in the model of TPA-induced ear edema.

Celular Type	Time	TPA-Control	Indomethacin	Chloroform Extract
Neutrophil	0	54.50 ± 9.75	37.53 ± 2.91	46.72 ± 6.21
	240	34.69 ± 4.13	40.11 ± 6.84	80.72 ± 1.63 * ♦•
	300	38.77 ± 1.72	55.88 ± 6.99	66.32 ± 2.90 ♦
	360	91.15 ± 2.98 *	40.37 ± 2.21	81.04 ± 1.95 * ♦•
Monocyt	0	3.17 ± 1.10	2.01 ± 0.24	1.50 ± 0.62
	240	1.23 ± 0.24	2.39 ± 0.60	1.75 ± 1.28
	300	1.23 ± 0.24	0.67 ± 0.37	5.75 ± 1.75 ♦•
	360	1.65 ± 0.30	3.32 ± 0.33	8.99 ± 1.76 * ♦•
Lymphocyte	0	54.98 ± 1.24	55.37 ± 3.39	51.72 ± 6.17
	240	50.93 ± 2.53	53.75 ± 6.99	18.13 ± 1.76 * ♦•
	300	43.00 ± 1.61	38.88 ± 6.40	30.48 ± 3.30 *
	360	35.55 ± 4.25 *	54.80 ± 1.54 ♦	14.15 ± 2.04 * ♦•
Eosinophil	0	0.33 ± 0.22	0.59 ± 0.07	0.58 ± 0.31
	240	1.06 ± 0.44	0.46 ± 0.14	0.12 ± 0.12
	300	1.60 ± 0.37 *	0.44 ± 0.21	0.37 ± 0.18
	360	2.21 ± 0.41 *	0.55 ± 0.12 ♦	0.12 ± 0.12 ♦
Basophil	0	0.65 ± 0.25	0.38 ± 0.21	0.27 ± 0.18
	240	63.02 ± 4.69 *	0.59 ± 0.26 ♦	0.12 ± 0.12 ♦
	300	58.45 ± 1.85 *	2.13 ± 1.89 ♦	0
	360	53.54 ± 2.45 *	0.10 ± 0.10 ♦	0

Mean ± S.E.M. ANOVA followed by the test of Tukey's multiple comparisons. Significant differences compared with time zero (* $p < 0.05$; $n = 10$). Significant differences compared with TPA-Control (♦ $p < 0.05$; $n = 10$). Significant differences compared with indomethacin (• $p < 0.05$; $n = 10$).

The TPA-control animals showed a significant decrease in lymphocytes and increase in eosinophils and basophils at 360 min. Compared with time zero, the animals treated with indomethacin after the administration of TPA did not show changes in their leukocyte count during the experiment. The

animals administered the chloroform extract showed a significant increase in neutrophils and monocytes. In addition, significant reductions of lymphocytes, eosinophils and basophils were also observed (Table 2).

The skin does not only serve as a physical and chemical barrier but is also an immune-competent organ that elicits effective innate and adaptive immune responses to protect the body. Cells in the dermis and epidermis alike, including dermal dendritic cells, epidermal Langerhans cells, melanocytes, keratinocytes and migrating lymphocytes, are important in this process and are known to produce a great variety of cytokines [52]. Skin inflammation comprises a plethora of physiologic reactions, involving mainly the blood vessels and the subjacent connective tissue. This response is characterized by hyper-proliferation of the skin epidermal layer, which is attributed to a premature maturation of keratinocytes and dermal inflammatory infiltrates, comprising dendritic cells, macrophages and T-cells. Inflammation is maintained by the interactions of local cell types, such as nerve terminals, keratinocytes, fibroblasts, mast and endothelial cells and macrophages. The pronounced inflammation induced by topically administered TPA is mediated by protein kinase C and the stimulation of phospholipase A2 and cyclooxygenase. These events cause the release of arachidonic acid and prostaglandin E2 [43,53]. TPA induces changes in vascular permeability parallel to the increased edema, with local accumulation of neutrophils, monocytes and macrophages [54] and epidermal hyperplasia [55–60]. There are no reports of changes at the systemic level.

The growth and differentiation of epidermal keratinocytes have shown to be PKC-regulated [61,62]. Alternatively, keratinocyte-released mediators could affect G-protein-coupled receptor signaling in other dermal cells involved in neutrophil attraction and extravasation. In this model, some important mediators participate in the inflammatory reaction, and TPA seems to induce the expression of pro-inflammatory cytokines in keratinocytes [63,64]. These data were also confirmed *in vitro* because Murakama *et al.* [65] showed that the addition of TPA to human keratinocytes resulted in an increase in the amount of TNF- α .

Through the differential leukocyte count, it was possible to establish a systemic effect caused by the topical application of TPA to the ears of mice. In addition, this technique enabled correlation of the changes in the levels of different cell types to the inflammatory mediators involved in this experimental model. Often, however, cytokines released at the side of inflammation facilitate both the adherence of immune-system cells to vascular endothelial cells and their migration through the vessel wall into the tissue spaces. We see this reflected in the results obtained in the differential leukocyte count, the TPA-control animals showed a significant decrease in lymphocytes and increase in neutrophils, eosinophils and basophils at 360 min.

