

T
933

26523



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN: FITOFARMACOLOGÍA.

**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTINOCICEPTIVA
DE TRES PLANTAS UTILIZADAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL”**

COMUNICACIÓN IDÓNEA DE RESULTADOS PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA:

Q.F.B. ANA DEL CARMEN SUSUNAGA NOTARIO

MATRÍCULA: 207280459

COMITÉ TUTORAL

CO-TUTORA: DRA. MARÍA SALUD PÉREZ

CO-TUTOR: DR. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ MUÑOZ

ASESOR: DR. MIGUEL ÁNGEL ZAVALA SÁNCHEZ

JUNIO, 2009

"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
Y ANTINOCICEPTIVA DE TRES PLANTAS UTILIZADAS
EN LA MEDICINA TRADICIONAL"

COMITÉ TUTORAL

Vo.Bo.

CO-TUTORA: DRA. MARIA SALUD PÉREZ

CO-TUTOR: DR. FRANCISCO JAVIER LÓPEZ MUÑOZ

ASESOR: DR. MIGUEL ÁNGEL ZAVALA SÁNCHEZ

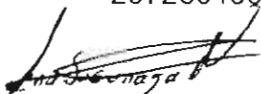
PRESENTA:

Q.F.B. ANA DEL CARMEN SUSUNAGA NOTARIO

MATRÍCULA:

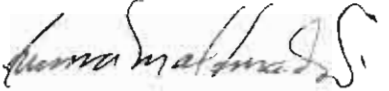
207280459

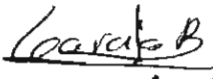
FIRMA

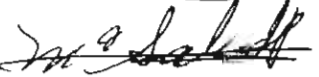


"EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA
Y ANTINOCICEPTIVA DE TRES PLANTAS UTILIZADAS
EN LA MEDICINA TRADICIONAL"

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO:

PRESIDENTA: M. EN C. EMMA MALDONADO JIMÉNEZ 

VOCAL: DRA. ROSA VIRGINIA GARCÍA RODRÍGUEZ 

SECRETARIA: DRA. MARÍA SALUD PÉREZ GUTIÉRREZ. 

Resumen:

La inflamación es una respuesta defensiva fisiológica, a través de la cual un tejido vascularizado responde a los estímulos internos o externos que han lesionado su integridad. La inflamación aguda es la respuesta temprana (casi inmediata) a la lesión. Y la inflamación crónica es una infiltración de células mononucleares (macrófagos) y linfocitos,

Según la *International Association for the Study of Pain* (IASP) define el dolor como “una experiencia sensorial y emocional desagradable, vinculada con la lesión real o potencial de tejidos o descrita en términos de dicho daño”.

Dentro de las herramientas farmacológicas para tratar los padecimientos relacionados con dolor e inflamación, se encuentran los antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales (AINEs). Sin embargo los AINEs, tienen la desventaja de que su uso prolongado puede producir: úlcera gástrica, bloqueo de la agregación plaquetaria, inhibición de la motilidad uterina, prolongando el periodo de gestación y también inhibición de la función renal. Por esta razón resulta importante realizar la búsqueda de nuevos compuestos que reduzcan los efectos adversos que presentan estos medicamentos.

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. Es por ello que en el presente trabajo se realizó el estudio de los efectos: antinociceptivo (analgésico) y antiinflamatorio de *Eupatorium glabratum*, *Senna villosa* y *Hesperozygis marifolia* plantas utilizadas en la medicina tradicional mexicana. Se obtuvo el aceite esencial de *Hesperozygis marifolia*, se determinó su composición y se evaluaron dos de sus componentes mayoritarios. Resultados: los extractos clorofórmicos de *Senna villosa*, *Eupatorium glabratum* y *Hesperozygis marifolia* tienen actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA y en el de edema inducido con carragenina. El aceite esencial de *Hesperozygis marifolia* y sus componentes mayoritarios R-pulegona e isomentona no presentaron actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con TPA administrados tópicamente, sin embargo en el modelo de edema inducido

con carragenina; cuando la administración es intraperitoneal el aceite esencial y la R-pulegona sí presenta actividad significativa.

Los extractos clorofórmicos de *Senna villosa* y *Eupatorium glabratum* no presentaron actividad antinociceptiva en el modelo PIFIR, sin embargo la R-pulegona sí presenta este efecto.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES:

A LA UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO
POR SER MI CASA DE ESTUDIOS

A LA MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS DE LA UNIVERSIDAD
AUTONOMA METROPOLITANA

AL CINVESTAV SEDE SUR POR TODAS LAS FACILIDADES PRESTADAS A LO
LARGO DE ESTE TRABAJO.

MI TOTAL RECONOCIMIENTO AL CONACYT POR LA BECA ECONÓMICA,
OTORGADA PARA LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES:

Comenzaré agradeciéndole a Dios por permitirme realizar un sueño más.

A mi familia: mamá gracias por creer y apoyar mis sueños, papá por ser quien eres y Roberto por estar siempre conmigo para escucharme y sostenerme.

A mi comité Tutorial: Dra. Salud gracias por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo, por la paciencia, y confianza brindada a lo largo de todo este tiempo. No tengo como agradecerle sus consejos y apoyo brindados tanto en mi vida personal como profesional. Dr. Francisco le agradezco de todo corazón la paciencia brindada a lo largo de este tiempo. Dr. Miguel Ángel que le puedo decir.... Gracias por no dejarme renunciar a este hermoso sueño de haber realizado mi maestría. De nuevo gracias por creer y confiar en mí, por ser mi amigo y estar en esta etapa de mi vida. Aunque pasen los años seguiré peleada con los puntos y comas.

A los miembros de mi Jurado: Maestra Emma mil gracias por todos sus comentarios que enriquecieron de manera significativa este trabajo, por su interés y paciencia en la revisión del escrito. Dra. Rosy, amiga, consejera y verdugo gracias por todo tu apoyo, consejos y entusiasmo a lo largo de todo este tiempo; sin tu amistad no hubiera podido terminar este hermoso sueño.

A mis amigos: Juventino la maestría no hubiese sido lo mismo sin ti gracias por TODO tu apoyo. Julio, Diana y Valeria mis niños queridos gracias por soportar los momentos de crisis. Miguel gracias por estar en todo momento. A todos los niños y niñas COPLADA, Lety gracias por escucharme cuando ni yo podía hacerlo, Gaby me recordaste lo hermosa que es la vida, Rebe siempre me brindaste el abrazo de consuelo en los malos momentos Luis que te puedo decir te debo horas de terapia gracias por escucharme y no juzgarme. A todos mis amigos de BIOTERIO por las facilidades y apoyo brindado a lo largo de esta etapa. Perdón por los que no mencione pero gracias a cada uno de todos mis amigos que fueron parte fundamental de esta etapa.

A mis angelitos: Abuelito Odilón te extrañó mucho, Tía Bety y abuelita Dominga gracias por cuidarme desde el cielo yo se que no estoy sola.

ÍNDICE:

Introducción	1
Marco teórico	2
Inflamación	3
Inflamación aguda	4
• Etapa vascular	6
• Etapa celular	6
Células inflamatorias	6
• Granulocitos	6
• Agranulocitos o Fagocitos mononucleares	8
• Acontecimientos celulares.	9
Mediadores inflamatorios	9
• Aminas vasoactivas	11
• Proteasas plasmáticas	12
• Metabolitos del Ácido araquidónico: prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas.	13
• Factor activador de plaquetas	15
• Citocinas	16
• Quimiocinas	17
• Oxido nítrico	17
Inflamación crónica	17
• Inflamación crónica inespecífica	18
• Inflamación granulomatosa	18
Manifestaciones locales de la inflamación	18
Manifestaciones sistémicas de la inflamación	19
Dolor	19

Dolor agudo	20
Dolor crónico	21
Dolor somático o nociceptivo	22
Dolor neuropático	24
Dolor inflamatorio	25
Dolor psicogénico	26
Tratamiento farmacológico para la inflamación y el dolor.	26
Efectos adversos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la inflamación y el dolor	29
Modelos experimentales para la evaluación de la inflamación y nocicepción.	
Evaluación de actividad antiinflamatoria	
Modelos de inflamación aguda	
• Edema auricular inducido con TPA	30
• Edema inducido con carragenina	32
Modelo de inflamación crónica	
• Edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA	33
Evaluación de la actividad antinociceptiva	
• Disfunción inducida por dolor en ratas (modelo PIFIR)	34
Herbolaria en el tratamiento de la inflamación y el dolor	35
Descripción de las especies vegetales estudiadas	
• <i>Eupatorium glabratum</i> H.B.K.	35

• <i>Senna villosa</i> Mill	36
• <i>Hesperozygis marifolia</i> Epling	38
Planteamiento del problema	39
Hipótesis	40
Objetivo general	40
Objetivos específicos	40
Metodología	
• Material biológico	41
• Preparación de los extractos	41
• Obtención del aceite esencial de <i>Hesperozygis marifolia</i>	41
• Identificación del enantiómero R-pulegona	42
• Reactivos utilizados	42
• Animales	43
• Evaluación de la actividad antiinflamatoria	
○ Inflamación aguda	
▪ Edema inducido por TPA.	43
▪ Edema inducido con carragenina	44
○ Inflamación crónica	
▪ Edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA	45
• Evaluación de la actividad antinociceptiva	
○ Disfunción inducida por dolor en ratas (modelo PIFIR)	46
• Análisis estadístico	46

Resultados

- Evaluación de la actividad antiinflamatoria
 - Inflamación aguda
 - Edema inducido por TPA 47
 - Edema inducido con carragenina 60
 - Inflamación crónica
 - Edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA 76
- Evaluación de la actividad antinociceptiva
 - Disfunción inducida por dolor en ratas (modelo PIFIR) 78

Discusión 81

Conclusiones 85

Bibliografía 86

INTRODUCCIÓN

Las patologías relacionadas con la inflamación y el dolor de las articulaciones, sobre todo la espondilitis anquilosante, la gota, la artritis reumatoide y la artritis infantil, amenazan con ser un problema de salud pública ya que afectan a entre cinco y diez por ciento de la población mundial y, aunque son comunes, sus causas aún son desconocidas por lo que los tratamientos no son funcionales. Estas reducen la capacidad laboral de las personas afectadas; incluso, en su fase aguda, éstas pueden ver disminuida su movilidad; son patologías crónicas, degenerativas y que 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 (Boletín UNAM, 2009). Dentro de las herramientas farmacológicas para tratar los padecimientos relacionados con dolor e inflamación, se encuentran los antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales (AINEs). Sin embargo los AINEs, tienen la desventaja de que su uso prolongado puede producir: úlcera gástrica, bloqueo de la agregación plaquetaria, inhibición de la motilidad úterina, prolongando el periodo de gestación y también inhibición de la función renal (Hardman y col. 1996). Mientras que los fármacos esteroidales también presentan efectos indeseables (como estreñimiento, sedación, depresión respiratoria, alucinaciones) que pueden resultar molestos o peligrosos para el paciente (Mycek y col., 2004).

Actualmente, la investigación encaminada al desarrollo y búsqueda de nuevos fármacos encuentra en las plantas una fuente promisoría para alcanzar sus fines. 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 (Bluter, 2004). En el presente trabajo se realizó el estudio de los efectos: antinociceptivo (analgésico) y antiinflamatorio de las especies *Eupatorium glabratum*, *Senna villosa* y *Hesperozigys marifolia* utilizadas en la medicina tradicional mexicana (Guzmán y col., 2008; Calzada y col., 2006; Villavicencio y col., 2002).

MARCO TEÓRICO

Inflamación.

Las enfermedades caracterizadas por la inflamación son una importante causa de mortalidad y morbilidad en humanos. La inflamación es una respuesta defensiva fisiológica, 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, y ocasionales macrófagos y linfocitos residentes. (Abul y Abbas, 2004).

La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas aguda y crónica. La acumulación y subsecuente activación de leucocitos es el evento central en la patogénesis de todas las formas de inflamación.

Las inflamaciones aguda y crónica son amplificadas y propagadas como resultado del reclutamiento de componentes humorales y celulares del sistema inmune. Inmunológicamente la eliminación del material causante de la inflamación está mediada por una serie de pasos:

- Reconocimiento: éste puede ser específico o no específico.
 - El reconocimiento específico es mediado por inmunoglobulinas (anticuerpos) o por receptores de linfocitos T.
 - El reconocimiento no específico (reconocimiento de proteínas desnaturalizadas o endotoxinas) puede ser 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).

Inflamación aguda.

La inflamación aguda es la respuesta temprana (casi inmediata) a la lesión. Es inespecífica y puede ser inducida por cualquier lesión de corta duración; está destinada a eliminar el agente agresor y limitar la magnitud del daño tisular. La descripción clásica de la inflamación aguda ha evolucionado a través de los años. En el siglo I DC el médico romano Celso describió la reacción local de la lesión en términos de lo que ahora se conoce como signos cardinales de la inflamación, los cuales son:

- Rubor (enrojecimiento)
- Tumor (tumefacción)
- Calor
- Dolor

En el siglo II DC el médico griego Galeno agregó un quinto signo

- Pérdida de la función (Mattson, 2006; Ley, 2001).

Aunque es probable que muchos agentes causen una herida, como los microorganismos, el frío, el calor, energía radiante, químicos, electricidad o un trauma mecánico, la respuesta inflamatoria a todas estas causas es similar. La respuesta inflamatoria moviliza las defensas del cuerpo, aísla y destruye los microorganismos u otros agentes dañinos, luego remueve los materiales extraños y las células dañadas para que se realice el proceso de reparación del tejido. La inflamación se acompaña de tres eventos característicos: dilatación capilar para aumentar el flujo sanguíneo, cambios en la estructura microvascular facilitando de esta manera el paso de proteínas plasmáticas y de leucocitos desde el torrente

circulatorio, migración y acumulación de leucocitos en la zona afectada (Ley, 2001; Tracey, 2002; Murphy y cols., 2003).

La inflamación aguda 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.

Etapas 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.

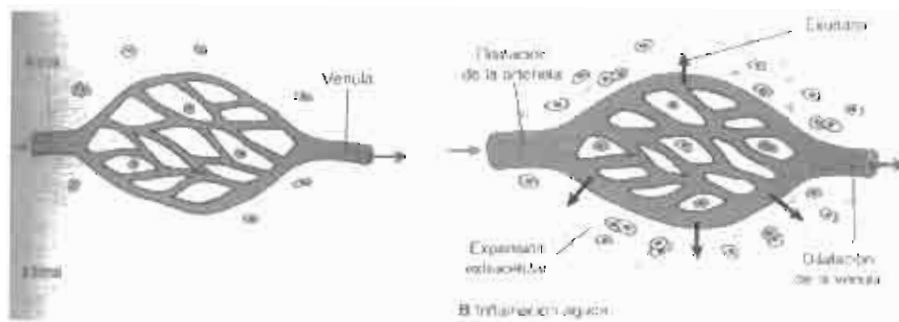


Figura 1 Fase vascular de la inflamación aguda. A lecho capilar normal. B inflamación aguda con dilatación vascular que causa aumento del enrojecimiento (eritema) y calor. Movilización del líquido en los espacios intersticiales (tumefacción) y extravasación de proteínas plasmáticas en los espacios extracelulares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

Cambios en 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 (suele durar unos pocos segundos) de vasoconstricción arteriolar, 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 de 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 (Zambrano, 2007).

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.

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.

Etapas celulares.

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, algunas residen por periodos prolongados en tejidos normales; otras son células circulantes que penetran en los tejidos sólo durante el transcurso de una respuesta inflamatoria. En la respuesta inflamatoria aguda participan dos tipos de leucocitos: granulocitos y monocitos. Aunque la atención se ha centrado en el reclutamiento de leucocitos de la sangre, una respuesta rápida también requiere la liberación de mediadores químicos a partir de las células centinela (mastocitos y macrófagos) que están preposicionados en los tejidos (Terr, 1994)

Células inflamatorias

Los glóbulos blancos o leucocitos se clasifican como granulares o agranulares. Los granulocitos incluyen a los neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los leucocitos agranulares incluyen a los linfocitos y monocitos.

Granulocitos

Son identificables debido a sus gránulos citoplásmicos característicos. Estos glóbulos blancos tienen núcleos multilobulados distintivos. Los granulocitos se dividen en tres tipos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) de acuerdo con las propiedades tintoriales de los gránulos cuando se tratan con un colorante policromático como el de Wright o el de Giemsa (figura 2).

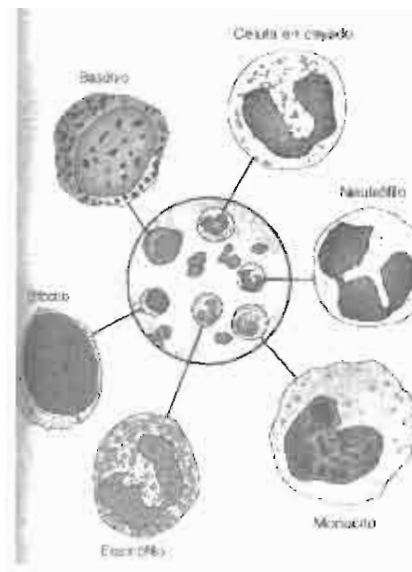


Figura 2 Glóbulos blancos

El neutrófilo es el primer fagocito que llega al sitio de la inflamación, por lo general dentro de los 90 minutos de producida la lesión. Sus gránulos citoplasmáticos, contienen enzimas y otras sustancias antibacterianas que se utilizan para la destrucción y degradación de las partículas internalizadas. Los neutrófilos también tienen vías metabólicas dependientes de oxígeno que generan compuestos derivados del oxígeno y del nitrógeno que son tóxicos. Los neutrófilos cuyos núcleos presentan tres a cinco lóbulos, se denominan neutrófilos polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos segmentados. Los recuentos de neutrófilos en la sangre suelen aumentar mucho durante el proceso inflamatorio, en especial los producidos por infecciones bacterianas. Después de ser liberados desde la médula ósea los neutrófilos tiene una vida media de alrededor de 10 horas y por consiguiente deben de ser reemplazados en forma constante para que su cantidad siga siendo adecuada. Esto requiere un aumento de glóbulos blancos circulantes, en un fenómeno conocido como leucocitosis. Cuando existe una demanda excesiva de fagocitos, se liberan formas inmaduras de neutrófilos desde la médula ósea. Estas células inmaduras suelen denominarse en banda o en cayado debido a la forma en herradura de sus núcleos.

Los gránulos citoplasmáticos de los eosinófilos regulan la inflamación y las reacciones alérgicas mediante el control de la liberación de mediadores químicos específicos durante estos procesos.

Los gránulos de los basófilos, contienen histamina y otros mediadores bioactivos de la inflamación. Los basófilos participan en la producción de los síntomas asociados con la inflamación y las reacciones alérgicas (Abul y Abbas, 2004; Roitt y col., 1993; Robbins C., 1995 y Mattson., 2006).

Agranulocitos o Fagocitos mononucleares

Los monocitos son los glóbulos blancos de mayor tamaño y constituyen del 3% al 8% de los leucocitos totales en sangre. La vida media de los monocitos circulantes dura de tres a cuatro veces más que la de los granulocitos y además, sobreviven durante un tiempo más prolongado en los tejidos. Estos fagocitos de larga vida ayudan a destruir el agente causal, contribuyen al proceso de señalización de la inmunidad específica y sirven para resolver el proceso inflamatorio. Los monocitos que migran en cantidades aumentadas a los tejidos en respuesta a los estímulos inflamatorios maduran hasta convertirse en macrófagos. En el transcurso de 24 horas las células mononucleares llegan al sitio inflamatorio y a las 48 horas los monocitos y macrófagos internalizan cantidades más grandes del agente causal de la inflamación que los neutrófilos. También migran a los ganglios linfáticos locales para comenzar la inmunidad específica. Estos leucocitos desempeñan un papel importante en la inflamación crónica porque pueden rodear el material extraño que no puede ser digerido y lo separan por medio de la formación de una pared.

Mastocitos: están ampliamente distribuidos en los tejidos conectivos de todo el cuerpo, tienen propiedades similares a las de los basófilos. Los mastocitos son especialmente prevalentes en las superficies mucosas de los tractos pulmonar y gastrointestinal y en la dermis de la piel.

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: (Abul y Abbas, 2004; Zambrano, 2007 y Stites, 1998)

- Marginación
- Migración
- Quimiotaxis
- Fagocitosis (figura 3)



Figura 3. Fase celular de la inflamación aguda. Marginación, migración, quimiotaxis y fagocitosis del neutrófilo.

Mediadores inflamatorios.

Tras haber descrito los acontecimientos de la inflamación se describirán los mediadores químicos que son la causa de dichos acontecimientos.

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.

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.

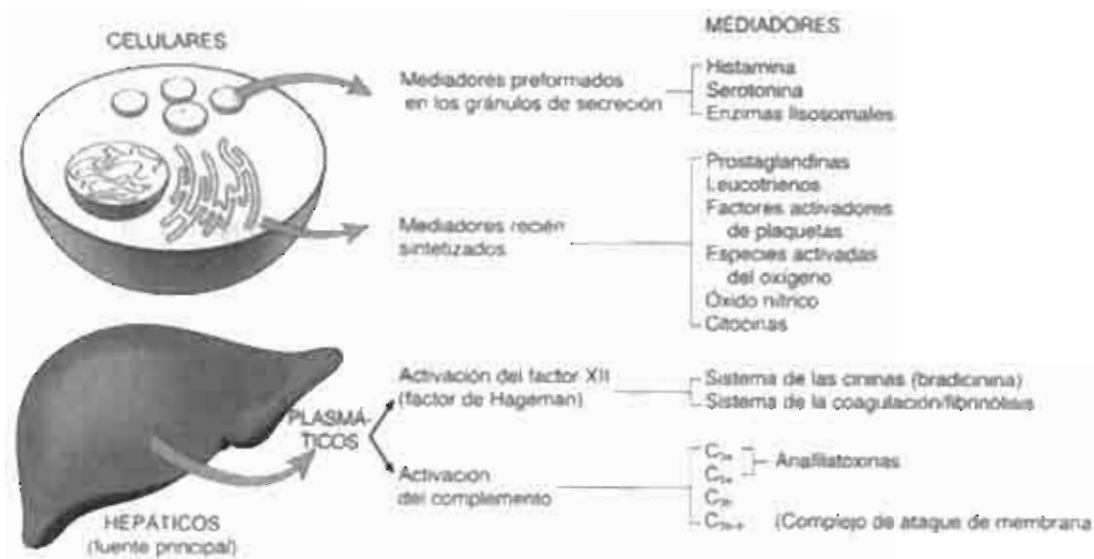


Figura 4. Mediadores químicos de la inflamación

La mayor parte de los mediadores realizan su actividad biológica uniéndose inicialmente a receptores específicos situados en las células diana.

Un mediador químico puede estimular la liberación de mediadores por parte de las propias células diana.

Los mediadores pueden actuar sobre uno o algunos tipos de células diana, o sobre múltiples tipos de células; a su vez, su efecto puede ser diferente según el tipo de célula y tejido sobre el que actúan.

Una vez activados y liberados de la célula, la mayoría de los mediadores duran poco tiempo (Gallin y col., 2002).

A continuación se describen los mediadores específicos más importantes.

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.

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., 2003).

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.

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 e 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.

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.

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.

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.

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; Rodríguez y col., 2005 y Mycek y col., 2004).

Metabolitos del ácido araquidónico: prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas. (Autocoides)

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. Los 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 hemostasis.

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 araquidato 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 prostanooides más importantes en la inflamación son PGE₂, PGD₂, PGF_{2α}, (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, 5-LO, 12-LO y 15-LO diferentes, 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 a 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 sí 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. (Hardman y col., 1996)

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.

Citocinas

Son proteínas producidas por muchos tipos celulares (principalmente, linfocitos y macrófagos activados, pero también células endoteliales, epiteliales y del tejido conjuntivo) que regulan la función de otros tipos celulares. Están implicadas en las respuestas inmunitarias celulares y producen efectos adicionales que desempeñan un papel importante en la inflamación aguda y crónica.

Las citocinas secretadas por los linfocitos se llaman linfocinas y las secretadas por los monocitos/macrófagos son las monocinas. Las citocinas constituyen un grupo de proteínas de bajo peso molecular (factores estimuladores, factores de crecimiento, interleucinas e interferones) que tienen como función establecer la comunicación entre las células. Con este propósito, estas proteínas se unen a receptores específicos localizados en la superficie de la célula blanco. La producción excesiva de citocinas proinflamatorias provoca que se den respuestas inflamatorias exacerbadas como ocurre en el caso de la Artritis Reumatoide. Las citocinas IL-1 y TNF- α se han vinculado con el proceso de la inflamación aguda y crónica, son producidas por los monocitos/macrófagos entre otras células y constituyen la primera línea de defensa contra los patógenos del sistema inmune innato (Fischer y cols., 1995; Wang, 1999; Arend, 2001). Ambas citocinas tienen efectos biológicos múltiples sobre múltiples células blanco. El interferón γ (IFN- γ) es otro ejemplo de citocina con actividad proinflamatoria, incrementa la actividad del TNF- α e induce la producción de óxido nítrico (NO). Por el contrario, las citocinas IL-4, IL-10 y la IL-13 son potentes antiinflamatorios y suprimen la acción de IL-1, TNF- α y de las quimiocinas. La IL-10 inhibe la síntesis de varias citocinas incluyendo al IFN- γ , IL-2, IL-3, TNF- α y GM-CS producidos por la activación de los macrófagos y por las células T cooperadoras, actúa además como un potente inmunosupresor (Cines y col., 1998 y Abul y Abbas, 2004).

Las quimiocinas

A su vez, 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).

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)

Inflamación crónica.

A diferencia de la inflamación aguda, que suele ser auto limitada y de corta duración, la inflamación crónica se auto perpetúa y puede durar semanas, meses e incluso años. Puede desarrollarse como resultado de un proceso inflamatorio agudo recurrente o progresivo o de respuestas a estímulos múltiples de baja intensidad que no evocan una respuesta aguda.

La característica de la inflamación crónica es una infiltración de células mononucleares (macrófagos) y linfocitos en lugar del aflujo de neutrófilos que suele observarse en la inflamación aguda. La inflamación crónica también implica la proliferación de fibroblastos en lugar de exudados. Como resultado el riesgo de cicatrización y deformidad suele ser considerado mayor que en la inflamación aguda. Los agentes que inducen a la inflamación crónica son sustancias irritantes persistentes de baja intensidad, que no pueden penetrar en profundidad ni diseminarse con rapidez. Entre las causas de la inflamación crónica figuran los

cuerpos extraños como el talco, la sílice, el asbesto y los materiales de sutura quirúrgica. La presencia de tejido lesionado como el que rodea una fractura en consolidación también puede inducir inflamación crónica. Se piensa que los mecanismos inmunitarios desempeñan un papel importante en la inflamación crónica. Los dos patrones de inflamación crónica son: una inflamación crónica inespecífica y la inflamación granulomatosa (Decker, 2000).

Inflamación crónica inespecífica.

Implica una acumulación difusa de macrófagos y linfocitos en el sitio de la lesión. La quimiotaxis continua causa la infiltración de macrófagos en el sitio inflamado, donde se acumulan debido a la supervivencia prolongada y a la inmovilización. Estos mecanismos conducen a la proliferación de los fibroblastos, con la formación posterior de cicatriz que en muchos casos reemplaza al tejido conectivo normal o los tejidos parenquimatosos funcionales de las estructuras afectadas (Robbins, 1995)

Inflamación granulomatosa.

Un granuloma es una lesión de 1 a 2 mm en la que hay un conglomerado de macrófagos rodeados por linfocitos. Estos macrófagos modificados se asemejan a las células epiteliales.

Este tipo de inflamación se asocia con cuerpos extraños como astillas, suturas, sílice y asbesto y microorganismos que causan tuberculosis, sífilis, sarcoidosis, infecciones micóticas profundas y brucelosis. Estos tipos de agentes tienen una característica común: son digeridos en forma deficiente y por lo general no son controlados con facilidad por otros mecanismos inflamatorios (García-Conde y col., 2004).

Manifestaciones locales de la inflamación

Las manifestaciones locales de la inflamación aguda o crónica dependen de su causa y del tejido particular afectado. Estas manifestaciones pueden variar desde

la tumefacción y formación de exudado a la formación de un absceso o de una úlcera.

La respuesta inflamatoria aguda se caracteriza por la producción de exudados, estos 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.

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 (Mattson, 2006).

Dolor

La subjetividad inherente del dolor constituye un impedimento fundamental para conocer en detalle sus mecanismos y su control. Las expresiones que cada persona emplea para describir lesiones semejantes suelen variar radicalmente, y para que se produzca la comunicación apropiada se necesita un lenguaje común y un sistema de clasificación utilizado de forma congruente. Los clínicos y los investigadores biomédicos suelen emplear diversos términos que a veces tienen significados idiosincráticos.

Según la *International Association for the Study of Pain* (IASP) se define el dolor como "una experiencia sensorial y emocional desagradable, vinculada con la lesión real o potencial de tejidos o descrita en términos de dicho daño".

El dolor se produce cuando llegan a distintas áreas corticales del Sistema Nervioso Central un número de estímulos suficientes a través de un sistema aferente normalmente inactivo, produciéndose no sólo una respuesta refleja, ni

sólo una sensación desagradable, sino una respuesta emocional con varios componentes:

- Componente sensorial - discriminativo: hace una referencia a cualidades estrictamente sensoriales del dolor, tales como su localización, calidad, intensidad y su característica tempo-espacial.
- Componente cognitivo - evaluativo: analiza e interpreta el dolor en función de lo que está sintiendo y lo que puede ocurrir.
- Componente afectivo – emocional: por el que la sensación dolorosa se acompaña de ansiedad, depresión, temor, angustia. Respuestas en relación con experiencias dolorosas previas, con la personalidad del individuo y con factores socio-culturales (López, 1996).

El dolor puede clasificarse según su evolución en agudo y crónico:

Dolor agudo: está caracterizado por un tiempo limitado y desaparece con la resolución del proceso patológico (Almeida y col., 2004); es desencadenado por la lesión de tejidos y por la activación de transductores nociceptivos en el sitio de daño local. La lesión local altera las características de la respuesta de los nociceptores y quizá sus conexiones con el sistema nervioso central y el autónomo en la región. En términos generales, el dolor agudo dura un lapso relativamente limitado y por lo común cede cuando se resuelve la alteración básica. Cuando está asociado a una enfermedad previene al individuo de que algo anda mal. En algunos casos, el dolor limita la actividad, previniendo un daño mayor o ayudando a la curación. Sin embargo, el dolor agudo persistente e intenso puede presentar efectos potencialmente dañinos que se manifiestan con una respuesta neuroendocrina generalizada a nivel de diversos sistemas (Cruciani y col., 2006).

En el mecanismo de dolor agudo la lesión tisular determina la liberación de mediadores inflamatorios con estimulación resultante de los nociceptores. Los impulsos nociceptivos se transmiten a neuronas del asta dorsal de la médula espinal y ascienden en el tracto espinotalámico hasta el sistema activador reticular

(SAR) y el tálamo. La percepción de la localización y la interpretación del significado del dolor tienen lugar en la corteza somatosensitiva (figura 5)



Figura 5 Mecanismos del dolor agudo.

Dolor crónico: dura largo tiempo o refleja niveles bajos de alteraciones fundamentales que no explican la presencia y extensión del dolor; puede reunir ambas características a la vez. La persistencia del estímulo, de la enfermedad, o de ciertas condiciones fisiopatológicas, puede conducir al establecimiento de un dolor crónico. Tiene efectos fisiológicos, psicológicos y conductuales sobre el paciente y su familia, además de un costo social enorme. Podría decirse que mientras el dolor agudo es un síntoma de una enfermedad o traumatismo, el dolor crónico constituye una enfermedad en sí mismo. La mayoría de los pacientes con dolor crónico no manifiestan las respuestas autonómicas y el patrón neuroendocrino característicos del dolor agudo, a menos que existan exacerbaciones. Cuando el dolor es continuo o casi continuo, la respuesta se extingue, apareciendo diversos cambios, muchos de ellos desencadenados por la inactividad que se observa frecuentemente en los pacientes con dolor crónico. Hay pérdida de masa y de coordinación muscular, osteoporosis, fibrosis y rigidez

articular. La menor fuerza muscular puede llevar a una alteración respiratoria restrictiva. Hay un aumento de la frecuencia cardíaca basal y una disminución de la reserva cardíaca. En el sistema digestivo se observa una disminución de motilidad y secreción, constipación y desnutrición. Con frecuencia se observa retención urinaria e infección. También suele haber depresión, confusión, alteraciones del sueño y disfunción sexual. La respuesta inmunitaria está alterada por el estrés y la desnutrición (Marchand y col., 2005; Cruciani y col., 2006).

- **Mecanismos del dolor somático, neuropático, inflamatorio y psicogénico**

Dolor somático o nociceptivo: es la respuesta normal del organismo a un daño o lesión y tiene por objetivo prevenir mayor daño; aparece cuando un estímulo potencialmente dañino para la integridad física excita los receptores nociceptivos. Estrictamente, debiera incluir el dolor originado en cualquier parte del cuerpo que no sean nervios o sistema nervioso central; sin embargo, frecuentemente se habla de dolor somático propiamente dicho cuando los receptores están en la piel, músculos o articulaciones, y de dolor visceral cuando los receptores activados por el estímulo están en una víscera. El dolor somático es habitualmente bien localizado y el paciente no tiene grandes dificultades en describirlo. El dolor visceral, en cambio, es frecuentemente menos localizado y puede ser referido a un área cutánea que tiene la misma inervación. El dolor nociceptivo ocurre como consecuencia de la activación de receptores específicos (“desnudos”) que no tienen protección mielínica ni estructuras adicionales especializadas. Los estímulos nocivos son traducidos en actividad eléctrica en las terminaciones periféricas de las fibras C sin cubierta de mielina y las fibras A δ . Esta actividad es conducida a la médula espinal y transmitida a la corteza y se produce así la sensación de dolor (figura 6).

Dolor nociceptivo

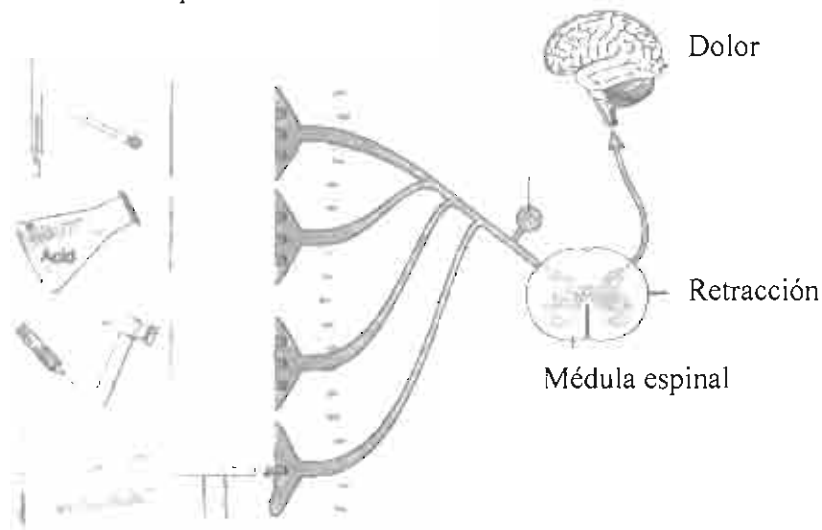


Figura 6. Dolor nociceptivo

Cuando se produce una lesión en un tejido se liberan elementos intracelulares como K^+ , H^+ , ATP; que activan o sensibilizan a los nociceptores exagerando la respuesta dolorosa. Además, en presencia de una respuesta inflamatoria se activan mastocitos, los cuales liberan sustancias vasoactivas como la histamina y sustancia P, que sensibilizan aún más a los nociceptores. El aumento de la magnitud de la respuesta a un estímulo doloroso se llama hiperalgesia, mientras que la disminución del umbral para que se produzca un impulso doloroso se conoce como hiperpatia.

La activación de los nociceptores genera potenciales de acción que se propagan hacia el cuerpo de la neurona pseudodipolar que se halla localizada en el ganglio de la raíz dorsal (GDR), para luego ser transmitidos hacia el asta posterior de la espina dorsal. El asta posterior está organizada en láminas de neuronas que reciben proyecciones específicas de distintos tipos de fibras. Es así que las neuronas localizadas en las láminas I reciben información nociceptiva directamente mediante fibras de clase C (finas, multimodales, sin cubierta de mielina), mientras que las localizadas en láminas I y IV reciben información dolorosa directa e indirectamente mediante fibras C o $A\delta$ (gruesas, mielinizadas y específicas para estímulos mecánicos). Es en este nivel que los axones de las

GRD hacen sinapsis con las neuronas de proyección. En condiciones normales la activación de un órgano por un estímulo doloroso resulta en la liberación de glutamato y sustancia P, los cuales activan receptores específicos localizados en la postsinapsis. La cantidad de neurotransmisor (glutamato y sustancia P) liberada a este nivel es regulada positivamente por los neuropéptidos CGRP, CCK, VIP, SP o negativamente por la encefalinas, las que se unen a receptores específicos ubicados en la pre y postsinapsis. Por lo tanto, las encefalinas no son los neurotransmisores que transmiten impulsos dolorosos, sino que modulan la respuesta. En la presinapsis las encefalinas bloquean la entrada de calcio extracelular disminuyendo su conductancia o indirectamente activando la conductancia al potasio. La entrada de calcio extracelular es necesaria para permitir que las vesículas que contienen glutamato y sustancia P se fusionen con la membrana del botón pre-sináptico, permitiendo así su liberación a la biofase. El efecto sobre la postsinapsis es más complejo. La generación de un potencial de acción es el resultado de la sumatoria de pequeños cambios en el potencial de membrana, los que llevan el potencial de membrana a un valor menos negativo (ej. de -70 a -60 mV), acercándolo al umbral de generación de un potencial de acción. (Scholz y col., 2002; Julius y col., 2001; Woolf y Ma, 2007 y Lee y col., 2005).

Dolor neuropático es el que resulta de lesiones o alteraciones crónicas en vías nerviosas periféricas o centrales. Puede desarrollarse y persistir en ausencia de un estímulo nocivo evidente. El paciente frecuentemente usa términos poco usuales para describirlo, por ser una experiencia nueva. Los síntomas pueden ser focales o más generalizados. Característicamente, el síntoma se presenta como una sensación basal dolorosa o quemante (disestesia), con hiperalgesia (respuesta exagerada) o percepción de un estímulo cualquiera como doloroso (alodinia). Estos términos se agrupan en el de hiperpatía y son característicos de una hipersensibilidad alterada.