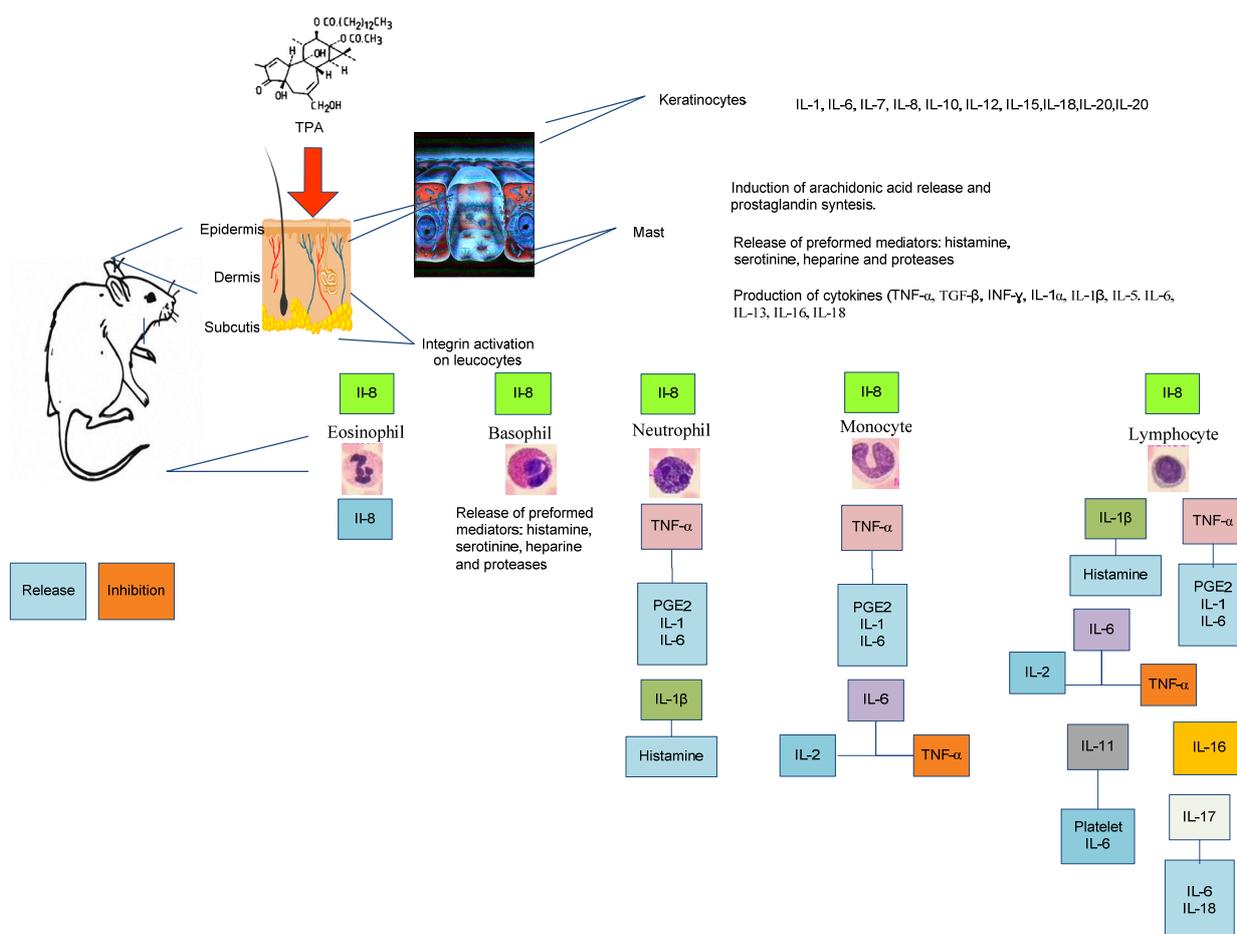
Many types of leucocytes move from one part of the body to another. This is especially true of lymphocytes, which circulate continually in the blood and lymph and, in common with other types of leukocytes, migrate into the tissues at tissue injury. Lymphocytes are capable of a remarkable level of recirculation, continually moving through the blood and lymph to the various lymphoid organs. This recirculation of lymphocytes would explain the decrease observed after administration of TPA. The injured site also attracts granulocytes (neutrophils, eosinophils and basophils) that migrate to the inflamed tissue. This explains the increase of these leukocytes; which in turn induce the release of inflammatory mediator cytokines and thus creating a complex feedback system.

The result is an influx of the lymphocytes, neutrophil, monocytes, eosinophils, basophils and mast cells to the site of tissue damage, where these cells participate in clearance of the antigen and healing of

the tissue. Clearly, the processes of the leukocyte adhesion are of great importance in the inflammatory response. The behavior of these leukocytes allows us to understand and correlate other inflammatory mediators that are closely related.

These results permit the establishment of appropriate times for the quantification of systemic inflammatory mediators, such as histamine, serotonin, lysosome enzymes, prostaglandins, leukotrienes, platelet activating factor, reactive oxygen species, nitric oxide and cytokines, in a close relationship with changing blood leukocyte levels. Because the average numbers of the different cell types were observed until 6 h post-treatment, other biomarkers should be measured at this time point to elucidate the anti-inflammatory mechanism of action at the systemic and local levels. Of particular relevance, markers of oxidative stress (total nitric oxide) and the expression of the genes involved in TPA-induced inflammatory response should be considered. Therefore, quantification of cytokines in the atrial tissue (at the local level) and in the serum (systemic level) should be performed in future studies (IL-1, TNF- α , IL-6, IL-10 and IL-12, in addition to PGE2 and COX-2), between 240 and 360 min post-treatment to elucidate the mechanism of action of the principally active extracts of *Senna villosa* (Figure 2 describes this idea).

Figure 2. Inflammatory mediators after application of TPA.



Given the structure and composition of the mice ear skin, the major cell types stimulated after application of TPA are keratinocytes and mast cells, however, many of the currently identified cytokines are produced by keratinocytes, either constitutively or upon induction by various stimuli.