El dolor neuropático se genera como resultado de cambios que ocurren en la transmisión normal del impulso doloroso (figura 7). Estas alteraciones han sido

detectadas en las terminaciones nerviosas periféricas, en el GRD, en el asta posterior de la espina dorsal y en la corteza somatosensorial (S1). Además de cambios en las neuronas afectadas, se observan modificaciones en las propiedades eléctricas de las neuronas normales remanentes. (Sah y col., 2003; Campbell y Meyer., 2006; Cruciani y Nieto, 2006 y Sholz y Woolf, 2002).

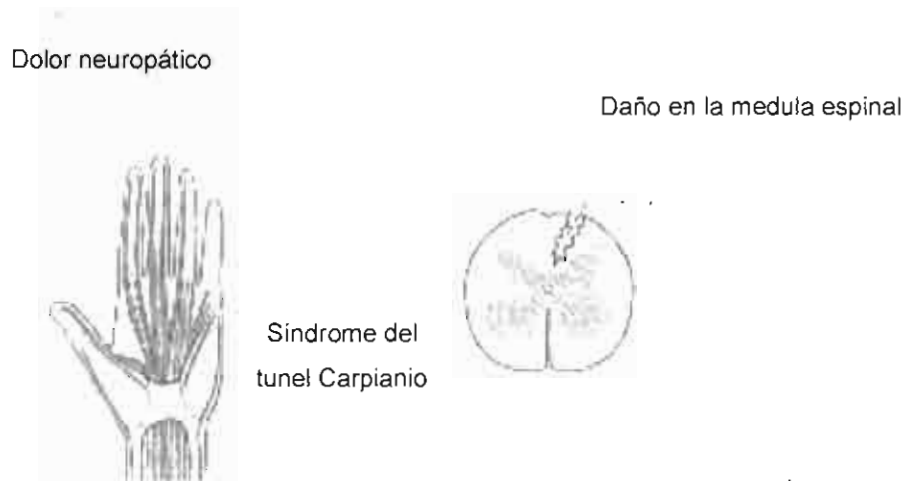


Figura 7. El dolor neuropático surge de lesiones o disfunciones del sistema nervioso

Dolor inflamatorio: es producido por un daño mecánico o por infección, istemia, crecimiento de un tumor o por un proceso autoinmune, múltiples mediadores químicos y células inflamatorias son liberadas. Esto da como resultado una “sopa inflamatoria” rica en citocinas, factor de crecimiento, quininas, purinas, aminas, prostanoïdes, iones incluyendo protones. Algunos de los mediadores inflamatorios son activados directamente por nociceptores, induciendo de esta manera el dolor. Otros actúan de manera conjunta para producir una sensibilización en el sistema nervioso (figura 8), (Sholz y Woolf, 2002).

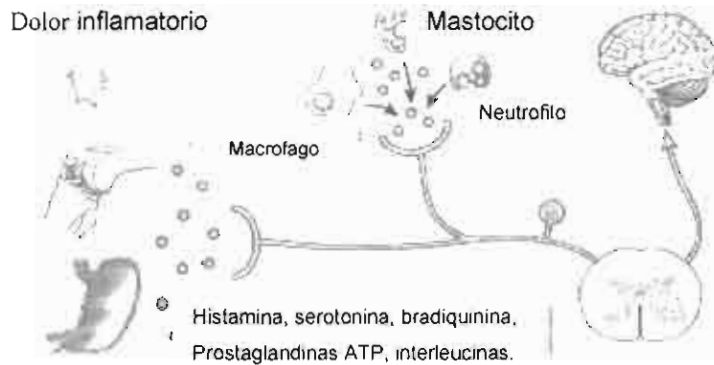


Figura 8. Mecanismos de dolor inflamatorio

Dolor psicogénico: ocurre cuando el paciente describe problemas psicológicos como ansiedad o depresión en términos de daño tisular, verbalmente o a través de su comportamiento. Si bien el daño puede o pudo existir, el problema central es la amplificación y distorsión de esos impulsos periféricos por el estado psicológico. (Cruciani y Nieto., 2006)

Tratamiento farmacológico para la inflamación y el dolor.

Actualmente existe un gran número de fármacos empleados para tratar los procesos inflamatorios agudos y crónicos, estos fármacos se conocen como antiinflamatorios esteroidales y no esteroidales (AINEs) actúan mediante la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (entre otros mecanismos).

Los más ampliamente utilizados son los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). El mecanismo de acción de un importante número de los AINEs ocurre a nivel de la enzima ciclooxigenasa (COX), cuya inhibición produce decremento en la síntesis de las prostaglandinas.

Los fármacos AINEs forman un grupo de agentes distintos desde el punto de vista químico que difieren en sus actividades antipirética, analgésica y antiinflamatoria. Actúan primordialmente al inhibir las enzimas del grupo de la ciclooxigenasa, pero no al grupo de la lipooxigenasa.

Son fármacos que incluyen más de 60 compuestos diferentes, de los cuales ninguno es el ideal para controlar o modificar los signos y síntomas de la inflamación, sobre todo aquellos que se presentan en las enfermedades articulares. De manera adicional, son muy conocidos por los efectos adversos que desarrollan.

Son efectivos en el tratamiento del dolor secundario a procesos inflamatorios (pero también son útiles en el dolor neurógeno, miógeno y de cabeza).

Por lo general estos efectos se relacionan con su acción primaria: inhiben la ciclooxigenasa de araquinodato (COX), esta enzima es la responsable en convertir el ácido araquidónico en prostaglandinas (PG) y tromboxano (TxA₂). Existen dos tipos de enzima COX, las llamadas COX-1 y COX-2. La COX-1 es una isoforma que se expresa en la mayor parte de los tejidos y de las plaquetas, participante en la señalización de célula-célula y en homeostasis de los tejidos. La COX-2 se induce en las células inflamatorias cuando son activadas por las citocinas primarias inflamatorias, interleucina 1 y el factor alfa de necrosis tumoral. Casi todos los AINEs actuales son inhibidores de ambas isoformas, aunque en diferente grado (Hooper y col., 2004 y Kalant., 1998)

La acción antiinflamatoria y analgésica de los AINEs depende de manera principal de su inhibición de la COX-2 y es probable que sus efectos adversos se deban a la inhibición de COX-1. Nuevos agentes con acción selectiva sobre COX-2, como la pipelina, han mostrado efectos antiinflamatorios y analgésicos, sin efectos gástricos adversos. (Gupta y Crofford., 2001 y Hla y col., 1999)

De esta manera encontramos compuestos: relativamente selectivos para COX-1: aspirina, indometacina, sundilaco, piroxicam y tolmetin; menos selectivos para COX-1: ibuprofeno, paracetamol; de igual acción para ambas enzimas: naproxeno, flurbiprofeno, diclofenaco, nabumetona y más selectivos para COX-2: nimuselida, parecoxib y otros compuestos.

La actividad antiplaquetaria de los AINEs: se debe a la disminución en la producción de tromboxano, mediador en la función plaquetaria que normalmente

influye en los cambios morfológicos de las plaquetas, liberación de gránulos y agregación.

Los efectos analgésicos se deben a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas. Tal vez la prostaglandina E_2 es mediadora de la hiperalgesia por sensibilización de las terminales nerviosas a la acción de bradicinina, histamina y otros mediadores químicos liberados durante la inflamación. Los AINEs son efectivos en artritis, bursitis, dolor de origen muscular y vascular, dental, dismenorrea, dolor posparto, por metástasis óseas y todos los trastornos que guardan relación con un aumento en la síntesis de prostaglandinas.

Los efectos antipiréticos se deben a la disminución de la prostaglandina E_2 , que actúa en el centro termorregulador del hipotálamo para elevar la temperatura corporal.

La actividad antiinflamatoria se debe a varios mecanismos que pueden incluir disminución en la síntesis de prostaglandinas en el tejido inflamado, inhibición de otros mediadores de la inflamación e inhibición en la migración de los leucocitos (Mycek y col., 2004 y Bateman y Kemedly, 1995).

Para tratar el cuadro de inflamación crónica se emplean, además de los AINES, las sales de oro, penicilamina, metotrexato, la cloroquina y los antiinflamatorios esteroideos o corticoesteroides (Karres y col., 1998).

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 $NF-\kappa B$ que es el activador de los genes que codifican para citocinas y moléculas de adhesión (Bourke y Moynagh, 1999; Rhen y Cidlowski, 2005). El $NF-\kappa B$ 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).

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

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, nocturia, proteinuria, poliuria, disuria, variación de la frecuencia urinaria, oliguria, 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 cardíaca (Katzung, 2007 y Rodríguez y col., 2005).

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 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, equimosis.(Gallin,1992; Hardman y col., 1996).

Los antiinflamatorios esteroides presentan los siguientes efectos adversos: estreñimiento, sedación, depresión respiratoria, alucinaciones (Perrot, 1999), 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).

Modelos experimentales de inflamación y nocicepción.

Modelos de inflamación aguda.

Edema auricular inducido con TPA

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 A₂ 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 PGE₂ es el mediador relevante. Ashendel y Boutwell (1979) reportan un pico elevado de PGE₂ en la epidermis a las 6 h y 24 h después de administrar el TPA. Observaciones realizadas por Fürstenberg y cols. (1994) señalan que el TPA incrementa el contenido epidermal de los cisteinil leucotrienos LTC₄, LTD₄ y LTE₄, pero no el del LTB₄. Por otra parte, se sabe que TPA activa a la proteína cinasa C (PKC) induciendo la excitación, modulación de la conductancia iónica, contracción de la musculatura lisa y proliferación celular, eventos todos que están fuertemente implicados en el proceso inflamatorio (Recio y cols., 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 (1μL) 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).

Carlson y col. (1985) investigaron los efectos de diferentes clases de fármacos antiinflamatorios administrados oralmente o tópicamente en el tratamiento del edema auricular inducido por TPA. Los fármacos fueron administrados 30 minutos después de la aplicación del TPA. Diversos inhibidores de la ciclooxygenasa como la indometacina, aspirina y peroxicam, no presentaron efecto cuando fueron

administrados por vía oral, pero inhibieron el edema cuando estos fueron aplicados tópicamente.

Edema inducido con carragenina:

El edema inducido con carragenina es un modelo farmacológico *in vivo*, utilizado para predecir el efecto de nuevos agentes antiinflamatorios sobre la inflamación aguda y de manera preliminar determinar si actúan sobre los mediadores de este tipo de inflamación (Morebise y col., 2002; Asres y col., 2005 y Loro y col., 1995)

La inflamación producida por la carragenina se debe fundamentalmente a que esta sustancia estimula la producción de prostaglandinas (Hambleton y Miller, 1989; Sato y col., 1980; Sedgwick y Lees, 1986) las cuales derivan del metabolismo del ácido araquidónico los que promueven los procesos inflamatorios-inmunológicos y angiogénicos; este modelo involucra dos fases (García y col., 2004).

La presencia del edema es uno de los primeros signos de la inflamación (Sur y col., 2002). La primera fase la cual ocurre entre 0 y 2.5 h después de la administración del agente flogístico; y está atribuida a la acción de mediadores como la histamina, serotonina y bradiquina sobre la permeabilidad vascular; los cuales son responsables de la respuesta inflamatoria inmediata (Crunkhon y col., 1971 y Maitiy col., 1998) también se observa aumento de la síntesis de prostaglandinas en el entorno del tejido dañado, mientras las quininas y prostaglandinas prolongan la respuesta (Brito y Antonio 1998; Cifuentes y col., 2001).

El edema máximo es alcanzado aproximadamente tres horas después de la administración de la carragenina y posteriormente declina.

La última fase, es resultado de una sobreproducción de prostaglandinas en el tejido y puede continuar hasta las 5 h después de la administración de la carragenina (Pérez-Guerrero y col., 2001), esta fase también está mediada por bradiquinina, leucotrienos y polimorfonucleares (Brito y Antonio, 1998)

Inflamación crónica.

Edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA

Algunos de los padecimientos de la piel son enfermedades crónicas inflamatorias que no tienen tratamientos completamente acertados como la psoriasis y dermatitis atópica.

Altos niveles de citocinas inflamatorias y especies de oxígeno reactivo son propuestos como contribuidores de los mecanismos patofisiológicos asociados con varios desórdenes inflamatorios de la piel.

La inflamación cutánea es producida y mantenida por la interacción de varias células inflamatorias que migran hacia el sitio de la inflamación en respuesta a una alta liberación de mediadores pro-inflamatorios como citocinas, prostaglandinas y leucotrienos.

Por lo tanto citocinas pro-inflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α juega un papel importante en la patogénesis de enfermedades de la piel y la modulación de estos mediadores puede ser una terapia efectiva en el tratamiento de enfermedades de la piel.

Estudios previos reportan que las lesiones provocadas por padecimientos agudos y crónicos como la dermatitis atópica contienen células T activadas y mastocitos degranulados. Esta compleja patología inflamatoria es difícil de establecer en un corto plazo en modelos pre-clínicos para su evaluación (Masa y col., 2006; Sujong y col., 2006; Yeon y col., 2009; Brallyen y col., 2007). El TPA produce un modelo de inflamación en la oreja del ratón y conduce al reclutamiento de polimorfonucleares como macrófagos y predominantemente células T en el séptimo día del modelo crónico.

Por lo que este modelo simula varios aspectos de la dermatitis atópica humana, es un modelo *in vivo* confiable que provee diversas oportunidades para evaluar tratamientos preventivos para esta enfermedad y para el tratamiento de lesiones causadas por la enfermedad crónica.

La exposición al TPA resulta en el incremento de IL-1 β y TNF- α esto sugiere que ambas citocinas median significativamente la inflamación y juegan un papel principal en la inducción de dermatitis por contacto con TPA.

La aplicación tópica de dosis repetidas de TPA (5 dosis en 10 días) en la oreja del ratón produce una respuesta inflamatoria prolongada en la que se observa aumento del peso del tejido auricular, infiltración de células inflamatorias polimorfonucleares, hiperplasia epidérmica y fibrosis (Stanley y col., 1991; Cuéllar y col., 1997 y Gábor, 2000).

Evaluación de actividad antinociceptiva.

Disfunción inducida por dolor en ratas (modelo PIFIR):

El PIFIR es un modelo adecuado y validado para evaluar efectos antiinflamatorios y antinociceptivos; simula el dolor inflamatorio y artrítico que se presenta clínicamente en la patología de la gota.

Este ensayo preclínico puede determinar eficacia, potencia y duración de la acción antinociceptiva de los diferentes compuestos a evaluar. (Ventura y col., 2002).

Los AINE's son inhibidores no selectivos de la ciclooxigena y reducen la producción de prostaglandinas, las cuales sensibilizan las terminaciones nerviosas del sitio lesionado. En la prueba del PIFIR las prostaglandinas participan en la activación de los nociceptores pero no se tiene información específica de cómo participan estas a nivel espinal y supraespinal (Ventura y col., 2000)

Vane y col (1998) establecieron que la COX-2 era la única isoforma responsable de la generación de prostaglandinas que participan en la nocicepción. Posteriormente se demostró que tanto la COX-2 como la COX-1 participan en la generación de la nocicepción e inflamación (Euchenhofer y col., 1998)

Herbolaria en el tratamiento de la inflamación y el dolor.

Medicina tradicional.

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 (Akerle., 1993; Sheldon y col., 1997; Shrestha y Dhillion, 2003; Katewa y col., 2004).

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. (Akerle, 1993).

Así con el objetivo de contribuir al conocimiento de plantas con potencial de aplicación en el tratamiento antinociceptivo (analgésico) y antiinflamatorio, se realizó el estudio farmacológico de las especies de *Eupatorium glabratum* H.B.K, *Senna villosa* Mill y *Hesperozygis marifolia* Epling, y el análisis químico del aceite esencial de esta última.

***Eupatorium glabratum* H.B.K**

Comúnmente conocida como Chamisa (figura 9), habita en lugares abiertos del bosque Juniperus y en bosques de Quercus, Abies y Pinus en Pachuca, Zempoala, Tepeapulco, Mineral del Monte, Mineral del Chico, Epazoyucan, Omitlán y Huasca en el Estado de Hidalgo. Se hierve junto con tepozán, pirú, escoba, hiolochiche, jarilla y otras plantas, para bañar a las señoras que acaban de dar a luz (Villavicencio, 2002). Hay informes sobre otras especies de este

género con las siguientes actividades farmacológicas antinociceptiva, antiinflamatoria, antirepelente, antidiarreico, antiulceroso, broncodilatador, tratamiento de insuficiencia hepática, ictericia, malaria y tos (Clavin y col., 2000; Muschietti y col., 2001; Metwally y Ekejiuba, 1981 y Ferraro y col., 1988).

Estudios fitoquímicos del extracto clorofórmico de *E. glabratum* reportan la presencia de ácido benzoico, 5,7-dihidroxi-4'-metoxi flavona o acacetina, ácido ilílico y ácido eupaglábrico. (Guerrero y col., 1978)



Figura 9. *Eupatorium glabratum* conocida comúnmente como Chamisa.

***Senna villosa* Mill,**

Es comúnmente conocida con Salché (figura 10), crece en la península de Yucatán, en la medicina tradicional se utiliza en el tratamiento de infecciones en la piel, en la aparición de postulas, erupciones y en el proceso de cicatrización. En todos los casos su aplicación es tópica. El extracto acuoso se utiliza para el tratamiento de disminorrea y problemas inflamatorios (BADEPY, 1985).

Un análisis fitoquímico del extracto hexánico de las hojas de *S.villosa* reveló la presencia de los siguientes tipos de compuestos: esteroides, flavonoides y antraquinonas. (Mena 1997)

Del extracto clorofórmico se aisló el acetato de 8-hidroximetilen-trieicosanilo el cual inhibe el crecimiento de *Trypanosoma cruzi*. (Guzmán y col., 2008). El extracto metanólico inhibió el crecimiento de *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* (Calzada y col., 2006).



Figura 10 *Senna villosa* conocida comúnmente como Salche.

***Hesperozygis marifolia* Epling,**

Esta planta puede crecer de 20 a 30 cm (figura 11) y se usa en la medicina tradicional para el tratamiento de la constipación y como tranquilizante (Chimal y col., 1989).

Estudios fitoquímicos del extracto de acetona de *H. marifolia* dieron como resultado el aislamiento de los siguientes compuestos: 2-hidroxi-3-(1',1'-dimetilalil)-1,4-naftoquinona, α -duniona, acetato de betulina y 5-O-desmetilnobiletina (García, 1994).



Figura 11 *Hesperozygis marifolia*

Planteamiento del problema.

Las enfermedades reumáticas amenazan con ser un problema de salud pública ya que afectan a entre cinco y 10 por ciento de la población mundial y reducen la capacidad laboral de las personas afectadas. Estas enfermedades son patologías crónicas, degenerativas y que 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 analgésicos y antiinflamatorios de uso clínico que se utilizan para el tratamiento del dolor e inflamación, pueden presentar efectos adversos como: úlcera gástrica, bloqueo de la agregación plaquetaria, inhibición de la motilidad uterina, prolongando el periodo de gestación y también inhibición de la función renal. Lo anterior hace necesaria la búsqueda de nuevos compuestos para el tratamiento de estos padecimientos, que produzcan un buen efecto farmacológico pero con menos efectos colaterales. En este sentido las plantas medicinales son fuentes potenciales para la obtención de dichos compuestos y su estudio permite al mismo tiempo validar con métodos científicos su uso en la medicina tradicional mexicana.

Hipótesis.

Al menos uno de los extractos: clorofórmico, metanólico o acuoso de *Eupatorium glabratum*, *Senna villosa* y *Hesperozygis marifolia* presentará actividad antiinflamatoria y/o antinociceptiva, efectos que les atribuye la medicina tradicional.

OBJETIVO GENERAL:

“Determinar el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Eupatorium glabratum*, *Senna villosa* y de *Hesperozygis marifolia* en diferentes modelos experimentales.”