Such cytokine production by keratinocytes has multiple consequences for the migration of inflammatory cells, which may have systemic effects on the immune system, influences on the keratinocyte proliferation on the differentiation processes, and finally it affects the production of other cytokines by keratinocytes. The injured site also attracts granulocytes that migrate to the inflamed tissue [6]; which in turn induce the release of inflammatory mediators cytokines and thus creating a complex feedback system.

2.3. Fractionation of the Chloroform Extract

Based on the fact that the chloroform extract had the highest anti-inflammatory effect, it was chromatographically separated, yielding nine fractions. The fractions and weights obtained were as follows: 1 (0.063 g), 2 (0.075 g), 3 (0.1803 g), 4 (0.0116 g), 5 (0.0666 g), 6 (0.0972 g), 7 (0.5751 g), 8 (0.3659 g), 9 (0.1279 g). Fractions two and three rendered a white precipitate (0.1874 g).

2.4. Bioassay-Guided Chemical Study (Anti-Inflammatory Effect in the Model of Ear Edema Induced by TPA)

The ears that only received TPA and vehicle (TPA-control) developed an edema of 12.18 ± 0.68 mg after 6 h of TPA application (Table 3). The TPA-treated ears that were also treated with indomethacin (2 mg/ear) showed a significant reduction in edema of $43.90\% \pm 5.81\%$ (weighing 6.83 ± 0.70 mg).

Table 3. Evaluation of the anti-inflammatory effect of the white precipitate from fractions 2 and 3 of *Senna villosa* leaves chloroform extract in TPA-induced ear edema.

Group	Dose topically Administered/Ear (mg)	Edema (mg)	% of Inhibition
Control	STPA-control	12.18 ± 0.68	-
Indomethacin	2	6.83 ± 0.70 *	43.90 ± 5.81
Fraction 1	2	11.46 ± 0.63	5.91 ± 5.42
Fraction 2	2	9.18 ± 0.79	24.63 ± 6.55
Fraction 3	2	10.10 ± 0.88	17.08 ± 7.29
Fraction 4	2	8.66 ± 0.58	28.90 ± 4.82
Fraction 5	2	10.16 ± 0.66	16.58 ± 5.45
Fraction 6	2	9.51 ± 0.91	24.88 ± 7.51
Fraction 7	2	10.05 ± 0.49	17.49 ± 4.05
Fraction 8	2	10.98 ± 0.47	9.82 ± 3.93
Fraction 9	2	11.13 ± 0.35	8.66 ± 2.94
White precipitate from fractions 2–3	2	6.30 ± 0.93 *	48.28 ± 7.64

Mean \pm S.E.M. ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test. Significant differences compared with control group (* $p < 0.001$; $n = 10$).

Although the nine fractions obtained from the chloroform extract did not show anti-inflammatory activity, the majority of the fractions exhibited tendencies to reduce the edema. From the nine fractions, fraction 4 exhibited the best tendency anti-inflammatory, with 28.90 ± 4.82 of percentage of inhibition of the edema; and in similar way to the other 8 fractions, the difference did not present statistical significance, compared with control ($p > 0.05$).

The chemical composition of the extracts of medicinal plants is very varied, and different chemical studies show the presence of more than one compound with various pharmacological properties of interest. The chloroform extract of *Senna villosa* contain several non-identified compounds that may have synergistic activity. In fact, the majority of the nine fractions obtained from *Senna villosa*, which might contain different kind of compounds, exhibited tendencies to reduce the edema. Fraction 4 exhibited the best tendency anti-inflammatory, with 28.90 ± 4.82 of percentage of inhibition of the edema; and in similar way to the other fractions showed certain activity. It is clear that administered all together in the chloroform extract, these fractions exhibit better activity than indomethacin and white precipitate. Therefore, our results suggest a probable synergistic effect among these different chemical compounds present in the chloroform extract of *Senna villosa*.

The white precipitate isolated from fractions two and three was active, showing a percentage of inhibition of edema of 48.28 ± 7.64 (weighing 6.30 ± 0.93 mg). The white precipitate was subjected to dose response testing. The tested doses were 0.5, 1 and 2 mg/ear (data not shown). All the doses showed inhibition of the edema ($p < 0.05$). The dose at which the best activity was observed was 2 mg/ear. For this reason, this dose was chosen to perform experiments with the white precipitate.

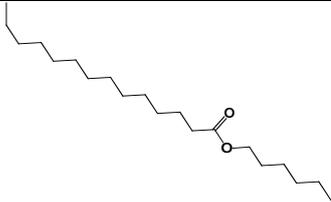
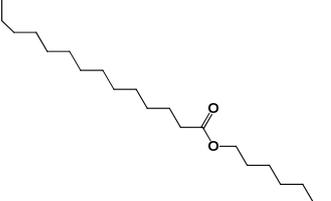
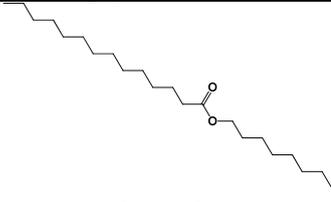
2.5. Structural Elucidation (NMR, IR, MS)

The ^{13}C -NMR spectrum showed signals at 173.85 and 64.3 ppm that were assigned to a carbonyl carbon and to the α carbon of ester oxygen, respectively. Both of these signals confirmed the presence of ester moieties. The rest of the carbons were assigned by 2D spectra (COSY, HSQC and HMBC). The presence of the ester group in the proposed structures was evidenced by the ATR-FTIR spectrum. The bands at $1,729.6\text{ cm}^{-1}$ corresponded to the carbonyl stretching, while 1,171.7 belonged to the stretching of the C-O bond.

In the negative ion mode electrospray mass spectrum of the white precipitate three deprotonated molecular $[\text{M}-\text{H}]^-$ ions (m/z values, 113.0289, 265.2494 and 325.3099) were apparent. The latter had the greatest proportion. The negative ion mode electrospray mass spectrum of the deprotonated molecular ion $[\text{M}-\text{H}]^-$, with the m/z that made up the greatest proportion of the white precipitate. Table 4 shows the proposed structures for the deprotonated molecular ions $[\text{M}-\text{H}]^-$, with m/z values of 311.2890, 339.3308 and 325.3099.

Previous phytochemical studies of *Senna villosa* leaves revealed the presence of quinones, sterols, flavonoids and tannins. In the hexane extract from the leaves, two anthracenic quinone-like main components were identified as chrysophanol and fision [32]. Three components were isolated from the dichloromethane extract: squalene (triterpene), chrysophanol and fision (anthraquinones). From an ethyl-acetate fraction, seven secondary metabolites were identified: emodin (anthracenic quinone), apigenin, luteolin and chrysoeriol (flavones), quercetin and kaempferol (flavonols) and demetoxicapilarisina (neoflavone) [66]. Analysis of the essential oil from the seeds revealed the presence of the ethyl esters of palmitic acid and stearic acid and the methyl esters of linoleic acid, stigmasterol, δ -sitosterol and vitamin E [67]; (8-hydroxymethylene)-treicosanyl acetate was isolated of the chloroform extract [37]. Several of these compounds have been associated with biological activity. For instance, anthraquinone glycosides isolated of various plants from *Senna* genus exhibited laxative activities. However, in Mexico there are no reports about a traditional use of *Senna villosa* as laxative.

Table 4. Molecular ion, molecular formula and molecular structure of the main components of the white precipitate from fractions 2 and 3 of the chloroform extract.

Molecular Ion	Chemical Formula	Structural Formula
311.2890	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	 1.-Hexyl tetradecanoate
325.3099	C ₂₁ H ₄₂ O ₂	 2.-Heptyl tetradecanoate
339.3308	C ₂₂ H ₄₄ O ₂	 3.-Octyl tetradecanoate

Three aliphatic esters were identified as principal components of the white precipitate from fractions 2 and 3 of the chloroform extract of the *Senna villosa* leaves, which had not yet been reported in this specie: hexyl tetradecanoate (C₂₀H₄₀O₂), heptyl tetradecanoate (C₂₁H₄₂O₂) and octyl tetradecanoate (C₂₂H₄₄O₂). However, there have been several studies of these compounds obtained through synthesis or isolated from different sources. The only pharmacological activity of these compounds reported to date is antibacterial [68].

3. Experimental Section

3.1. Plant Material

Senna villosa was gathered in September of 2011 in the rural community of Komchem, 17 km from Merida, Yucatán, and was authenticated by Salvador Flores Guido at the Herbarium of the “Universidad Autónoma de Yucatán” (voucher number 10284). The biological material was air dried at ambient temperature for seven days, until a complete dehydration was achieved. The leaves of the plant were then ground by means of a manual stainless steel mill (ROTTER).

3.2. Preparation of Extracts

The dried leaves of *Senna villosa* (500 g) were consecutively refluxed for 4 h in 3.5 L of chloroform, methanol and water and then filtered. The organic solvents were eliminated at reduced pressure in a rotary evaporator (Buchi R-200), while the aqueous extract was freeze-dried (Labconco freeZone). The yields of chloroform, methanol and water extracts were 22.32%, 15.78% and 8.56%, respectively.

3.3. Animal Experiments

Male CD-1 mice, approximately six weeks old and 25–30 g, were used. The animals were provided by the animal center at Universidad Autónoma Metropolitana Unidad-Iztapalapa. They were raised at ambient temperature, with a 12:12 h light/dark cycle and allowed food (Harlan[®], México D.F., México) and water *ad libitum*. The handling of the laboratory animals was performed in agreement with the statutes of the CICUAL (Institutional Committee for the Care and Use of the Animals) based in the international and national rules established in the “Official Mexican Rule” for the care and use of the laboratory animals” [NOM-062-ZOO-1999, revised in 2001] [69].

3.4. Anti-Inflammatory Effect in the Model of Ear Edema Induced by TPA

The animals were separated into five groups of ten animals. Edema was induced by TPA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which was topically administered to the left ear of every mouse at a dose of 2.5 µg of TPA, dissolved in 25 µL of acetone. Thirty minutes after this TPA administration in the left ear, the right ear of every mouse was topically administered with 25 µL of acetone or the vehicle used for the corresponding extract (chloroform, methanol or water). In all cases, 2 mg of extract was dissolved in 25 µL of the relevant vehicle. The solvents and extracts were topically administered to both faces of each left ear treated with TPA. A control group received 2 mg/ear of indomethacin as a positive control in the ear treated with TPA.

The animals were sacrificed by cervical dislocation 6 h after the treatment. A piece of atrial tissue was then removed by drilling a 6 mm hole at the center of the ear with a punch to record its weight for further analysis. The induced edema was quantified as the weight difference between the auricular atrial tissues treated with TPA and the corresponding tissue from the other ear, where only the vehicle was applied. The inhibition of edema was defined as a percentage of the edema produced in the control animals, with the following formula:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(w - w_0) - (w' - w_0')}{(w - w_0)} \times 100 \quad (1)$$

where: W = Weight of the left ear with TPA (TPA control); W₀ = Weight of the right ear with vehicle (normal control); W' = Weight of the left ear with TPA (treated); W₀' = Weight of the right ear with vehicle (untreated).