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la actividad antiinflamatoria de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Eupatorium glabratum*, *Senna villosa* y *Hesperozygis marifolia*.
- Aislar el aceite esencial de *Hesperozygis marifolia*, determinar su composición, así como su actividad antiinflamatoria y la de sus componentes mayoritarios.
- Determinar la actividad antinociceptiva de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Eupatorium glabratum* y *Senna villosa*, así como la del componente mayoritario del aceite esencial de *Hesperozygis marifolia*.

MATERIAL Y METODOS

Material Biológico

Eupatorium glabratum y *Hesperozygis marifolia* se colectaron en el paraje de las Comadres a orillas del bosque Abercus, El Realejo Guadalucazar, en San Luis Potosí, la primera el 28 de enero del 2006 con número de voucher SLPM 24065; y la segunda en Agosto del 2007. Su identificación taxonómica fue realizada por el taxónomo José García Pérez, con número de voucher (SLPM43012) y depositada en el herbario Isidro Palacios de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Por su parte, *Senna villosa* se colectó en la comunidad rural de Komchem, pueblo que se encuentra a 17 km de Mérida, Yucatán, en septiembre de 2007 y fue autenticada por el Dr. Salvador Flores Guido, con número de voucher 10284, el cual fue depositado en el herbario de la Universidad Autónoma de Yucatán (Guzmán y col., 2008).

Preparación de los extractos.

En un matraz balón de 5 L se colocaron 300 g de la planta seca y molida con 3.5 L de cloroformo, metanol o agua. La mezcla se calentó a reflujo durante 4 h. Al término de este periodo el extracto se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida en un evaporador rotatorio, en el caso del extracto acuoso se liofilizó en un equipo Freezone 6 de Labconco.

Obtención del Aceite Esencial de *Hesperozygis marifolia*.

Las partes aéreas frescas de la planta se sometieron a una hidrodestilación en un aparato tipo Clevenger. A la fase acuosa se le adicionó cloruro de sodio hasta saturación y el aceite se extrajo con éter etílico, la fase étera se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a temperatura ambiente.

El análisis del aceite esencial se desarrolló en un cromatógrafo de gases Agilent Technology 6890N acoplado con un espectrómetro de masas MS 5973N a 70 eV, se usó una columna capilar carbowax (30 m x 0.25 µm d.i., 0.25 µm).

El gas acarreador fue helio a un flujo de 1 mL/min. El inyector y la interfase de transferencia del espectrómetro de masas se calentaron a una temperatura de 250°C. La temperatura del horno fue de 45°C - 135°C, a una velocidad de calentamiento de 3°C /min, durante un 1 minuto permaneció a 135°C posteriormente se calentó a 250°C a una velocidad de 10°C por 10 min. Las muestras fueron diluidas (1:10 v/v, en acetona) e inyectadas manualmente (1.0 µL).

Los compuestos fueron identificados por comparación tanto de los tiempos de retención relativa como de sus espectros de masas con los de los compuestos comerciales.

Identificación del enantiómero (R)-pulegona del aceite esencial.

El aceite esencial y las (R) y (S)-pulegonas (obtenidas de Sigma – Aldrich) fueron analizados por cromatografía de líquidos en un cromatógrafo Agilent 1100, con un detector de arreglo de diodos. Se utilizó una columna quiral OJ – H (Chirasil 4.6 x 260 mm). Como eluyente se usó una mezcla de hexano: isopropanol 95:5. La velocidad de flujo fue de 0.6 mL / min y se inyectaron 5 µL de los diferentes compuestos la detección se llevó a cabo a una longitud de $\lambda = 230$ nm.

Reactivos utilizados.

Polivinil pirrolidona (P.V.P.) de Sigma – Aldrich

12- O- acetato de tetradecanoilforbol (TPA) de Sigma – Aldrich.

Carreganina lamda (tipo IV) de Sigma – Aldrich.

Acido úrico (99.9%) de Sigma – Aldrich.

Indometacina (99.9% TLC) de Sigma – Aldrich.

(R) – pulegona y (S) – pulegona (98 %) de Sigma – Aldrich.

(±) Isomentona de Chroma Dex

Animales.

Se utilizaron ratas macho cepa Wistar (180 - 200 g) y ratones macho cepa CD 1 (25 - 30 g) Los animales fueron mantenidos a 24°C en ciclos de luz-oscuridad 12:12 h, se les suministró alimento (purina) y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron desarrollados durante la fase de luz de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999, UPEAL-UAM-X (Unidad de Producción y experimentación de animales de laboratorio) y siguiendo las recomendaciones del Comité de Ética de la Asociación Internacional para la Investigación y Estudio del Dolor (Covino y col., 1980), las Guías y Estándares Éticas para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983), además de seguir las recomendaciones del Comité Local de Ética (Departamento de Farmacobiología del Cinvestav-Sede Sur) para el manejo adecuado de animales de laboratorio.

Evaluación de actividad antiinflamatoria.

Inflamación aguda

Edema inducido por 12- O- acetato de tetradecanoilforbol por TPA.

Se realizó la prueba según lo descrito por Young y De Young, 1989. Para este modelo se utilizaron ratones macho CD-1 (20-23 g). Ocho animales por grupo. El TPA 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 y la oreja derecha fue administrada con 25 µL de acetona, 30 minutos después de la aplicación del irritante, se aplicó por la misma vía el vehículo, la indometacina (2 mg /oreja) o los extractos disueltos en 25 µL acetona o en una mezcla 50:50 metanol: acetona, en ambas caras de la oreja tratada con TPA a cada grupo. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical 6 h después y se registró el peso del tejido auricular realizando una perforación de 6 mm de diámetro. La inhibición del edema se determinó como por ciento respecto al edema formado en los animales del grupo control; con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(W' - W_0)}{(W - W_0)} \times 100$$

donde:

W' peso de la oreja tratada con TPA y con el extracto

W peso de la oreja tratada con TPA

W₀ peso de la oreja tratada con el vehículo

Edema inducido con carragenina:

El experimento se desarrolló según la técnica descrita por Winter y col., 1962. Se emplearon grupos de ratas (n=8 c/u), distribuidos de la siguiente manera: grupo control que recibió únicamente el vehículo (P.V.P), control positivo administrado con indometacina (8 mg/kg) y grupos tratados con los extractos de las tres diferentes plantas, el aceite esencial y sus componentes mayoritarios a diferentes dosis. Todos los tratamientos se administraron por vía intraperitoneal una hora antes de la aplicación de 100 µL de carragenina al 1% en la región subplantar derecha. El desarrollo del edema se registró por medio del desplazamiento de volumen en un pletismómetro Ugo Basile. Se registró el desplazamiento inicial antes de la administración del agente flogístico y el posterior desarrollo del edema cada hora durante 5 horas. El porcentaje de inhibición se calculó de acuerdo a la fórmula descrita por Olajide y col. (2000).

$$\% \text{ inhibición} = \frac{((C_1 - C_0)_{\text{control}} - (C_1 - C_0)_{\text{tratado}})}{(C_1 - C_0)_{\text{control}}} \times 100$$

Donde:

C₁ es el volumen desplazado después de administrar la carragenina a diferentes tiempos y

C₀ es el volumen registrado antes de la administración de la carragenina.

Inflamación crónica.

Edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA (inflamación crónica).

En el estudio se utilizaron ratones CD-1 de 20-23 g (8 animales / grupo). De acuerdo con Burke., 2001. Se indujo el edema por la aplicación tópica en la oreja derecha de 2.5 µg de TPA / oreja disueltos en 25 µL acetona y la oreja izquierda fue administrada con 25 µL de acetona; cada tercer día durante 10 días. El vehículo, la indometacina (0.5 mg/oreja) o los extractos (2 mg/oreja) disueltos en acetona se aplicaron tópicamente en la oreja donde se aplicó el TPA, 30 min después. Al cabo de 6 horas a partir de la última dosis de TPA, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se determinó el peso del tejido obtenido por medio de la perforación de 6 mm de diámetro de ambas orejas. El grado de inflamación en el grupo control se determinó como la diferencia de los pesos entre la oreja tratada con TPA y la tratada con el vehículo, la reducción del edema en el grupo de animales tratados con el extracto se expresó utilizando la ecuación siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{(W' - W_0)}{(W - W_0)} \times 100$$

donde:

W' peso de la oreja tratada con TPA y con el extracto

W peso de la oreja tratada con TPA

W₀ peso de la oreja tratada con el vehículo

Evaluación de actividad antinociceptiva.

Disfunción inducida por dolor en ratas (modelo PIFIR):

Este análisis se realizó de acuerdo a la técnica descrita por López-Muñoz y col. (1993). Los animales fueron anestesiados en una cámara de anestesia. Se formaron lotes de 6 animales. La nocicepción fue inducida por una inyección intraarticular de 0.5 mL de ácido úrico al 20% suspendido en aceite mineral en la articulación fémoro-tibio-rotular de la extremidad posterior derecha. Un electrodo fue unido al cojinete plantar de cada una de las extremidades posteriores de la rata. Una vez recuperadas de la anestesia, las ratas se colocaron en cilindros de 30 cm de diámetro el cual se hizo girar a 4 RPM y se realizó la lectura del contacto de las extremidades con el cilindro por 2 minutos cada 30 minutos.

Cuando esta fue cero; aproximadamente 2.5 horas después de la administración del ácido úrico, se consideró como tiempo cero y a partir de ese momento se administraron por vía intraperitoneal los extractos a evaluar, el agente analgésico (indometacina 8 mg/kg), el control negativo (P.V.P), se determinó la funcionalidad del animal (uso de la extremidad al caminar) Las evaluaciones de 2 minutos de duración se realizaron cada 15 minutos la primera hora y cada media hora durante las siguientes 3 horas. Se determinó el % de índice de funcionalidad (%IF), el cual es el reflejo de la nocicepción producida y del efecto antinociceptivo generado por los extractos o el analgésico administrado:

$$\% IF = \left(\frac{\text{tiempo de contacto de extremidad con ácido úrico}}{\text{tiempo de contacto de extremidad control}} \right) 100$$

Se determinaron las dosis efectivas de los extractos y del analgésico control positivo (indometacina).

Análisis estadístico.

De acuerdo al tipo de resultados, éstos fueron analizados por una prueba de comparación múltiple de Dunnet o KruzKall Wallis Blos considerando una $p < 0.05$

RESULTADOS

Inflamación aguda

Edema auricular inducido por TPA

En la tabla 1 y en la figura 12 se presentan los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Senna villosa* en el modelo de edema inducido por TPA.

El extracto clorofórmico mostró una inhibición del 48.58 ± 5.03 %, resultado similar al obtenido con la indometacina (35.59 ± 6.34 %). En cambio, se observa que los extractos metanólico y acuoso no tuvieron actividad significativa en este modelo farmacológico (15.40 ± 4.86 y 12.94 ± 9.21 % de inhibición respectivamente).

Tabla 1. Efecto antiinflamatorio de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Senna villosa* en el modelo de edema inducido con TPA

Grupo	Dosis por vía tópica	Peso del edema (mg)	% inhibición
Control	Vehículo	9.9±0.69	-----
Indometacina	2 mg/oreja	6.17±0.62*	35.59±6.34
Extracto clorofórmico	2 mg/oreja	5.09±0.49*	48.58±5.03
Extracto Metanólico	2 mg/oreja	8.37±0.48	15.40±4.86
Extracto Acuoso	2 mg/oreja	8.61±0.91	12.94±9.21

* p<0.05 comparado con el vehículo

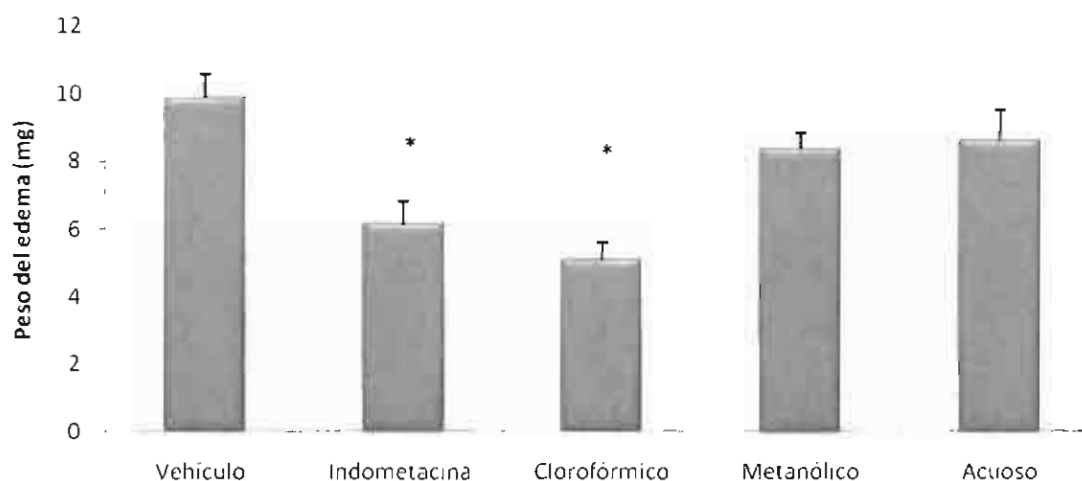


Figura 12. Efecto de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Senna villosa* en el desarrollo de edema auricular inducido por TPA *p<0.05 en comparación con el vehículo.

Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Eupatorium glabratum* en el modelo de edema inducido por TPA (tabla 2 y figura 13) muestran que la inhibición del desarrollo del edema inducido con TPA fue significativa cuando se aplicó el extracto clorofórmico a dosis de 2 mg/oreja (64.32 ± 5.32), la cual fue mayor que la obtenida con indometacina 35.02 ± 7.91 % a la misma dosis. En cambio con el extracto metanólico la inhibición fue menor (28.31 ± 7.64 %) y el extracto acuoso no mostró actividad en este modelo.

Tabla 2. Efecto antiinflamatorio de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Eupatorium glabratum* en el modelo de edema inducido con TPA.

Grupo	Dosis	Peso del edema (mg)	% inhibición
Control	Vehículo	8.85±0.50	-----
Indometacina	2 mg/oreja	5.75±0.62*	35.02±7.91
Extracto clorofórmico	2 mg/oreja	3.15±0.47*	64.32±5.32
Extracto metanólico	2 mg/oreja	6.34±0.67*	28.31±7.64
Extracto acuoso	2 mg/oreja	8.67±0.54	1.69±6.11

* p<0.05 comparado con el vehículo

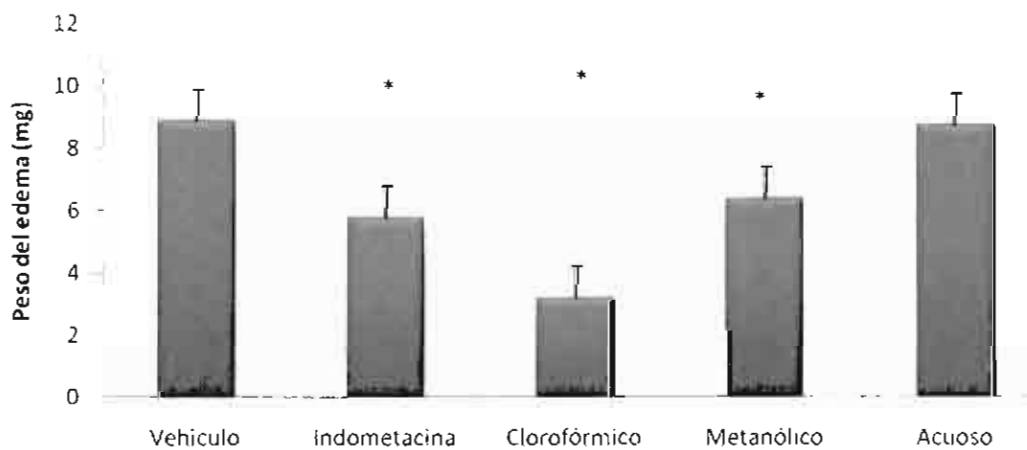


Figura 13. Efecto de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Eupatorium glabratum* en el desarrollo de edema auricular inducido por TPA *p<0.05 en comparación con el vehículo

En la tabla 3 y en la figura 14 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Hesperozygis marifolia* en el modelo de edema inducido por TPA.

Tabla 3. Efecto antiinflamatorio de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Hesperozygis marifolia* en el modelo de edema inducido con TPA

Grupo	Dosis	Peso del edema (mg)	% inhibición
Control	Vehículo	11.00±0.42	-----
Indometacina	2 mg/oreja	5.67±0.41*	48.44±3.74
Extracto clorofórmico	2 mg/oreja	7.42±0.65*	32.46±5.99
Extracto metanólico	2 mg/oreja	8.86±0.44*	19.43±2.85
Extracto acuoso	2 mg/oreja	10.16±0.30	7.61±2.73

* p<0.05 comparado con el vehículo

El extracto clorofórmico mostró un efecto antiinflamatorio significativo en el desarrollo de edema inducido con TPA (32.46 ± 5.99 %) el cual fue menor que el obtenido con indometacina (48.44 ± 3.74 %). El extracto metanólico mostró una ligera actividad en este modelo y el acuoso no tuvo actividad.

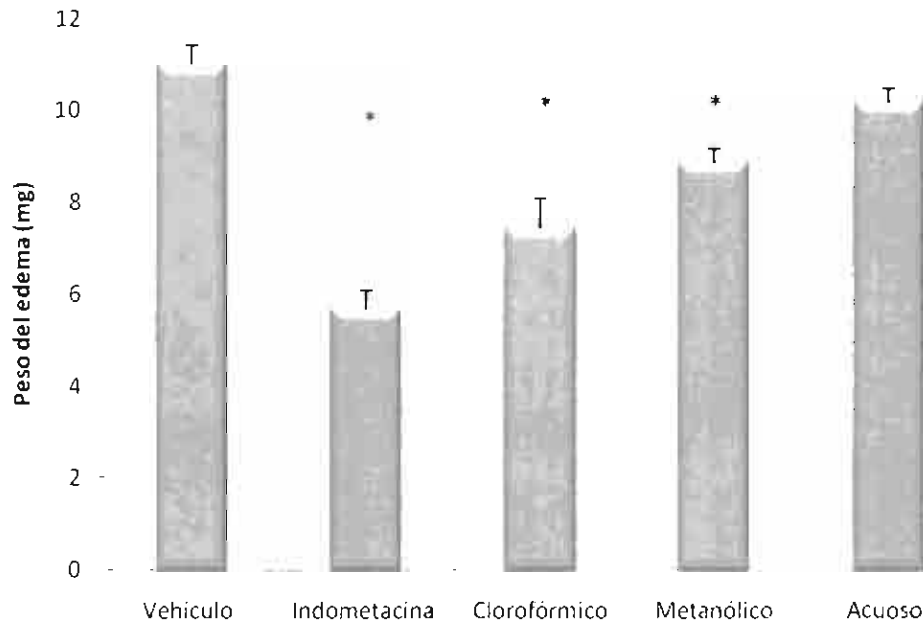


Figura 14. Efecto de los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de *Hesperozygis marifolia* en el desarrollo de edema auricular inducido por TPA * $p < 0.05$ en comparación con el vehículo.

Con base en los resultados obtenidos con *S. villosa*, *E. glabratum* y *H. marifolia* en el modelo de inflamación aguda con TPA se decidió evaluar la actividad anti edematosa de los extractos clorofórmicos de las tres plantas en los modelos de edema plantar inducido con carragenina, edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA (inflamación crónica) y la actividad antinociceptiva en el modelo de disfunción inducida por dolor en ratas (modelo PIFIR). Cuyos resultados se expresan más adelante.

Dado que los efectos farmacológicos de los aceites esenciales son muy variados, (los más frecuentes son: antisépticos, antiespasmódicos, sedantes, cicatrizantes, vulnerarios, expectorantes, diuréticos, analgésicos y antiinflamatorios) tanto en su utilización por vía tópica como en su uso por vía sistémica; (Kuklinski, 2003) se decidió obtener el aceite esencial de la planta aromática *H. marifolia* para determinar su composición, y evaluar su actividad antiinflamatoria.

En la tabla 4 se muestra la composición del aceite esencial de *H. marifolia*, se puede observar que los compuestos mayoritarios son la (R)- pulegona (40.75%) y la isomentona (30.34 %).

Se determino que la pulegona presente en el aceite esencial es el isomero (R) mediante su análisis por cromatografía de líquidos (HPLC) para ello se empleó una columna quiral y muestras auténticas de (R)- y (S)- pulegonas para efectos de comparación. No se determinó cual de las isomentonas (+ ó -) es la que esta presente en el aceite. Los ensayos de la actividad antiinflamatoria se llevarón a cabo con la (\pm) – isomentona.

Tabla 4. Composición del aceite esencial de *Hesperozygis marifolia*

Compuesto	Composición (%)
1R- α -Pinona	0.16
β -Pinona	0.12
(1-metiletil)-Benceno	0.09
Limoneno	0.41
3-metil-Ciclohexanona,	0.16
Tirantona	3.44
3-Octanol	0.38
Mentona	4.458
1-Octen3-ol	1.06
Isomentona	30.34
Isopulegona	0.49
Cariofileno	1.38
R-Pulegona	40.75
Borneol	1.43
<i>cis</i> -Jasmona	0.11
No identificados	15.0

(R) – pulegona.

La pulegona (figura 15), es un monoterpeno que está presente en algunos aceites esenciales obtenidos de plantas de la familia *Lamiaceae* (Grounschober, 1979) y confiere actividad protectora a las plantas contra los depredadores. (Dordevic, 2007). Se ha encontrado que el aceite esencial de *Pennyroyal* que se emplea como expectorante y abortivo; es tóxico y tiene un alto contenido de (R)-pulegona.

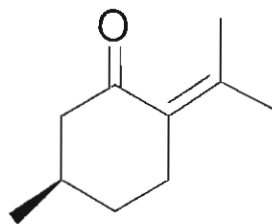


Figura 15. Estructura de la (R) – pulegona

Por lo anterior se han realizado investigaciones sobre la toxicidad de la pulegona, especialmente del isómero (R) el cual es más tóxico que su enantiómero (S).

Se ha demostrado que la (R)-pulegona es oxidada por el citocromo P-450 y de esta manera se producen los metabolitos responsables en la patogénesis de hepatotoxicidad en ratas, ratones y probablemente en humanos (Nelson y col., 1992)

El mentofurano fue identificado como el principal metabolito formado después de la ingestión de repetidas dosis, la hepatotoxicidad de la (R)-pulegona esta relacionada con este metabolito (Chen y col., 2001)

Después de 28 días de administración oral diaria a ratas a una dosis de 160 mg/kg de (R)-pulegona se produce atonía, descenso en los niveles de creatinina, pérdida de peso y cambios histopatológicos (Thorup y col., 1983) También incrementa la concentración de fosfatasa alcalina en el plasma (MØlck y col., 1998).

La dosis letal 50 en ratas tratadas oralmente es de 470 mg/kg (Moreno, 1975) y en ratones administrados intraperitonealmente es de 400 mg/kg (Gordon y col., 1982).

Isomentona.

Es un monoterpeno (figura 16) que se ha encontrado en diversas proporciones en aceites esenciales provenientes de las familias *Labiatae*, *Astereaceae*, *Lauraceae* por mencionar algunas (Bruneton., 2001 y Schmidt – Lebuhn 2008). Se han reportado diversas actividades farmacológicas en dichos aceites esenciales como por ejemplo el aceite esencial de *Agathosma Betulina*, con actividad antiespasmódica, antiséptica y diurética (Moolla y Viljoen., 2008; Wyk., 2008); y el de *Mentha pulegium* que posee actividad antimicrobiana (Mahboubi y Haghi 2008).

No existe literatura científica que evalué la actividad farmacológica de la isomentona.

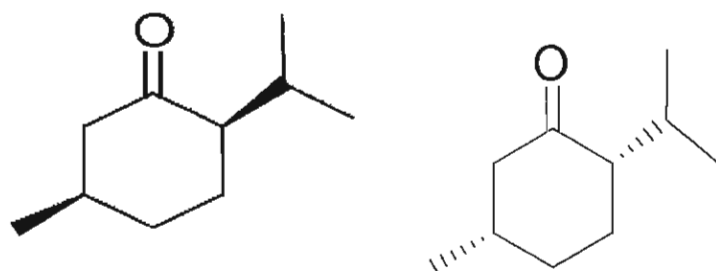


Figura 16. Estructuras de (+) – Isomentona e (-) – Isomentona

No se han encontrado reportes científicos en los cuales se evaluará la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *H. marifolia*, por lo que en este trabajo se considero importante evaluar dichas actividades.

Los resultados de la evaluación del aceite esencial de *Hesperozygis marifolia* a dosis de 2 mg/oreja en el modelo de edema inducido con TPA, se presentan en la Tabla 5 y en la figura 17.

Tabla 5. Efecto antiinflamatorio del aceite esencial de *H marifolia* en el modelo de edema inducido con TPA.

Grupo	Dosis por vía tópica	Peso del edema (mg)	% inhibición
Control	Vehículo	5.7±0.93	-----
Indometacina	2 mg/oreja	2.82±0.49*	50.37±8.65
Aceite esencial	2 mg/oreja	4.86±0.68	No presentó actividad

*p<0.05 comparado con el vehículo

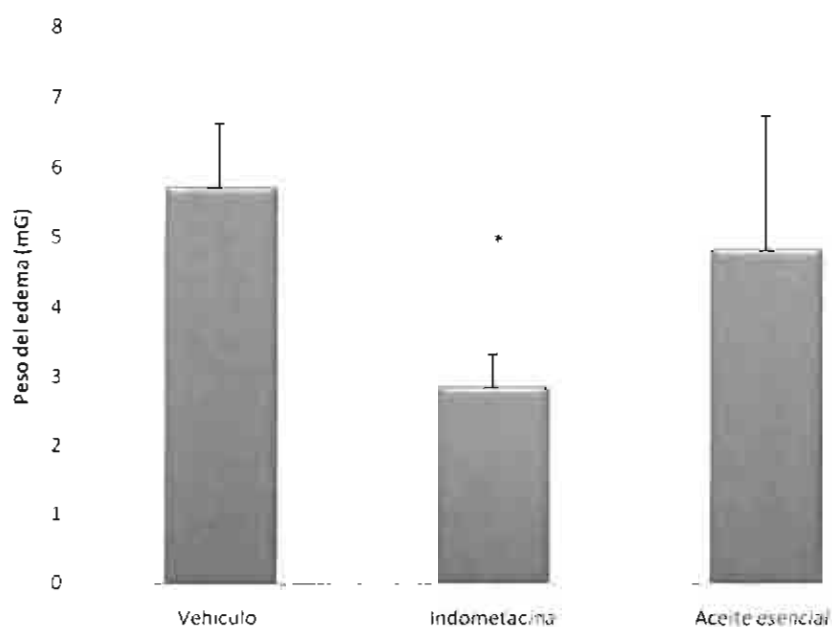


Figura 17. Efecto del aceite esencial de *H. marifolia* en el desarrollo de edema auricular inducido por TPA *p<0.05 en comparación con el vehículo

Los resultados obtenidos en este modelo con (R) - pulegona se muestran en la Tabla 6 y en la figura 18 y los de la isomentona en la Tabla 7 y figura 19

Tabla 6. Efecto antiinflamatorio de (R) - pulegona en el modelo de edema inducido con TPA

Grupo	Dosis por vía tópica	Peso del edema (mg)	% inhibición
Control	Vehículo	8.85±0.50	-----
Indometacina	2 mg/oreja	5.75±0.62*	35.02±7.91
(R) - pulegona	2 mg/oreja	8.78±0.95	No presentó actividad

* p<0.05 comparado con el vehículo

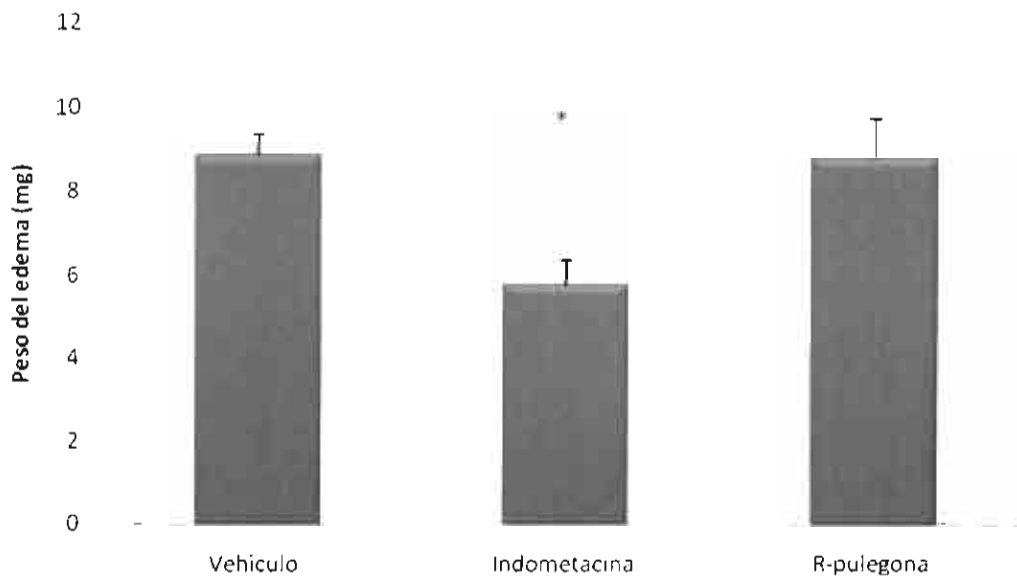


Figura 18. Efecto de (R) - pulegona en el desarrollo de edema auricular inducido por TPA *p<0.05 en comparación con el vehículo

Tabla7. Efecto antiinflamatorio de (\pm) isomentona en el modelo de edema inducido con TPA

Grupo	Dosis por vía tónica	Peso del edema (mg)	% inhibición
Control	Vehículo	9.11 \pm 0.66	-----
Indometacina	2 mg/oreja	5.25 \pm 0.72*	42.38 \pm 7.91
(\pm) Isomentona	2 mg/oreja	7.56 \pm 1.08	No presentó actividad

* p<0.05 comparado con el vehículo

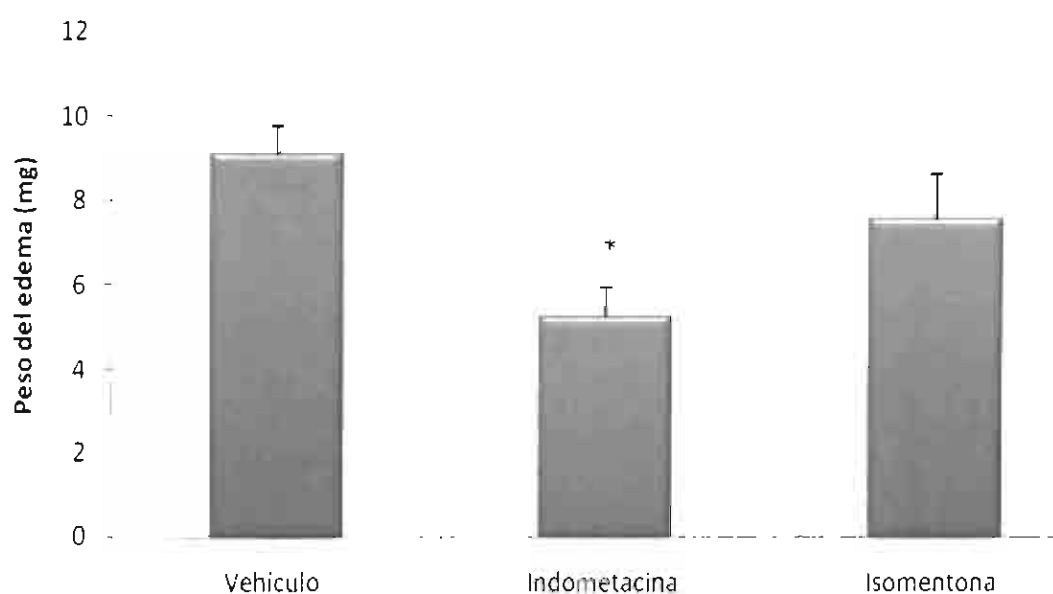


Figura 19. Efecto de (\pm) isomentona en el desarrollo de edema auricular inducido por TPA *p<0.05 en comparación con el vehículo

Como se observa en los resultados presentados, ni el aceite así como ninguno de sus componentes mayoritarios presentó actividad antiinflamatoria sobre este modelo farmacológico utilizado.

Edema inducido con carragenina

En la tabla 8 se presentan los resultados de la evaluación del extracto clorofórmico de *Senna villosa* a dosis de 100, 200, 400 y 800 mg/kg i.p. en el modelo de edema plantar inducido con carragenina. La tabla muestra el volumen desplazado a 0, 60, 120, 180, 240 y 300 minutos, donde se observa que a la dosis de 800 y 200 mg/kg se presenta un efecto inhibitorio importante a los 60 minutos el cual se mantiene durante el tiempo de observación. Mientras que las dosis de 400, 200 y 100 mg/kg muestran su actividad antiinflamatoria a los 180 min y esta se mantiene hasta el final del experimento (300 min).

Tabla 8 Volumen desplazado (mL) por los animales tratados con el extracto clorofórmico de *Senna villosa* a diferentes tiempos después de inducir edema con carragenina

Tratamiento/Tiempo	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
P.V.P.	1.3 ± 0.04	1.51 ± 0.05	1.57 ± 0.07	1.78 ± 0.09	1.95 ± 0.12	2.06 ± 0.15
Indometacina 8 mg/kg	1.24 ± 0.05 ns	1.38 ± 0.05 ns	1.39 ± 0.06 ns	1.42 ± 0.07 *	1.47 ± 0.08 *	1.52 ± 0.09 *
800 mg/kg	1.12 ± 0.03 *	1.12 ± 0.03 ***	1.17 ± 0.03 **	1.21 ± 0.05 ***	1.15 ± 0.03 ***	1.15 ± 0.03 *
400 mg/kg	1.25 ± 0.03 ns	1.42 ± 0.05 ns	1.46 ± 0.05 ns	1.38 ± 0.02 **	1.41 ± 0.04 *	1.39 ± 0.04 *
200 mg/kg	1.13 ± 0.02 *	1.21 ± 0.03 **	1.19 ± 0.04 **	1.26 ± 0.06 **	1.26 ± 0.07 **	1.26 ± 0.07 *
100 mg/kg	1.19 ± 0.04 ns	1.28 ± 0.06 ns	1.31 ± 0.07 ns	1.26 ± 0.06 **	1.23 ± 0.06 **	1.32 ± 0.07 *
50 mg/kg	1.17 ± 0.04 *	1.26 ± 0.04 ***	1.30 ± 0.05 ns	1.35 ± 0.09 **	1.39 ± 0.05 ***	1.55 ± 0.06 ***
25 mg/kg	1.36 ± 0.02 ns	1.27 ± 0.19 ***	1.33 ± 0.04 ns	1.34 ± 0.05 **	1.39 ± 0.07 ***	1.48 ± 0.08 ***

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001; comparado con el vehículo P.V.P.

En la figura 20 se presentan los resultados en porcentaje de inhibición a los 180 y 300 minutos, y se observa que no hay diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de las dosis evaluadas con respecto a la indometacina a los 180 min después de la administración de la carragenina. Sin embargo, a los 300 min se observó una disminución del efecto antiinflamatorio a dosis de 50 y 25 mg/kg (49.9 ± 8.0 y 59.9 ± 7.6 % respectivamente), pero a dosis de 800, 400, 200 y 100 mg/kg, al realizar el análisis de comparación múltiple se encontró que no hay diferencia significativa con la inhibición observada en los animales tratados con indometacina (62.9 ± 10.6 %).

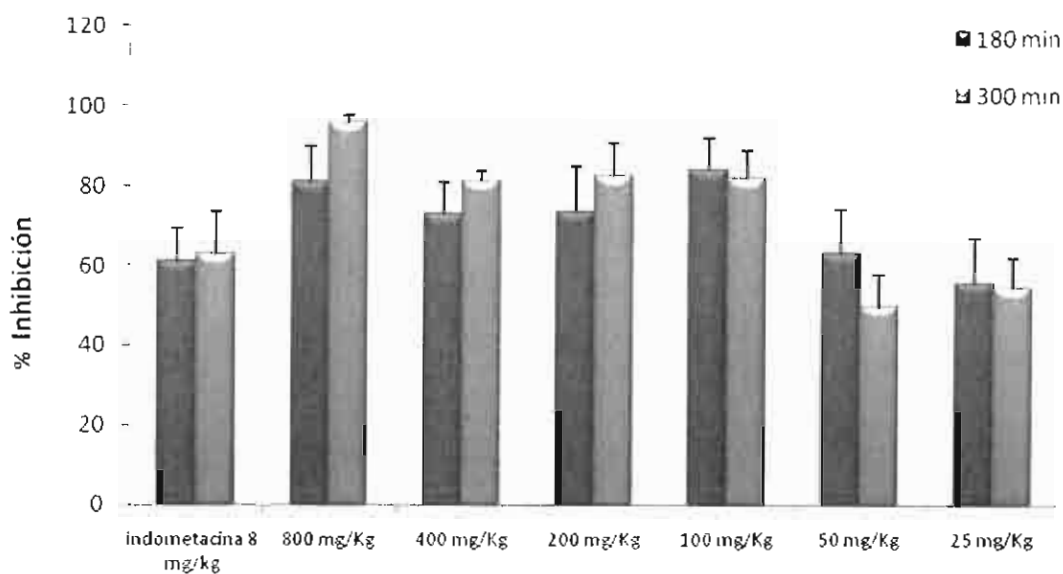


Figura 20 Porcentaje de inhibición del extracto clorofórmico de *Senna villosa* en el edema inducido con carragenina a los 180 y 300 minutos.

Los volúmenes desplazados obtenidos de la evaluación del extracto clorofórmico de *E. glabratum* se muestran en la tabla 9, donde se observa que a los 120 minutos no hay actividad antiinflamatoria con ninguna de las dosis usadas, sin embargo a los 180 minutos con las dosis de 100, 400 y 800 mg/kg se observa un efecto antiinflamatorio significativo, efecto similar al presentado por la indometacina. A la dosis de 200 mg/kg, se observó efecto a los 240 y 300 minutos, mientras que a la 100 mg/kg fue activo hasta los 240 minutos.