3.4.1. Differential Leukocyte Count

A sample of blood from the saphenous vein of every mouse was taken at four different times (0, 240, 300 and 360 min). Blood smears were immediately prepared on pre-cleaned microscopic slides of standard size and then treated according to Wright's method. The time zero was collected before the TPA application. The blood smears were used for the differential leukocyte count using an Olympus CX41 microscope equipped with an Olympus U-CMAD3 photographic camera. The total number of cells counted in each of the stained slides was 100. The leukocytes were inspected using the 10× zoom, selecting the region with the best distribution of cells. The counting and sorting of leukocytes was done using the 100× immersion objective, placing it on the upper end of the blood smear and moving it toward the lower end in successive fields. When necessary, more fields were inspected until 100 cells

were counted, as required by the method [70]. Neutrophils, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophil cells were identified and counted in the blood smears. The results were expressed as the absolute values of each studied cell type.

3.5. Fractionation of the Chloroform Extract

The chloroform extract was separated using a 70-230-mesh silica gel chromatographic column. The column was eluted with hexane, and the polarity was further increased with ethyl acetate. Nine fractions were collected. The first fraction was eluted only with hexane, while the second through the ninth fractions were eluted with a 98:2 hexane/ethyl acetate mixture. Fractions two and three rendered a white precipitate, which was independently evaluated. All of the fractions were stripped of solvent on a rotary evaporator under reduced pressure.

3.6. Purification of the Active Principles

White precipitate was filtered, dissolved in chloroform and then re-precipitated with ethyl acetate. Finally, it was filtered out, and the solid was placed in a vacuum oven to remove any trace of solvent.

3.7. Bioassay-Guided Chemical Study (Anti-Inflammatory Effect in the Model of Ear Edema Induced by TPA)

Evaluation of the anti-inflammatory effects of all the liquid fractions, as well as of the white precipitate obtained upon chromatographic separation of the chloroform extract, was performed according to the methodology detailed above.

3.8. Structural Elucidation

3.8.1. Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

The NMR spectra were collected in a Bruker Avance-III 500 spectrometer, with a 5 mm ID-BB (31P-109 Ag) z- gradient field probe. Tetramethylsilane (TMS) was used as the internal reference, and CDCl₃ and DMSO-*d*₆ were used as solvents (Sigma-Aldrich). The ¹H spectra were collected routinely, while the ¹³C and the 2D spectra (COSY, HSQC, HMBC) were acquired only when necessary. The assignments of the NMR spectra were performed in a systematic way.

3.8.2. Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR)

Infrared spectroscopy was performed on a micro-Raman model Lab-Ram spectrometer (HORIBA Jobin Yvon, Longjumeau, France) with an ATR lens with detection of excitation in the range of 400–4000 nm.

3.8.3. High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry

The spectra were obtained using a micrOTOF-QII mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) equipped with an electrospray ionization source (ESI). The parameters were set as follows:

capillary 2700 V, nebulizer pressure 5.8 psi, dry gas flow 40 L/min, and dry gas temperature 180 °C. The sample was run in the negative ion mode. The scan range was from 50 to 3000 *m/z*.

3.9. Statistical Analysis

The data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's *post hoc* test; an alpha level of $p \leq 0.05$ was used to determine significant differences between groups.

4. Conclusions

These results reveal that the chloroform extract from *Senna villosa* leaves has anti-proliferative and anti-inflammatory properties. In addition, this extract contains several compounds which are contained in the optimum amounts to be biologically active immune system stimuli, with the capacity to block activated inflammatory mechanisms at both local and systemic levels.

Three aliphatic esters, hexyl tetradecanoate (C₂₀H₄₀O₂), heptyl tetradecanoate (C₂₁H₄₂O₂) and octyl tetradecanoate (C₂₂H₄₄O₂), were identified as the principal constituents in the white precipitate obtained from fractions 2 and 3 of the chloroform extract, and this is the first report of the presence of these compounds in *Senna villosa*.

This research provides the first evidence of the anti-proliferative and anti-inflammatory properties of extracts isolated from *Senna villosa*, suggesting that this plant may be a viable source of new drugs to inhibit inflammation of the skin in diseases such as atopic dermatitis and psoriasis. Interestingly, the chloroform extract of *Senna villosa* at the dose of 2 mg/ear exhibited better anti-inflammatory effect than indomethacin at the same dose of 2 mg/ear with a statistical significant difference. Therefore, in new studies, it is mandatory to evaluate each component independently and in different doses, looking for to propose a new anti-inflammatory drug. In addition, further investigations should provide additional biochemical data to elucidate the precise cellular mechanisms of the anti-inflammatory compounds identified, which could reveal a new therapeutic strategy for the treatment of inflammatory diseases.

Acknowledgments

We acknowledge M.V.Z. Rocio González V, head in chief of the laboratory-animal center at UAM-I, for her enthusiastic collaboration and technical help in this study. This research was partially supported by CONACyT. We gratefully acknowledge the Ph. D. Scholarship CONACyT, Fundación TELMEX and PROMEP-SEP.