Tabla 9 Volumen desplazado (mL) por los animales tratados con el extracto clorofórmico de *Eupat* diferentes dosis en el modelo de edema inducido con carragenina

Tratamiento/Tiempo	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
P.V.P.	1.43 ± 0.05	1.58 ± 0.05	1.82 ± 0.07	1.93 ± 0.07	2.08 ± 0.05	2.11 ± 0.05
Indometacina 8 mg/kg	1.51 ± 0.07 ns	1.62 ± 0.08 ns	1.60 ± 0.06 ns	1.65 ± 0.09 *	1.78 ± 0.11 *	1.71 ± 0.08
800 mg/kg	1.55 ± 0.05 ns	1.65 ± 0.09 ns	1.68 ± 0.09 ns	1.60 ± 0.05 **	1.67 ± 0.10 **	1.56 ± 0.05
400 mg/kg	1.57 ± 0.05 ns	1.65 ± 0.05 ns	1.68 ± 0.05 ns	1.61 ± 0.05 **	1.64 ± 0.07 **	1.72 ± 0.05
200 mg/kg	1.53 ± 0.04 ns	1.71 ± 0.05 ns	1.68 ± 0.07 ns	1.67 ± 0.06 ns	1.66 ± 0.07 **	1.58 ± 0.05
100 mg/kg	1.61 ± 0.05 ns	1.82 ± 0.06 ns	1.93 ± 0.13 ns	1.95 ± 0.22 ns	2.18 ± 0.28 *	2.10 ± 0.05

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001; comparado con el vehículo P.V.P.

En la figura 21 se presentan los porcentajes de inhibición después de 180 y 300 minutos de la administración del agente flogístico. Se observa que a los 180 minutos hay una disminución significativa de la inflamación inducida con carragenina y que los porcentajes de inhibición del proceso inflamatorio a las dosis de 800, 400, y 200 mg/kg (88.5 ± 4.3 , 92.4 ± 4.8 y 72.6 ± 8.8 % respectivamente) son similares a los observados con la indometacina (72.2 ± 13.6 %).

Este mismo resultado se observa a los 300 min, el porcentaje de inhibición del extracto clorofórmico de *E. glabratum* se incrementa con las tres dosis evaluadas y no hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición obtenidos con estas tres dosis (97.4 ± 1.0 , 78.7 ± 16.3 , 93.1 ± 6.8 %); es decir que los porcentajes de inhibición se mantienen constantes con todas las dosis y son similares a la inhibición mostrada por la indometacina.

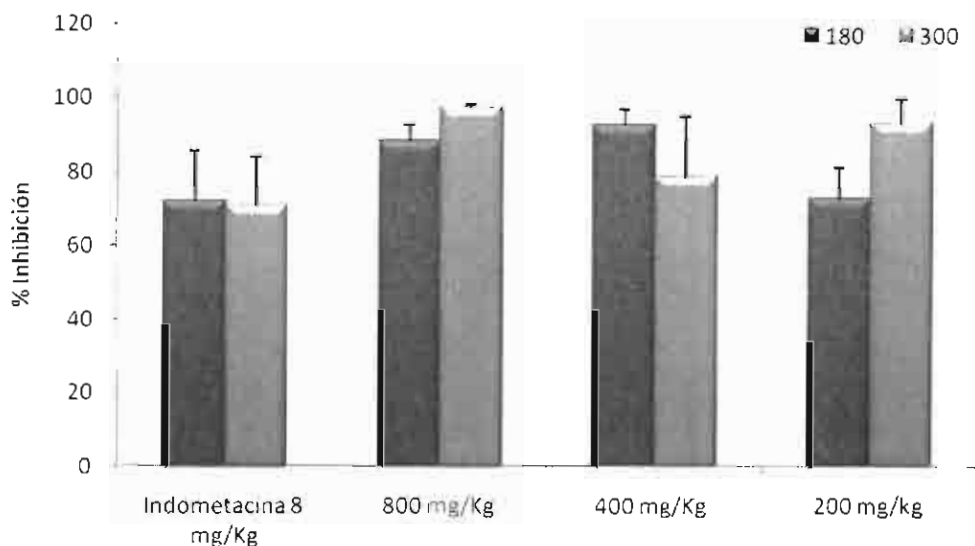


Figura 21 Porcentaje de inhibición del extracto clorofórmico de *Eupatorium glabratum* en el edema inducido con carragenina a los 180 y 300 minutos.

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico de *Hesperozygis marifolia*, el volumen desplazado por los animales administrados con este extracto se muestra en la tabla 10; a lo largo del

experimento se observa que no hay diferencia significativa de la respuesta obtenida con las diferentes dosis del extracto con respecto a la indometacina.

Con la dosis de 400 mg/kg se observó actividad a partir de los 120 minutos, mientras que con las dosis de 200 y 100 mg/kg la actividad se presentó a partir de 180 minutos y se mantuvo a lo largo del experimento.

En la figura 22 se observa que no hay diferencia significativa en el porcentaje de inhibición de las dosis de 400, 200 y 100 mg/kg con respecto a la indometacina después de los 180 min de la administración de la carragenina (76.8 ± 5.9 , 68.7 ± 5.6 , 67.6 ± 7.5 y 66.8 ± 4.7 % respectivamente).

El efecto antiinflamatorio se mantiene hasta los 300 min; con la dosis de 400 mg/kg (90.8 ± 1.6 %) se observa diferencia significativa, con respecto a indometacina (74.6 ± 8.10 %), mientras que las dosis de 200 y 100 mg/kg no mostraron una inhibición con diferencia significativa (80.8 ± 3.9 y 74.7 ± 4.6 % respectivamente) en comparación con la indometacina.

Tabla 10 Volumen desplazado (mL) por los animales tratados con el extracto clorofórmico de Hesp diferentes dosis en el modelo de edema inducido con carragenina.

Tratamiento/Tiempo	0 min	60 min	20 min	180 min	240 min	300 min
P.V.P.	1.44 ± 0.02	1.68 ± 0.05	1.77 ± 0.06	2.11 ± 0.08	2.39 ± 0.09	2.58 ± 0.10
Indometacina 8 mg/kg	1.23 ± 0.05 ns	1.39 ± 0.05 **	1.39 ± 0.07 ***	1.46 ± 0.07 ***	1.48 ± 0.09 ***	1.52 ± 0.09 ***
400 mg/Kg	1.36 ± 0.03 ns	1.64 ± 0.05 ns	1.52 ± 0.05 *	1.51 ± 0.05 ***	1.45 ± 0.03 ***	1.46 ± 0.03 **
200 mg/Kg	1.34 ± 0.03 ns	1.58 ± 0.04 ns	1.63 ± 0.05 ns	1.55 ± 0.04 ***	1.51 ± 0.04 ***	1.56 ± 0.04 **
100 mg/Kg	1.34 ± 0.03 ns	1.65 ± 0.04 ns	1.60 ± 0.06 ns	1.56 ± 0.06 ***	1.60 ± 0.05 ***	1.63 ± 0.05 **

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001; comparado con el vehículo P.V.P.

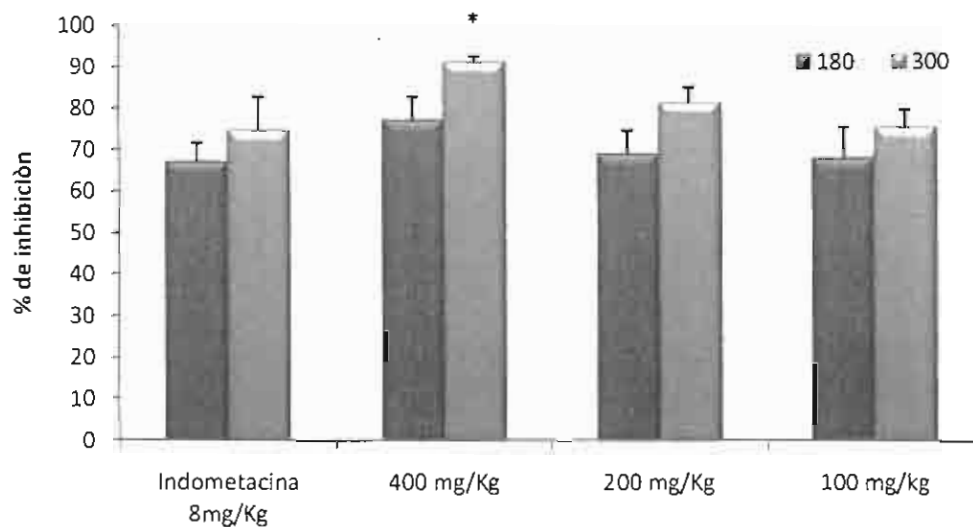


Figura 22 Por ciento de inhibición del extracto clorofórmico de *Hesperozygis marifolia* en el edema inducido con carragenina a los 180 y 300 minutos.

A pesar de los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antiinflamatorio en el modelo del TPA, se decidió evaluar la actividad antiinflamatoria del aceite esencial, pulegona e isomentona en el modelo de edema inducido con carragenina con objeto de determinar si alguno de ellos presenta actividad farmacológica cuando se administra por vía intraperitoneal.

En la tabla 11 se muestran los volúmenes desplazados con dosis de 400, 200 y 100 mg/kg del aceite esencial de *H. marifolia*. En esta tabla se observa que a la dosis más baja, el volumen desplazado fue mayor que el del control negativo durante todo el experimento; es decir se observó un leve efecto inflamatorio. Mientras que a dosis de 400 mg/kg se observó que la inhibición de la formación del edema se da a partir de los 120 minutos.

Tabla 11 Volumen desplazado (mL) por los animales tratados con el aceite esencial de Hesperis matronalis en diferentes dosis en el modelo de edema inducido con carragenina

Tratamiento/Tiempo	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
P.V.P.	1.40 ± 0.03	1.53 ± 0.03	1.72 ± 0.05	1.82 ± 0.05	1.94 ± 0.05	1.92 ± 0.05
Indometacina 8 mg/kg	1.44 ± 0.04 ns	1.50 ± 0.03 ns	1.55 ± 0.04 ns	1.58 ± 0.03 **	1.63 ± 0.05 *	1.63 ± 0.05 ns
400 mg/kg	1.33 ± 0.04 ns	1.40 ± 0.07 ns	1.43 ± 0.06 *	1.37 ± 0.06 ***	1.33 ± 0.03 ***	1.42 ± 0.04 ns
200 mg/kg	1.37 ± 0.06 ns	1.54 ± 0.05 ns	1.52 ± 0.06 ns	1.51 ± 0.04 **	1.78 ± 0.14 ns	1.93 ± 0.05 ns
100 mg/kg	1.30 ± 0.07 ns	1.60 ± 0.10 ns	1.96 ± 0.13 ns	2.02 ± 0.11 ns	2.08 ± 0.15 ns	2.04 ± 0.05 ns

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001; comparado con el vehículo P.V.P.

Los porcentajes de inhibición a los 180 minutos (figura 23) muestran que a dosis de 400 y 200 mg/kg (90.5 ± 21.2 y 66.2 ± 18.6 respectivamente) no hay diferencia significativa respecto a los obtenidos con el grupo control positivo (78.6 ± 7.4); sin embargo, a los 300 minutos a dosis de 200 mg/kg no hay actividad y a dosis de 400 mg/kg la inhibición fue similar a la presentada a los 180 minutos (82.6 ± 9.6). La dosis de 100 mg/kg no mostró actividad antiinflamatoria bajo estas condiciones experimentales.

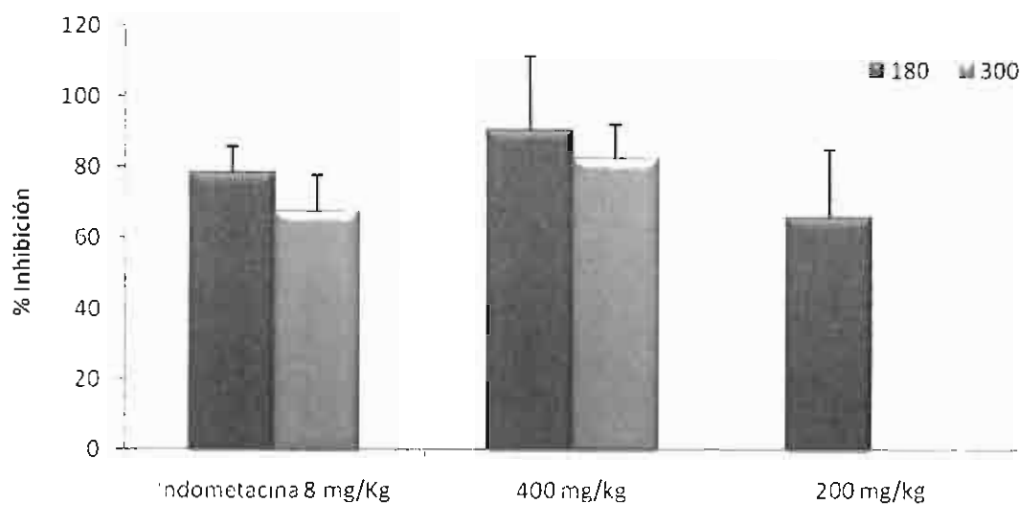


Figura 23 Por ciento de inhibición del aceite esencial de *Hesperozygis marifolia* en el edema inducido con carragenina a los 180 y 300 minutos.

Los resultados obtenidos con la (R)-pulegona (tabla 12 y figura 24) muestran que a dosis de 163 mg/kg, relación a la cual está presente en la dosis de 400mg/kg del aceite esencial, y a los 120 minutos se observa diferencia significativa con respecto al control negativo (P.V.P). La inhibición del edema a los 180 minutos es de 81.4 ± 11.0 y a los 300 minutos de 73.6 ± 8.8 , estos resultados son similares a los valores obtenidos con el aceite esencial de *H. marifolia*.

Tabla 12 Volumen desplazado (mL) por los animales tratados con (R)-pulegona a diferentes dosis y tiempo, en presencia de edema inducido con carragenina

Tratamiento/Tiempo	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
P.V.P.	1.33 ± 0.03	1.54 ± 0.05	1.70 ± 0.05	1.93 ± 0.07	2.22 ± 0.08	2.31 ± 0.09
Indometacina 8 mg/kg	1.40 ± 0.04 ns	1.56 ± 0.05 ns	1.60 ± 0.04 ns	1.69 ± 0.04 **	1.71 ± 0.06 *	1.69 ± 0.05 ns
163 mg/kg	1.49 ± 0.07 ns	1.63 ± 0.05 ns	1.58 ± 0.04 *	1.60 ± 0.04 ***	1.71 ± 0.05 ***	1.75 ± 0.06 ns
82.3 mg/kg	1.31 ± 0.02 ns	1.45 ± 0.02 ns	1.43 ± 0.04 ns	1.55 ± 0.05 **	1.62 ± 0.07 ns	1.66 ± 0.06 ns
41 mg/kg	1.41 ± 0.05 ns	1.53 ± 0.07 ns	1.61 ± 0.10 ns	1.80 ± 0.20 Ns	2.03 ± 0.21 ns	2.21 ± 0.22 ns

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001; comparado con el vehículo P.V.P.

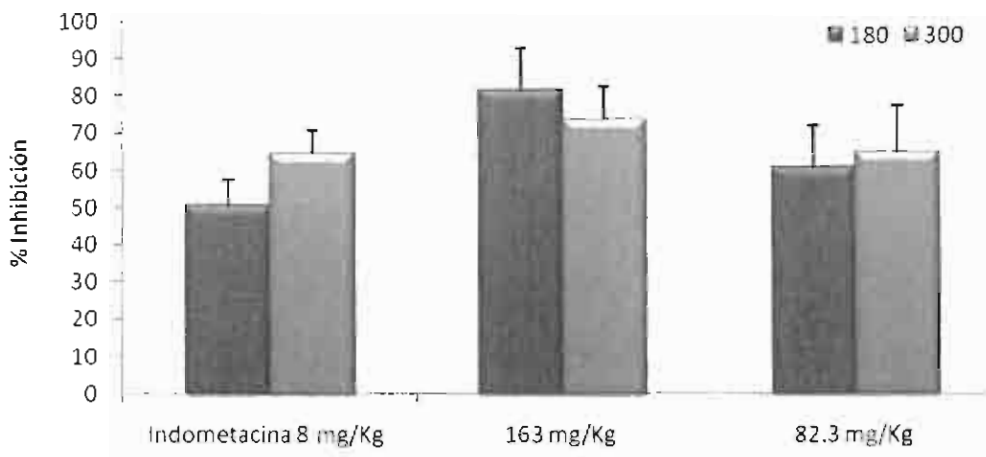


Figura 24 Por ciento de inhibición de (R)-pulegona en el edema inducido con carragenina a los 180 y 300 minutos.

Lo anterior sugiere que el compuesto responsable de la actividad es la (R)-pulegona, sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, este compuesto es hepatotóxico a esta dosis, por lo que no es recomendable el uso del aceite esencial de *H.marifolia* ni de la (R)-pulegona como antiinflamatorios aun cuando su administración es intraperitoneal.

En la tabla 13, se puede observar que la (\pm) - isomentona no presenta actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con carragenina y a partir de los resultados obtenidos descartamos su evaluación con actividad antinociceptiva.

Tabla 13 Volumen desplazado (mL) por los animales tratados con (±) - isomentona a diferentes dosis de edema inducido con carragenina

Tratamiento/Tiempo	0 min	60 min	120 min	180 min	240 min	300 min
P.V.P.	1.51 ± 0.06	1.68 ± 0.04	1.93 ± 0.06	2.37 ± 0.11	2.55 ± 0.09	2.43 ± 0.08
Indometacina 8 mg/kg	1.57 ± 0.04 ns	1.67 ± 0.03 ns	1.95 ± 0.13 ns	1.98 ± 0.12 **	2.08 ± 0.11 *	2.33 ± 0.09
121.36 mg/Kg	1.46 ± 0.03 ns	1.64 ± 0.05 ns	1.98 ± 0.09 ns	2.45 ± 0.10 ns	2.25 ± 0.11 ns	2.28 ± 0.08

* p<0.05, ** p<0.01, ***p<0.001; comparado con el vehículo P.V.P

Como se observó en la tabla 3 el extracto clorofórmico de *H. marifolia* disminuye el edema auricular inducido por TPA ($32.5 \pm 6.0\%$ de inhibición), pero el aceite esencial de esta planta ni su componente mayoritario tienen actividad en este modelo, lo que sugiere que la actividad del extracto clorofórmico se debe a otro tipo de compuesto.

Edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA (inflamación crónica).

En la tabla 14 y figura 25 se observan los resultados obtenidos tras la evaluación de la actividad antiinflamatoria en el modelo de Edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA de los extractos clorofórmicos de *E. glabratum*, *S. villosa*, el aceite esencial de *H. marifolia* y *R-pulegona*.

Tabla 14. Efecto antiinflamatorio en el modelo del edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA de los extractos clorofórmicos de *Eupatorium glabratum*, *Senna villosa*, aceite esencial de *Hesperozygis marifolia* y *R-pulegona*.