Author Contributions

Ana del Carmen Susunaga-Notario and Ana Laura López-López: Execution of research protocol; Salud Pérez-Gutiérrez and Miguel Ángel Zavala-Sánchez: Chemical purification. Julio Cesar Almanza-Pérez: Statistical analysis of data. Atilano Gutiérrez-Carrillo and Daniel Arrieta-Baez: Chemical characterization. Rubén Román Ramos, José Luis Eduardo Flores Saénz and Francisco Javier Alarcón-Aguilar: General design of the research protocol and analysis of pharmacological data.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Galli, S.J.; Tsai, M.; Piliponsky, A.M. The development of allergic inflammation. *Nature* **2008**, *454*, 445–454.
2. Julián-González, R.E.; Orozco-Covarrubias, L.; Durán-McKinster, C.; Palacios-Lopez, C.; Ruiz-Maldonado, R.; Sáes-de-Ocariz, M. Less common clinical manifestations of atopic dermatitis: Prevalence by age. *Pediatr. Dermatol.* **2012**, *29*, 580–583.
3. Kim, H.O.; Kim, J.H.; Cho, S.I.; Chung, B.Y.; Ahn, I.S.; Lee, C.H.; Park, C.W. Improvement of atopic dermatitis severity after reducing indoor air pollutants. *Ann. Dermatol.* **2013**, *25*, 292–297.
4. Wollenberg, A.; Ehmann, L.M. Long term treatment concepts and proactive therapy for atopic eczema. *Ann. Dermatol.* **2012**, *24*, 253–260.
5. Guatam, R.; Jachak, S.M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med. Res. Rev.* **2009**, *29*, 767–820.
6. Palfreeman, A.C.; McNamee, K.E.; McCann, F.E. New developments in the management of psoriasis and psoriatic arthritis: A focus on apremilast. *Drug Des. Devel. Ther.* **2013**, *7*, 201–210.
7. Morgan, M.S.; Arlian, L.G.; Markey, M.P. *Sarcoptes scabiei* mites modulate gene expression in human skin equivalents. *PLoS One* **2013**, *8*, e71143.
8. Sinha, M.; Guatam, L.; Shukla, P.K.; Kaur, P.; Sharma, S.; Singh, T.P. Current perspectives in NSAID-induced gastropathy. *Mediat. Inflamm.* **2013**, *2013*, 2582209:1–2582209:11.
9. Irwin, H.S.; Barneby, R.C. The American Cassiinae: A Synoptical Revision of Leguminosae tribe Cassieae subtribe Cassiinae in the New World. *Memoir. N. Y. Bot. Gard.* **1982**, *35*, 1–918.
10. Randell, B.R.; Barlow, B.A. Senna. In *Flora of Australia*; CSIRO: Melbourne, Australia, 1998; Volume 12, pp. 89–138.
11. Boni, A.R.; Yapi, H.F.; Zirihi, G.N.; Bidie, A.P.; Djaman, A.J.; Niamke, L.S.; N’guessan, J.D. Comparison of antioxidant activity and total phenolic content of aqueous extracts of six Ivorian medicinal plants: *Ageratum conyzoides*, *Alchornea cordifolia*, *Amaranthus spinosus*, *Cassia occidentalis*, *Chromolaena odorata* and *Spondias mombin*. *Arch. Pharm. Sci. Res.* **2010**, *2*, 337–342.
12. Iwuanyanwu, P.; Kingsley, C.; Onyeike, E.N.; Ahsana, D. Anti-inflammatory effect of crude methanolic extract and fractions of ringworm plant *Senna alata* (L. Roxb) leaves. *Pharm. Sin.* **2011**, *2*, 9–16.
13. Rao, S.; Suresh, C. Phytochemical analysis and *in vitro* efficacy of two edible Cassia species on selected human pathogens. *Intern. J. Pharm. Sci. Res.* **2012**, *3*, 4982–4988.
14. Dave, H.; Ledwani, L. A review on anthraquinones isolated from Cassia species and their applications. *Int. J. Nat. Prod. Res.* **2012**, *3*, 291–319.
15. Da Silva, K.A.; Manjavachi, M.N.; Paszcuk, A.F.; Pivatto, M.; Viegas, C., Jr.; Bolzani, V.S.; Calixto, J.B. Plant derived alkaloid (–)-cassine induces anti-inflammatory and anti-hyperalgesic effects in both acute and chronic inflammatory and neuropathic pain models. *Neuropharmacology* **2012**, *62*, 967–977.

16. Sheeba, R.M.; Emmanuel, S.; Sreekanth, M.R. Evaluation of the antipyretic and anti-inflammatory activities of methanolic fraction and chrysofenol of *Cassia occidentalis* Linn. *Res. J. Pharm. Tech.* **2010**, *3*, 888–893.
17. Choudhary, M.; Gulia, Y. *Cassia tora*: Its chemistry, medicinal uses and pharmacology. *Pharmacologyonline* **2011**, *3*, 78–96.
18. Amallesh, S.; Gouranga, D.; Soma, G.; Durbadal, O. *In vivo & in vitro* anti-inflammatory activity of the methanolic extract and isolated compound from the leaves of *Cassia tora* L. (Leguminosae/caesalpinaceae). *J. Pharm. Res.* **2011**, *4*, 1999–2002.
19. Sermakkani, M.; Thangapandian, V. GC-MS analysis of *Cassia italica* leaf methanol extract. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* **2012**, *5*, 90–94.
20. Bhalodia, N.R.; Acharya, R.N.; Shukla, V.J. Evaluation of *in vitro* antioxidant activity of hydroalcoholic seed extracts of *Cassia fistula* Linn. *Free Rad. Antiox.* **2011**, *1*, 68–76.
21. Abdul, L.; Abdul, R.; Sukul, R.R.; Nazish, S. Anti-inflammatory and antihistaminic study of a Unani eye drop formulation. *Ophthalmol. Eye Dis.* **2010**, *2*, 17–22.
22. Basha, S.I.; Somashekara, S.C.; Govindadas, D.; Naidu, D.C.M.; Devasankaraiah, G.; Mohato, R.; Yadav, K.C.H. Anti-inflammatory activity of *Cassia occidentalis* seeds in albino rats. *J. Nat. Pharm.* **2011**, *2*, 88–91.
23. Ekwueme, F.N.; Oje, O.A.; Nwodo, O.F.C.; Ozoemena, N.F. Anti-inflammatory capacity of the aqueous leaf extract of *Senna mimosoides* on inhibition of rat oedema, platelet aggregatory activity and prostaglandin synthase activity. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 3028–3036.
24. Ntandou, N.G.F.; Banzouzi, J.T.; Mbatchi, B.; Elion-Itou, R.D.; Etou-Ossibi, A.W.; Ramos, S.; Benoit-Vical, F.; Abena, A.A.; Ouamba, J.M. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. *J. Ethnopharmacol.* **2009**, *127*, 108–111.
25. Balunas, M.J.; Kinghorn, D.A. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci.* **2005**, *78*, 431–441.
26. Calixto, J.B.; Campos, M.M.; Otuki, M.F.; Santos, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med.* **2004**, *70*, 93–103.
27. Perez, R.M. Anti-inflammatory activity of compounds isolated from plants. *Sci. World J.* **2001**, *29*, 713–784.
28. Marín, C.J.; Nieto, A.; Cespedes, C.L. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Pittocaulon* species from Mexico. *Pharm. Biol.* **2013**, *51*, 260–266.
29. Bautista, A.; Amaud, M.R.; Martínez, G.A.; Sánchez, P.S.; Pacheco, P. The traditional medicinal and food uses of four plants in Oaxaca, Mexico. *J. Med. Plants Res.* **2011**, *5*, 3404–3411.
30. Flora de la Península de Yucatán. Available online: <http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/> (accessed on 13 July 2014).
31. Flores, J.S. Leguminosae, florística, etnobotánica y ecología. In *Etnoflora Yucateense: Fascículo 18*; Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science-University of Yucatan: Mérida, México, 2001.
32. Mena, J.G.; Pech, S.G.; Brito, L. Anthraquinones from *Senna villosa* Mill. *Rev. Latinoam. Quím.* **1997**, *25*, 128–131.

33. Polanco, G.; Escalante, F.; García, K.; Acosta, V.K.; Chan, M.J.; Sagua, H.; González, J.; Osorio, L.; Moo, R.E.; Peña, L.M. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal of native plants from the Yucatan Peninsula. *Parasitol. Res.* **2012**, *110*, 31–35.
34. Jiménez, M.; Guzmán, E.S.; Pérez, M.S.; Polanco, G.; Acosta, K. Antitrypanosomal activity of *Senna villosa* in infected BALB/c mice with *Trypanosoma cruzi* during the sub acute phase of infection. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2011**, *8*, 164–169.
35. Jiménez, M.; Acosta, K.; Pérez, M.S.; Guzmán, E.S. *In vivo* activity of (8-hydroxymethylen)-treicosanyl acetate againsts *Trypanosoma cruzi* during acute phase of the infection. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **2011**, *8*, 198–207.
36. Jiménez, M.; Acosta, K.; Guzmán, E.S.; Pérez, C.; Pérez, M.S. Anti-trypanosomal activity of (8-hydroxymethylen)-treicosanyl acetate against infective forms of *Trypanosoma cruzi*. *Pharm. Biol.* **2010**, *48*, 666–671.
37. Guzmán, E.S.; Pérez, C.; Zavala, M.A.; Pérez, M.S. Antiprotozoal activity of (8-hydroxymethylen)-treicosanyl acetate isolated from *Senna villosa*. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 892–895.
38. Calzada, F.; Yépez, M.; Aguilar, A. *In vivo* susceptibility of *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *108*, 367–370.
39. Trepicchio, W.L.; Ozawa, M.; Walters, I.B.; Kikuchi, T.; Gilleaudeau, P.; Bliss, J.L.; Schwertschlag, U.; Dorner, A.J.; Krueger, J.G. Interleukin-11 therapy selectively downregulates type I cytokine proinflammatory pathways in psoriasis lesions. *J. Clin. Invest.* **1999**, *104*, 1527–1537.
40. Van Arman, C.G. Anti-inflammatory drugs. *Clin. Pharmacol. Ther.* **1974**, *16*, 900–904.
41. Young, J.M.; Spires, D.A.; Bedord, C.J.; Wagner, B.; Ballaron, S.J.; de Young, L.M. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.* **1984**, *82*, 367–371.
42. Young, J.M.; Wagner, B.M.; Spires, D.A. Tachyphylaxis in 12-O-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *J. Invest. Dermatol.* **1983**, *80*, 48–52.
43. Carlson, R.P.; O'Neill-Davis, L.; Chang, J.; Lewis, A.J. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase and inhibitors and other pharmacological agents. *Agents Actions* **1985**, *17*, 197–204.
44. De Young, L.M.; Kheifets, J.B.; Ballaron, S.J.; Young, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions* **1989**, *26*, 335–341.
45. Kotyuk, B.; Raychaudhuri, A.; DiPasquale, G. Effect of anti-inflammatory compounds on edema formation and myeloperoxidase activity in the arachidonic acid-induced ear model in the mouse. *Agents Actions* **1993**, *39*, C46–C48.
46. Rao, T.S.; Currie, J.L.; Schaffer, A.F.; Isakson, P.C. Comparative evaluation of arachidonic acid (aa)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation* **1993**, *17*, 723–741.
47. Tramposch, K.M. Skin inflammation. In *In Vivo Models of Inflammation*; Morgan, D.W., Marshall, L.A., Eds.; Birkhäuser Verlag: Basel, Switzerland, 1999; pp. 179–204.
48. Crowle, A.J. Delayed hypersensitive in the mouse. *Adv. Immunol.* **1975**, *20*, 197–264.