Grupo	Dosis	Peso del edema (mg)	Porcentaje de inhibición
Control	Vehículo	7.36±0.44	-----
Indometacina	0.5 mg/oreja	4.20±0.47*	42.84±6.24
Extracto clorofórmico de <i>Eupatorium glabratum</i>	2 mg/oreja	4.74±0.30*	35.55±5.15
Extracto clorofórmico de <i>Senna villosa</i>	2 mg/oreja	4.17±0.34*	43.35±5.15
Aceite esencial de <i>Hesperozygis marifolia</i>	2 mg/oreja	5.27±0.33	28.30±5.32
<i>R-pulegona</i>	2 mg/oreja	6.21±0.28	15.58±5.15

*p<0.05 comparado con el vehículo

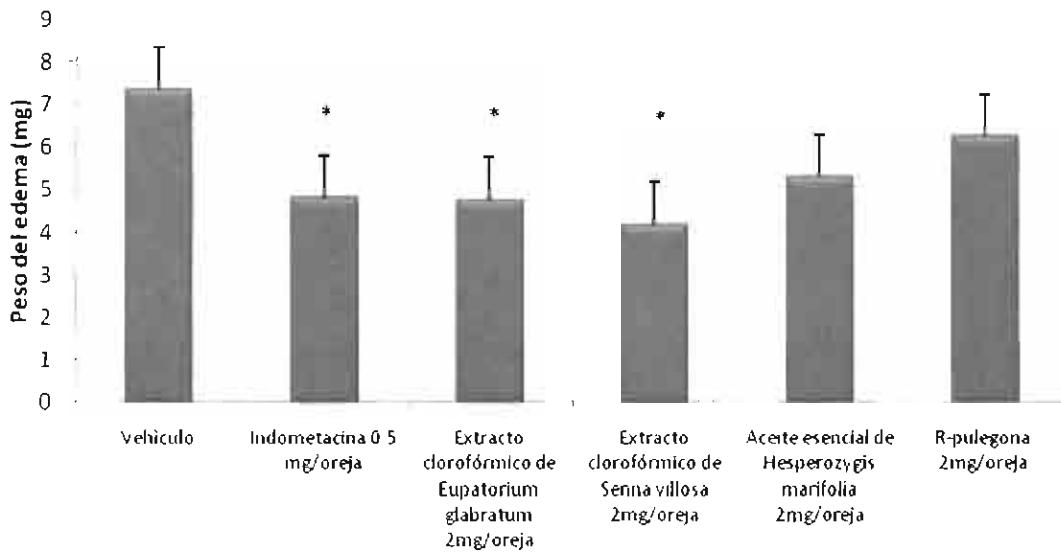


Figura 25. Efecto en el desarrollo del edema auricular en ratón producido por la aplicación múltiple de TPA de los extractos clorofórmicos de *Eupatorium glabratum*, *Senna villosa*, aceite esencial de *Hesperozygis marifolia* y *R-pulegona*. * $p < 0.05$ en comparación con el vehículo

El porcentaje de inhibición de los extractos clorofórmicos de *Eupatorium glabratum* y *S. villosa* fue de 35.55 ± 5.1 y $43.35 \pm 5.15\%$ respectivamente, efecto significativo con respecto al grupo control y similar al observado con el grupo de indometacina a una dosis de 0.5 mg/oreja ($42.84 \pm 6.24\%$ de inhibición).

El aceite esencial de *H. marifolia* y la *(R)-pulegona* no presentaron actividad significativa en estas condiciones experimentales.

Los resultados obtenidos muestran que los extractos clorofórmicos de *S. villosa* y *E. glabratum* tienen un efecto significativo sobre la inflamación inducida en la oreja por TPA en el modelo crónico.

Evaluación de actividad antinociceptiva.

Disfunción inducida por dolor en ratas (modelo PIFIR):

En la figura 26 se observa el curso temporal del extracto clorofórmico de *S. villosa* y *E. glabratum*, dichos extractos no presentan actividad antinociceptiva bajo estas condiciones experimentales.

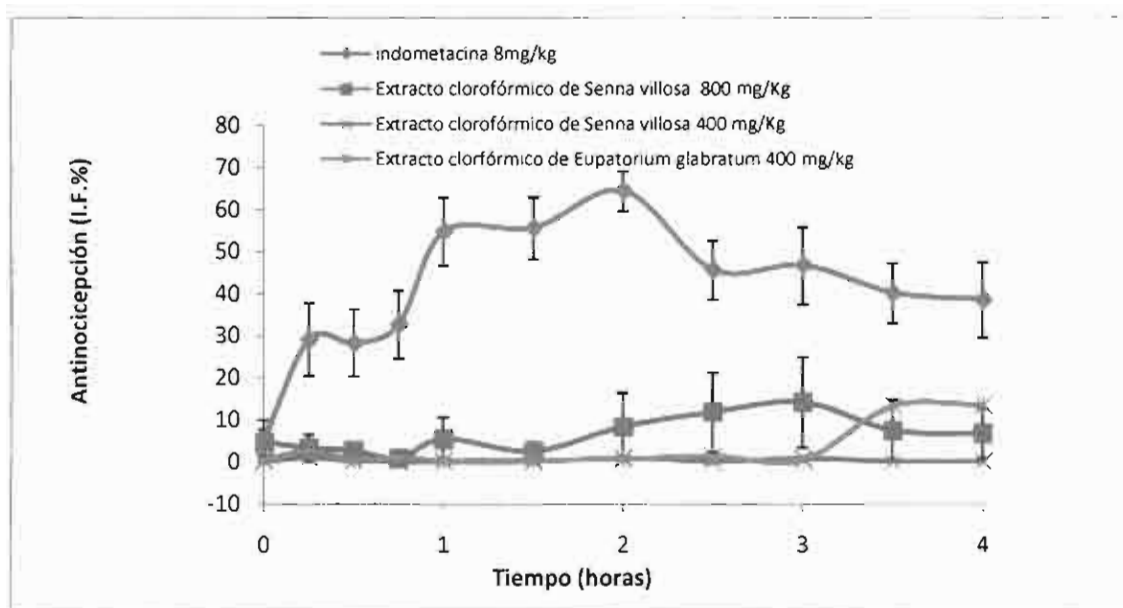


Figura 26 Curso temporal del efecto antinociceptivo de el extracto clorofórmico de *Senna villosa* y *Eupatorium glabratum* evaluados durante un periodo de 4 h

En la figura 27 se muestra el curso temporal de las diferentes dosis de (R)-pulegona. Se observa un efecto antinociceptivo mantenido a dosis de 200, 141.3 y 100 mg/kg mientras que a dosis de 70.8, 50 y 25 mg/kg no presenta actividad antinociceptiva bajo estas condiciones experimentales. Las dosis de 200, 141.3 y 100 mg/kg no presentan diferencia significativa entre ellas (Figura 28) y el efecto producido por estas es menor al de la indometacina a una dosis de 8 mg/kg.

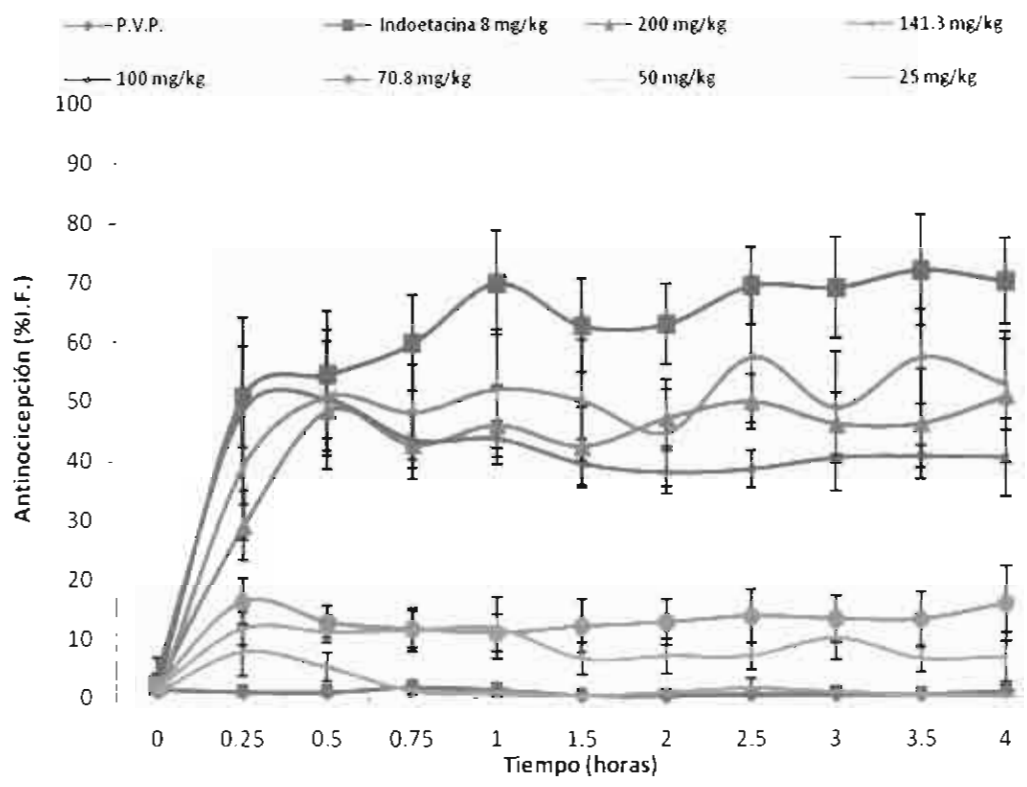


Figura 27. Curso temporal del efecto antinociceptivo de *R-pulegona* evaluada durante un periodo de 4 h

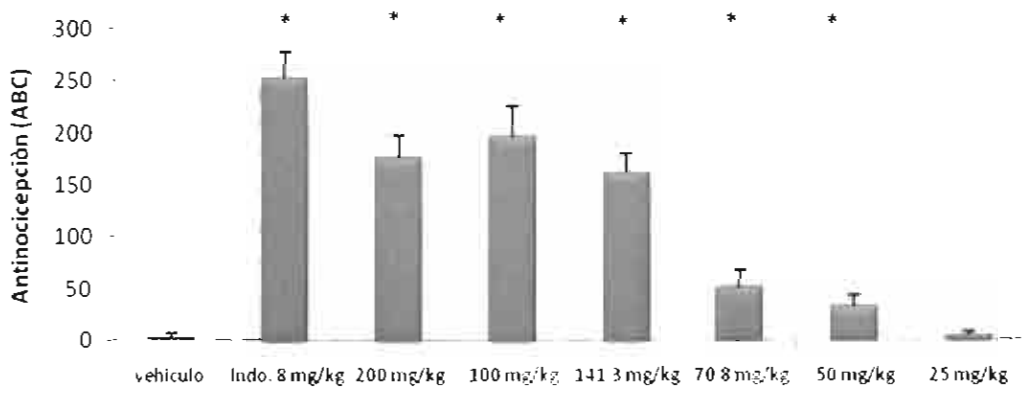


Figura 28 Resultados expresados como Área bajo la curva del porcentaje de funcionalidad observado en un periodo de 4 horas * $p < 0.05$ comparado con el vehiculo.

En la figura 29 se muestra la curva dosis respuesta de R-pulegona, la cual no presenta un efecto dependiente de la dosis.

El efecto antinociceptivo máximo de (R)-pulegona fue inferior al de la indometacina (196.93 ± 29.25 y 321.56 ± 15.83 unidades de área respectivamente). La $DE_{52.5}$ de (R)-pulegona es de 100 mg/kg y de la indometacina es de 7.33 mg/kg. Por lo que la indometacina es 13.64 veces más potente que la R- pulegona

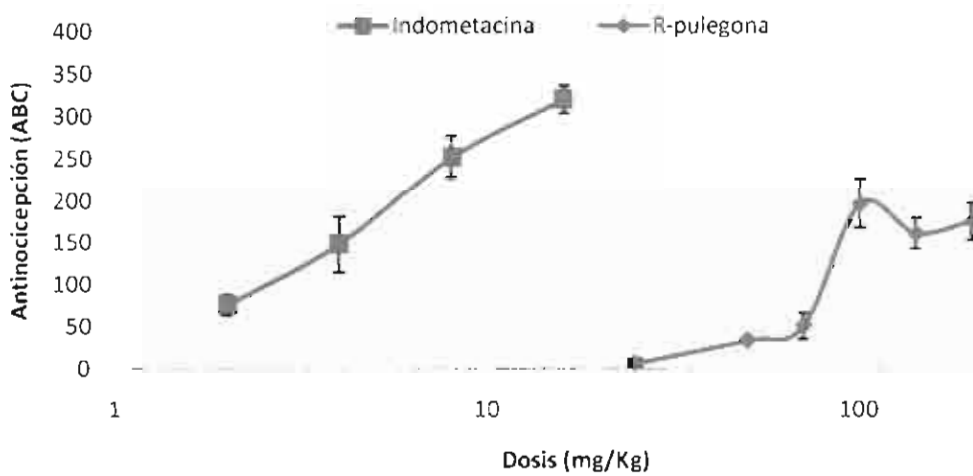


Figura 29. Curva dosis respuesta que presenta la R-pulegona en comparación con la indometacina.

Discusión

Los modelos farmacológicos que fueron empleados para el presente trabajo son una buena herramienta en la búsqueda de nuevos fármacos con propiedades antiinflamatorias y antinociceptivas. En nuestro caso las usamos esencialmente para determinar el potencial de tres especies vegetales como posibles fuentes de dichos fármacos.

El modelo de TPA agudo fue utilizado en este trabajo como modelo biológico monitor; 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

Los resultados obtenidos con los extractos clorofórmico, metanólico y acuoso de las tres plantas (tabla 15) muestran que en el modelo de TPA agudo los tres extractos clorofórmicos son los que presentaron la mayor actividad, sin embargo, el aceite esencial de *H. marifolia*, (R)-pulegona e (\pm)- isomentona no presentaron actividad en este modelo.

El edema inducido con carragenina es un modelo farmacológico *in vivo*; la inflamación producida por la carragenina se debe fundamentalmente a que esta sustancia estimula la producción de prostaglandinas.

Los extractos clorofórmicos y el aceite esencial, así como dos componentes mayoritarios del último se evaluaron en el modelo de edema plantar inducido por carragenina (tabla 15), a dosis de 400 mg/kg de los extractos y del aceite. También se evaluaron de (R)-pulegona e (\pm) - isomentona a dosis equivalentes a la concentración a la que se encuentran en el aceite, después de 180 min de la administración de la carragenina, se observó un efecto antiinflamatorio significativo en todos los casos, excepto en el de (\pm) - isomentona.

La administración de dosis múltiples de TPA produce una reacción inflamatoria prolongada que se caracteriza por edema, infiltración de las células inflamatorias e hiperplasia. El TPA estimula la fosfolipasa A₂ liberando ácido araquidónico y por consecuencia los mediadores eicosanoides.

Los extractos clorofórmicos de *E. glabratum* y de *S. villosa*, así como el aceite esencial de *H. marifolia* y R-pulegona también inhibieron el edema auricular crónico inducido por TPA.

Los extractos clorofórmicos de *E. glabratum* y de *S. villosa* mostraron actividad antiinflamatoria en los tres modelos usados. La actividad de ambos extractos es similar en los modelos de TPA crónico y de edema inducido por carragenina, pero el efecto de *E. glabratum* es mayor que el de *S. villosa* en TPA agudo.

El comportamiento de los extractos evaluados en el modelo de inflamación crónica inducida por la aplicación tópica de dosis múltiples de TPA demostró la capacidad antiinflamatoria que presentan los extractos para actuar por vía tópica e inhibir significativamente la respuesta inflamatoria.

Como se mencionó anteriormente, estudios fitoquímicos del extracto clorofórmico de *E. glabratum* reportan la presencia de ácido benzoico, 5,7-dihidroxi-4-metoxiflavona, ácido ilílico y ácido eupaglábrico (Guerrero y col.1978). El análisis fitoquímico del extracto hexánico de las hojas de *S.villosa* reveló la presencia de esteroides, flavonoides y antraquinonas (Mena, 1997) y del extracto clorofórmico se aisló el acetato de 8-hidroximetilen-trieicosanilo, el cual inhibe del crecimiento de *Tripanosoma cruzi*. (Guzmán, 2008). Debido a que los extractos clorofórmicos de ambas plantas son los que presentaron la mayor actividad antiinflamatoria se puede sugerir que algunos de los compuestos aislados de estos extractos sean los responsables de esta actividad, por lo que en estudio posterior se debe evaluar la actividad antiinflamatoria de estos compuestos, ya que no se encontró algún informe científico al respecto.

El extracto clorofórmico de *H. marifolia* presentó la mayor actividad antiedematosa en el modelo de TPA agudo y a las dosis de 100, 200 y 400 mg/kg no presentó diferencia significativa con respecto a su actividad antiinflamatoria en el modelo de edema inducido con carragenina. Por otra parte el aceite esencial aislado de esta planta no presentó actividad al ser evaluado en el modelo de TPA agudo, sin embargo si presenta actividad en el modelo crónico. Un comportamiento similar se presenta en los modelos de inflamación aguda y crónica inducido por TPA con la (R)-pulegona.

La (±)-isomentona no presenta actividad antiinflamatoria en ninguno de los modelos evaluados.

Tabla 15 Resultados concentrados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria en los modelos de edema inducido por TPA agudo y crónico; edema inducido con carragenina

Planta	Extracto	% de inhibición TPA agudo	% de inhibición TPA crónico	% de inhibición en modelo de carragenina a dosis de 400 mg/kg
Senna villosa	CHCl ₃	48.58 ± 5.03	43.45 ± 5.15	*
	MeOH	15.40 ± 4.86	-----	-----
	H ₂ O	12.94 ± 9.21	-----	-----
Eupatorium Glabratum	CHCl ₃	64.32 ± 5.32	35.55 ± 5.15	*
	MeOH	28.31 ± 7.64	-----	-----
	H ₂ O	Na	-----	-----
Hesperozygis Marifolia	CHCl ₃	32.46 ± 5.99	-----	*
	MeOH	19.43 ± 2.85	-----	-----
	H ₂ O	7.61 ± 2.73	-----	-----
	Aceite esencial	Na	28.30 ± 5.32	*
R – pulegona	-----	Na	15.58 ± 5.15	*
Isomentona	-----	Na	-----	na

*p<0.05 con respecto al control.

Los extractos clorofórmicos de *Senna villosa* y *Eupatorium glabratum* no presentaron actividad antinociceptiva bajo las condiciones experimentales del modelo PIFIR. La inducción de dolor en este modelo involucra la activación de noniceptores que estimulan la producción de prostaglandinas.

La (R)-pulegona si mostró actividad en este modelo. Los resultados obtenidos sugieren que posiblemente R-pulegona inhibe la producción ciclooxigenasas y de este modo reduce la producción de prostaglandinas; sin embargo, dada la complejidad de los procesos inflamatorios y antinociceptivos, no es posible asegurar no es posible asegurar cual es el mecanismo de acción de este compuesto, ni el de los extractos activos.

Los ensayos que se realizaron son preliminares; por lo que se sugieren otros ensayos que corroboren las actividades estudiadas en este trabajo. También es importante evaluar los posibles efectos adversos que presenten estos extractos y valorar si son menores que los que presentan los fármacos que actualmente se usan.

Conclusiones:

- Los extractos clorofórmicos de *Senna villosa*, *Eupatorium glabratum* y *Hesperozygis marifolia* presentan actividad antiinflamatoria en los modelos de edema auricular inducido con TPA agudo y crónico y en el de edema plantar inducido con carragenina.
- Los extractos metánolico y acuoso de *Senna villosa*, *Eupatorium glabratum* y *Hesperozygis marifolia* no presentaron actividad antiinflamatoria en el modelo agudo de edema auricular inducido con TPA.
- A las dosis usadas de los extractos clorofórmicos de *Senna villosa* y *Eupatorium glabratum* en el modelo PIFIR, no se observó actividad antinociceptiva.
- Los resultados obtenidos en esta investigación indican que *S. villosa* y *E. glabratum* son candidatas para ser empleadas en posteriores investigaciones encaminadas al descubrimiento de nuevos fármacos, por lo que sería conveniente emprender estudios biodirigidos para aislar los compuestos responsables de su actividad antiinflamatoria y determinar su mecanismo de acción.