49. Garrigue, J.L.; Nicolas, J.F.; Fragninals, R.; Benezra, C.; Bour, H.; Schmitt, D. Optimization of the mouse ear swelling test for *in vivo* and *in vitro* studies of weak contact sensitizers. *Contact Dermat.* **1994**, *30*, 231–237.
50. Saint-Mezard, P.; Krasteva, M.; Chavagnac, C.; Bosset, S.; Akiba, H.; Kehren, J.; Kanitakis, J. Afferent and efferent phases of allergic contact dermatitis (ACD) can be induced after a single skin contact with haptens: Evidence using a mouse model of primary ACD. *J. Invest. Dermatol.* **2003**, *120*, 641–647.
51. Gábor, M. Models of acute inflammation in the ear. *Methods Mol. Biol.* **2003**, *225*, 129–137.
52. Gröne, A. Keratinocytes and cytokines. *Vet. Immunol. Immunop.* **2000**, *88*, 1–12.
53. Liu, W.S.; Heckman, C.A. The sevenfold way of PKC regulation. *Cell. Signal.* **1998**, *10*, 529–542.
54. Loret, S.; Moreno, J.J. Effects of an anti-inflammatory peptide (Antiflammin 2) on cell influx, eicosanoid biosynthesis and oedema formation by arachidonic acid and tetradecanoyl phorbol dermal application. *Biochem. Pharmacol.* **1995**, *50*, 347–353.
55. Bradley, P.B.; Pribat, D.A.; Christensen, R.O.; Rothstein, G. Measurement of cutaneous inflammation: Estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J. Invest. Dermatol.* **1982**, *78*, 206–209.
56. Griffiths, R.J.; Wood, B.E.; Li, S.; Blackham, A. Pharmacological modification of 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation and epidermal cell proliferation in mouse skin. *Agents Actions* **1988**, *25*, 344–351.
57. Reynolds, N.J.; McCombie, S.W.; Shankar, B.B.; Bishop, W.R.; Fisher, G.J. SCH 47112, a novel staurosporine derivative, inhibits 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and epidermal hyperplasia in hairless mouse skin. *Arch. Dermatol. Res.* **1997**, *289*, 540–546.
58. Wang, H.Q.; Smart, R.C. Overexpression of protein kinase C- α in the epidermis of transgenic mice results in striking alterations in phorbol ester-induced inflammation and COX-2, MIP-2 and TNF- α expression but not tumor promotion. *J. Cell Sci.* **1999**, *112*, 3497–506.
59. Jansen, A.P.; Dreckschmidt, N.E.; Verwiebe, E.G.; Wheeler, D.L.; Oberley, T.D.; Verma, A.K. Relation of the induction of epidermal ornithine decarboxylase and hyperplasia to the different skin tumor-promotion susceptibilities of protein kinase C α , δ and ϵ transgenic mice. *Int. J. Cancer* **2001**, *95*, 635–643.
60. Hara, T.; Saito, Y.; Hirai, T.; Nakamura, K.; Nakamura, K.; Nakao, K.; Katsuki, M.; Chida, K. Deficiency of protein kinase C α in mice results in impairment of epidermal hyperplasia and enhancement of tumor formation in two-stage skin carcinogenesis. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7356–7362.
61. Jetten, A.M.; George, M.A.; Pettit, G.R.; Herald, C.L.; Rearick, J.I. Action of phorbol esters, bryostatins, and retinoic acid on cholesterol sulfate synthesis: Relation to the multistep process of differentiation in human epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **1989**, *93*, 108–115.
62. Dlugosz, A.A.; Yuspa, S.H. Coordinate changes in gene expression which mark the spinous to granular cell transition in epidermis are regulated by protein kinase C. *J. Cell Biol.* **1993**, *120*, 217–225.
63. Wilmer, J.L.; Burleson, F.G.; Kayama, F.; Kanno, J.; Luster, M.I. Cytokine induction in human epidermal keratinocytes exposed to contact irritants and its relation to chemical-induced inflammation in mouse skin. *J. Invest. Dermatol.* **1994**, *102*, 915–922.

64. Redondo, P.; García, J.; Espana, A.; Cuevillas, F.; Quintanilla, E. Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expression in keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. *Exp. Dermatol.* **1997**, *6*, 186–194.
65. Murakawa, M.; Yamaoka, K.; Tanaka, Y.; Fukuda, Y. Involvement of tumornecrosis factor (TNF)-alpha in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. *Biochem. Pharmacol.* **2006**, *71*, 1331–1336.
66. Chan, R.A. Búsqueda de compuestos con actividad antitripanosoma en las hojas de *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwing & Barneby. Master's Thesis, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México, 2008.
67. Baquedano, M.A. Evaluación citotóxica y determinación del perfil de los ácidos grasos del aceite extraído de las semillas de *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwing & Barneby. Master's Thesis, Universidad Autónoma de Yucatán, Yucatán, México, 1999.
68. Narasimham, B.; Mourya, V.; Dhake, A. Design, synthesis, antibacterial, and QSAR studies of myristic acid derivatives. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16*, 3023–3029.
69. NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Available online: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> (accessed on 13 July 2014).
70. Bauer, D.J. *Métodos y Diagnósticos Del Laboratorio Clínico*, 8th ed.; Médica Panamericana: Buenos Aires, Argentina, 1983; pp. 581–597.

Sample Availability: Samples of the compounds are available from the authors.

© 2014 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).