Bibliografía

- Abul K., Abbas MBBS. (2004) Inmunología celular y molecular. Quinta edición. Elsevier Science. España. p.p. 277-294.
- Akerele O. (1993) Las plantas medicinales, un tesoro que no debemos desperdiciar. Foro mundial de la Salud. 14: 389-395.
- Almeida T.F., Roizenblatt S., Tufik S. (2004) Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. Brain Res.1000:40-56.
- Arend W.P. (2001) The innate immune system in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 44: 224-2234.
- Ashendel GL, Boutwell RK. (1979) Prostaglandin E and F levels in mouse epidermis are increased by tumor-promoting phorbol esters. Biochem. Biophys. Res. Commun. 90: 623-627.
- Asres K., Gibbons S., Hana E., Bucar F. (2005) Antiinflammatory activity of extracts and saponin isolated from *Melilatus elegans* Pharmazie. J. Ethnopharmacol. 60: 310-312.
- BADEPY (1985) Bancos de Datos Etnobotánicos de la Península de Yucatán.
- Bateman D.N., Kennedy J.G. (1995) Non-steroidal anti-inflammatory drugs and elderly patients. Brit. Med. J. 310: 817-818.
- Boletín UNAM DGCS-131 (2009) En riesgo de convertirse en un problema de Salud Pública, las enfermedades reumáticas. Banco de boletines UNAM. http://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2009_131.html
- Bourke E, Moynagh PN. (1999). Antiinflammatory effects of glucocorticoids in brain cells, independent of NF- κ B. J. Immunol. 163: 2113-2119.
- Brallyen E.E., Greenspan P., Hargrove J., Wicker L., Hartle D.K. (2007) Topical anti-inflammatory activity por *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model or mouse ear inflammation. J. Ethnopharmacol. 112:585-589.
- Brito A.R.M.S., Antonio M.A. (1998) Oral antiinflammatory and antiulcerogenic activities of hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae) J. Ethnopharmacol. 61:215-228.

- Bruneton J. (2001). Farmacognosia, Fitoquímica plantas medicinales. 2^{da} ed. Acribia. p.p. 580- 598.
- Butler M.S. (2004). The role of natural product chemistry in drug discovery. J. Nat. Prod. 67: 2141-2153
- Burke, J.R. (2001). Targeting phospholipase A2 for the treatment of inflammatory skin diseases. Current Opinion in Investigational Drugs 2, 1549–1552.
- Calzada F, Yépez-Mulia M., Aguilar A. (2006) In vitro susceptibility of *Entamoeba Histolytica* and *Giardia lamblia* to plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of gastrointestinal disorders. J ethnopharmacol. 108:367-370.
- Campbell J.N., Meyer R.A. (2006) Mechanisms of Neuropathic pain. Neuron. 52(1): 77-92.
- Carlson R.P., O'Neill-David L., Chang J., Lewis A.J. (1985). Zanthasaponins A and B, antiphospholipase A2 saponins from an antiinflammatory extract of *Zanha africana* root bark. Agents Actions. 17: 197-204.
- Chen L.J., Lebetkin E.H., Burka L.T. (2001) Metabolism of (R)-(+)-pulegone in F344 rats. Drug Metab Dispos. 29(12):1567-1577.
- Chimal A., González-Medrano F., Díaz I., Hernández A., Noriega R., Bravo E., Pérez J., Vázquez J. (1989) Investigación sobre flora y fauna silvestres de la Reserva de la Biósfera "El Cielo", Tamaulipas. Secretaría de Desarrollo Urbano y Ecología (SEDUE) and Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico, D.F. pág. 106.
- Cifuentes D.A., Simirgotis M.J., Favier J.S., Rotelli A.E., Pelzer L.E. (2001) Antiinflammatory activity from aerial part of *Baccharias medullosa*, Phytother. Res. 15: 529-531.
- Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S. (1998). Endothelial cell in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. Blood. 91: 3527-3561.

- Clavin M. L., Gorzalczany S., Miño J., Kadarian C., Martino V., Ferraro G., Acevedo C. (2000). Antinociceptive Effect of some Argentine Medicinal Species of Eupatorium. *Phytother. Res.*14: 275-277
- Covino B.G., Dubner, R. Gybels, J., Kosterlitz H.W., Liebeskind J.C., Sternbach R.A. (1980) IASP committee for research and ethical issues—ethical standards for investigations of experimental pain in animals. *Pain* 9, 141–143.
- Cruciani R.A., Nieto M.J. (2006) Fisiopatología y tratamiento del dolor neuropático: avances más recientes. *Rev.Soc.Esp.Dolor.*5:312-327.
- Crunkhon P., Meacock B.K. (1971) Mediators of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of an aqueous extract of *Erythraea centarium*. *Planta Medica* 57, 34-37.
- Cuéllar M.J., Giner R.M., Recio M.C., Just M.J., Máñez S., Cerdán M., Hostettmann K., Ríos J.L. (1997) *Nat. Prod.* 60: 1158-1160.
- Decker J.M. (2000). *Introduction to Immunology*. Ed. Blackwell, Inc. University of Arizona. p.p. 286- 297.
- Đorđević S., Petrović S., Dobrić S., Milenković M., Vučićević D., Žižić S., Kukić K. (2007) Antimicrobial, anti-inflammatory, anti-ulcer and antioxidant activities of *Carlina acanthifolia* root essential oil *J. Ethnopharmacol.* 109: 458-463
- Euchenhofer C., Maihofer C., Brune K., Tegeder I., Geisslinger M. (1998) Differential effect of selective cyclooxygenase (COX-2) inhibitor NS-398 and diclofenac on formalin- induced nociception in the rat. *Neurosci. Lett.* 248: 25-28
- Ferraro G. E., Martino V.S., Coussio J. D. (1988) 4', 4'-Dimethylcupressuflavone from *Eupatorium subhastatum*. *J. Nat. Prod.* 586-587.
- Fischer S.M., Lee W.Y., Lochniskar M.F. (1995) The pro-inflammatory and hyperplasiogenic action of interleukin-1 α in mouse skin. *Prog. Clin. Biol. Res.* 391: 161.

- Fürstenberger G., Csuk-Glänzer B.J., Marks F., Keppler D. (1994) Phorbol ester-induced leukotriene biosynthesis and tumor promotion in mouse epidermis. *Carcinogenesis*. 15: 2823-2827.
- Fürstenberger G., Richter H., Fusenig N.E., Marks F. (1981) Differentiation modulates the response of guinea pig epidermal keratinocytes to the stimulation of DNA synthesis by TPA. *Cancer Lett*. 11: 191-198.
- Gábor M. (2000) Mouse ear inflammation models and their pharmacological application. Akadémia Kiadó, Budapest. pp 28-37.
- Gallin J.I., Goldstein I.M., Snyderman R. (1992) *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. Second Edition. Edit. Raven Press. p.p. 1-10.
- Garcia C.M.L. (1994) Estudio fitoquímico de *Hesperozygis marifolia* (Labiatae or Lamiaceae Tesis Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Garcia-Conde J., Sánchez J.M., González J., (2004) *Patología general: Semiología clínica y fisiopatología*. McGraw-Hill. Madrid. p.p 350-370.
- García M.D., Fernández M.A., Alvarez A., Saenz M.T. (2004) Antinociceptive and antiinflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var, ozua (Myrtaceae) J. *Ethnopharmacol*. 91: 69 -73.
- Gordon W. P., Forte A.J., McMurtry R.J., Gal H., Nelson S.D. (1982) Hepatotoxicity and pulmonary toxicity of pennyroyal oil and its constituents terpenes in the mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 65: 413-424.
- Guerreo C., Silva M., Maldonado E., Martínez M., (1978) Ácido Eupaglábrico un nuevo compuesto aislado de *Eupatorium glabratum* H.B.K. *Rev. Latinoamer. Quim*. 9: 71-75.
- Gupta S., Crofford L.J. (2001) An update on specific COX-2 inhibitors: The COXIBs. *Bull. Rheum. Dis*. 50: 1-4.
- Guzmán E., Pérez C., Zavala M.A., Acosta-Vianna K.Y., Pérez S. (2008) Antiprotozoal activity of (8 – Hidroxymethylen)- triecosanyl acetate isolated from *Senna villosa*. *Phytomed*; 15(10):892-5
- Hambleton P., Miller P. (1989) Studies on carrageenan air pouch inflammation in the rat. *Br J Exp Path*; 70: 425-33

- Hardman J.G., Limbird L.E., Molinoff P.B., Ruddon Gilman A.G. (1996) Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. Vol.1 Novena edición. Ed. McGraw-Hill Interamericana. México. p.p. 325-369.
- Hla T, Bishop-Bailey D, Lliu CH, Schaerferes HJ, Trifan OC. (1999) Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 31: 551-557.
- Julius D., Basbaum A.I. (2001) Molecular mechanisms of nociception. *Nature.* 413: 203-210.
- Kalant H. (1998) Principios de farmacología médica. Edit. Oxford University Press 6ª. 419-420.
- Karres I., Kremer J.P., Dietl I., Steckholzer U., Jochum M., Ertel W., (1998) Chloroquine inhibits proinflammatory cytokine release into human whole blood. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 274: R1058-R1064.
- Katewa S., Chaudhary B., Jain A. (2004) Folk herbal medicines from tribal area of Rajasthan, India. *J. Ethnopharmacol.* 92: 41-46.
- Katzung B.G. (2007) Farmacología básica y clínica. 10ª edición. Edit. Panamericana. Buenos Aires Argentina. p.p. 220-230.
- Kuby J. (1997). Leukocyte migration and inflammation. *Immunology.* WH Freeman & Co. N.Y. pp. 357-412.
- Kuklinski C. (2003) Farmacognosia, Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. 1ª ed. Omega p.p. 730 – 747.
- Lee Y., Lee C., Oh U. (2005) Painful channels in sensory neurons. *Molecules and cells.* 20: 315-324.
- Ley K. (2001). *Physiology of inflammation.* Oxford University Press, NY, pp: 1-10.
- López-Muñoz F.J., Castañeda G., Flores F.J., Granados V. (1996) Effect of caffeine coadministration and of nitric oxide synthesis inhibition on the antinociceptive action of ketorolac. *Eur. J. Pharmacol.* 25: 308(3):275-7.
- López-Muñoz F.J., Salazar L.A., Castañeda-Hernández G., Villareal J.E. (1993) A new Model to Assess Analgesic Activity: Pain- induced Functional Impairment en the Rat. *Drug. Develop. Res.* 28:169-175

- Loro J.F., Del Río J., Pérez – Santa L. (1999) Preliminary studies of analgesic and antiinflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extracts. *J. Ethnopharmacol.* 67:213 – 218.
- Mahboubi M., Haghi G. (2008) Antimicrobial activity and chemical composition of *Mentha pulegium* L. essential oil *J. Ethnopharmacol.* 119:325-327
- Marchand F., Perretti M., McMahon B.S. (2005) Role of the immune system in chronic pain. *Nature Rev.* 6:521-532.
- Masa M., Kumiko M., Yoshitaka T. (2006) Involment of tumor necrosis factor (TNF)- α phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13acetate (TPA)-induced skin edema in mice, *Biochem. Pharmacol.* 71 pp. 1331-1336.
- Mattson C. P. (2006) *Fisiopatología.* 7a edición. Editorial Médica Panamericana. p.p. 387-402
- Maity T.K., Mandal S.C., Mukherjee P.K. (1998) Studies on anti-inflammatory effect of *Cassia tora* leaf extract (Fam. Leguminosa) *Phytother. Res.* 12: 221-223.
- Mena J.G., Pech S.G., Brito L., (1997) Anthraquinones from *Senna villosa* mil. *Rev. Latinoam. Quim.* 25(3):128-131.
- Metwally A. M., Ekejiuba E. C. (1981) Methoxylated Flavonols and Flavonones from *Eupatorium odoratum*. *J. Med. Plant Res.* 403-405.
- Morobise O., Facfunso M.A., Makinde J.M., Oladije O.A. y Awe E.O. (2002) Antinflammatory and analgesic property of leaves of *Gongronema latifolium*. *Phytother. Res.* 16:575-577.
- Molck A.M., Poulsen M., Lauridsen S., Olsen P. (1998) Lack of histological cerebellar changes in Wistar rats given pulegone for 28 days. Comparison of immersion and perfusion tissue fixation. *Tox. Lett.* 95 (2): 117-122.
- Moreno O.M. (1975) Acute oral toxicity in rats and dermal toxicity in rabbits. Unpublished report to Research Institute for Fragrance Materials, MB Research Laboratories, Inc., Spinnerstown, Pennsylvania, USA. Submitted to WHO by the flavor and Extract Manufactures Association of the United States, Washington D.C. U.S.A.

- Moolla A., Viljoen A.M. (2008) 'Buchu' – *Agathosma betulina* and *Agathosma crenulata* (Rutaceae): A review. *J. Ethnopharmacol.* 119 (28): 413-419
- Murphy J.E., Morales R.E., Scott J., Kupper T.S. (2003) IL-1 α , innate immunity, and skin carcinogenesis: the effect of constitutive expresión of IL-1 α in epidermis on chemical carcinogenesis. *J. Immunol.* 170: 5697-5703.
- Muschietti L., Gorzalczany S., Ferraro G., Acevedo C., Martino V. (2001) Phenolic Compounds with Anti-Inflammatory Activity from *Eupatorium buniifolium*. *Planta Medica.* 743-744.
- Mycek M.J., Harvey R., Champe P. (2004) *Farmacología. Segunda Edición.* Edit. McGraw Hill. México. p.p. 145 – 170.
- Nelson S.D., Mc. Clanahan R.H., Thomassen D., Gordon W.P., Knelbe N. (1992) Investigations of mechanisms of reactivite metabolite formation from (R) - (+) – pulegone. *Xenob.* 22 (9-10): 1155 – 1164.
- Olajide A.A., Olubusayo A.S., Modupe M.J., Ekhelar A.I., Olusola A., Morebise Okpako D.T. (2000) Studies on the anti-inflammatory, antipyretic and analgesic properties of *Alstonia boonei* stem bark. *J Ethnopharmacol* 71:179-186.
- Pérez – Guerrero C., Herrera M.D., Ortiz R., Fernández M.A. (2001) A Pharmacological study of *cecropia obtusifolia* Betrol aqueous extracts. *J. ethnopharmacol.* 76: 279-284.
- Recio M.C., Giner R.M., Máñez S., Ríos J.L. (1995) Screening of topical medicinal plants for antiinflammatory activity. *Phytother. Res.* 9: 571-574.
- Rhen T., Cidlowxki J.A. (2005) Antiinflammatory action of glucocorticoids- new mechanisms for old drugs. *N. Engla. J. Med.* 353: 1711-1723.
- Robbins C. (1995) *Patología estructural y funcional.* 5ª Edic. Edit. Interamericana MC.Graw-Hill. p.p. 57-103.
- Rodríguez C., Rodríguez A., Servín D. (2005) *Farmacología clínica.* Primera edición. Edit. McGraw Hill. México. p.p. 235-290.
- Roitt I., Brostoff J., Male D. (1993) *Inmunology.* Mosby-Year book Europe. 3ª Edit. London, England. p.p. 12-22.

- Sah D.W.Y., Ossipov M.H., Porreca F. (2003) Neurotrophic factor as novel therapeutics for neuropathic pain. *Nature*. 2: 460-472.
- Sato H, Hashimoto M., Sugio K., Ohuchi K., Tsurufuji S. (1980) Comparative study between steroidal and non-steroidal anti-inflammatory drugs on the mode of their action on vascular permeability in rat carrageenan air pouch inflammation. *J. Pharmacobiodyn.* 3: 345-52.
- Schadow A., Scholz - Pedretti K., Lambeau G., Gelb M., Fürstenberger G., Pfeilschifter J., Kaszkin M. (2001) Characterization of grupo X phospholipase A2 as the major enzyme secreted by human keratinocytes and its regulation by the phorbol ester TPA. *J. Inv. Derm.* 116: 31-39.
- Schmidt-Lebuhn A.N. (2008) Ethnobotany, biochemistry and pharmacology of *Minthostachys* (Lamiaceae) *J. Ethnopharmacol.* 13: 343-353
- Sedgwick A.D., Lees P. (1986) A comparison of air pouch sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions.* 18: 439-46
- Sheldon J., Balick M., Laird S. (1997) Medicinal plants: Can utilization and conservation coexist? *New York Botanical Garden. Nueva York. E.E.U.U.* 104.
- Sheresta P., Dhillon S. (2003) Medical plant diversity and use in the highlands of Doloka district, Nepal. *J. Ethnopharmacol.* 66: 159-165.
- Sholz J., Woolf J.C. (2002) Can we conquer pain? *Nature Neuroscience supplement.* 5:1062-1067.
- Stanley P.L., Steiner H., Havens M., Tramposch KM. (1991). *Skin Pharmacol.* 4: 262-271.
- Stites D.P., (1998) *Inmunología básica y clínica. Tercera edición. Edit. Manual Moderno. México.* p.p. 215-235.
- Sujong K., Hong Il, Jung Sun H., Kyu C., Sik R.H., Duuck Hee K., Ihseop C, Seung L., Mi-Okc L., Sung H. (2006). Phytospohingosine Stimulates de Differentiation of Huma Keratinocytes and Inhbits TPA-Induced Inflammatory Epidermal Hyperplasia in Hairless Mouse Skin, *Mol Med* 12(1-3) p.p. 17-24.

- Sur T., Pandit S., Battacharyya D., Kumar A.C.K., Lakshmi M.S., Chattopadhyay D., Mandal S.C. (2002) Studies on the antiinflammatory activity of *Betula alnoides* bark. *Phytother. Res.* 16, 669 – 671.
- Tanabe T., Tohnai N. (2002) Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandines other lipid mediat.* 68-69: 95-114.
- Terr A. I. (1994) Mecanismos de inflamación. *Inmunología Humana y Básica* (Eds) Stites DP, Terr AI. Manual Moderno SA de CV, México, pág 206.
- Thorup J., Würten G., Cartensen J., Olsen P. (1983) Short term toxicity study in rats dosed with pulegone and menthol. *Toxicol Lett.* 19(3): 207-210.
- Tracey K J. (2002). The inflammatory reflex. *Nature.* 420: 853-859.
- Vane J.R., Bakhle Y.S., Botting R.M. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* 38: 97-120
- Ventura – Martínez R., Díaz M.J., Hernández G.P., Domínguez A.M., Salazar L.A., Cabré F., López-Muñoz F.J. (2000) Role of COX-1 and COX-2 synthesized prostaglandins in a rat model of arthritic pain. *Drug. Dev. Res.* 51(4):253-259.
- Ventura-Martinez R., Díaz M.J., Déciga Campos M., Terron J. (2002) Involvement of peripheral cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in inflammatory pain. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 405-412.
- Villavicencio M.A., Pérez B.E., Ramírez A. (2002) Plantas útiles del Estado de Hidalgo II. Universidad del Estado de Hidalgo.
- Wang H. (1999) HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science.* 285: 248-251.
- Winter C.A, Riseley E., Nuss G.W. (1962) *Proc Soc Experimental Biol Med* 111:544-547.
- Woolf C. y Ma Q. (2007) Nociceptors-Noxious stimulus detectors. *Neuron.* 55: 353-364.
- Wyk B.E. (2008). A broad review of commercially important southern African medicinal plants *J. Ethnopharmacol.* 119 (3) : 342-355.

- Yeon L., Kil B.C., Taesook Y., Sook C.M., Hye Won L., Yeong L. A., Kyoung K. H. (2009) Anti-inflammatory effects of *Asparagus cochinchinensis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation. *J. of Ethnopharmacol.* 2:28-34.
- Young J.M, De Young L.M. (1989) In: Change, J.Y. Lewis, A.J.(Eds), *Pharmacological methods control of inflammation*. Alan R.Liss. Inc., New York, pp.215-231.
- Zambrano S.A. (2007) *Inmunología: Básica y clínica*. Octava edición. Edit. McGraw-Hill. México. p.p. 180-195.
- Zimmermann M. (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16:109-110.