

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

QUÍMICA MEDICINAL

**“Estudio químico-farmacológico del efecto antiinflamatorio y
antinociceptivo de *Centaurea americana*”**

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

PRESENTA

Q.F.B. JIMÉNEZ PÉREZ ESTANISLAO

2171802085

COMITÉ TUTORAL

TUTOR:

DR. ZAVALA SÁNCHEZ MIGUEL ÁNGEL

ASESORA:

DRA. GODÍNEZ CHAPARRO BEATRIZ

ASESOR:

DR. MORENO ROCHA LUIS ALFONSO

Noviembre 2019

**“Estudio químico-farmacológico del efecto antiinflamatorio y antinociceptivo
de *Centaurea americana*”**

Comité Tutorial

Vo. Bo. Tutor

Dr. Zavala Sánchez Miguel Ángel

Vo. Bo. Asesora

Dra. Godínez Chaparro Beatriz

Vo. Bo. Asesor

Dr. Moreno Rocha Luis Alfonso

Q.F.B. Jiménez Pérez Estanislao

2171802085

**“Estudio químico-farmacológico del efecto antiinflamatorio y antinociceptivo
de *Centaurea americana*”**

Jurado del examen de grado

Vo. Bo. Presidente

Dr. López Muñoz Francisco Javier

Vo. Bo. Vocal

Dra. González Trujano María Eva

Vo. Bo. Secretario

Dr. Zavala Sánchez Miguel Ángel

Q.F.B. Jiménez Pérez Estanislao

2171802085

RESUMEN

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo ante un estímulo ya sea físico, químico o biológico. Al activarse el sistema inmune del organismo, las células implicadas en el proceso inflamatorio, así como las moléculas liberadas por estas, regulan la respuesta inflamatoria teniendo como características cuatro manifestaciones clínicas principales: calor, rubor, tumor y dolor.

De acuerdo con la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP, por sus siglas en inglés), el dolor se define como “una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada a un daño tisular real o potencial y que puede ser descrito en términos de dicho daño”.

El tratamiento farmacológico para la inflamación y el dolor comprende principalmente dos grupos de fármacos: antiinflamatorios esteroideos y no esteroideos (AINE). Ambas clases de fármacos producen efectos adversos, por lo que el empleo de plantas medicinales representa una alternativa en el tratamiento de la inflamación y el dolor.

Entre la diversidad vegetal se encuentra la especie *Centaurea americana*. En el presente proyecto se evaluó la actividad antiinflamatoria de los extractos clorofórmico (CHCl_3) y metanólico (MeOH) de *C. americana* en el modelo del edema auricular inducido con aceite de crotón, así como la actividad antinociceptiva en la prueba de formalina al 1% en rata. Los resultados muestran un porcentaje de inhibición del edema auricular del $48.77 \pm 9.62\%$ y $28.14 \pm 11.11\%$ con los extractos de CHCl_3 y MeOH , respectivamente. La evaluación del efecto antinociceptivo se realizó solo con el extracto CHCl_3 debido a que presentó un mayor porcentaje de inhibición del edema auricular. La administración local en el dorso de la pata derecha de la rata dio como resultado un efecto dosis dependiente obteniendo el máximo efecto a la dosis de 200 μg /pata.

La separación del extracto CHCl_3 por cromatografía en columna abierta dio como resultado 9 fracciones (F1-F9). Se evaluó la actividad antiinflamatoria de las fracciones, las cuales solo 6 mostraron actividad antiinflamatoria significativa (F4-F9). Posteriormente, se realizó cromatografía en capa fina a las fracciones con actividad y se juntaron aquellas con patrones similares para su posterior fraccionamiento. Del segundo fraccionamiento solo se evaluaron aquellas fracciones de las que obtuvieron rendimientos mayores a 15 mg. Las fracciones AB3-AB7 se evaluaron y las que mostraron actividad antiinflamatoria significativa fueron las fracciones AB4, AB6 y AB7.

Con base en los resultados se propone continuar con el estudio de *C. americana* a fin de aislar e identificar al menos un compuesto responsable de la actividad farmacológica, así como buscar el posible mecanismo de acción.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco por haberme permitido cursar la Maestría en Ciencias Farmacéuticas.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría No. 624583, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Miguel Ángel Zavala Sánchez por haberme permitido formar parte de su grupo de trabajo y en especial por brindarme su apoyo, confianza y amistad.

A mis asesores, por las aportaciones hechas a lo largo de este trabajo, pero sobre todo por su paciencia: Dra. Beatriz Godínez y Dr. Luis Alfonso

A mis padres, por todo el cariño y apoyo para la continuación de mi formación académica.

A Raúl por continuar a mi lado y lograr esto juntos.

A los padres de Raúl por su apoyo durante todos estos años, muchas gracias.

A mis amigos de laboratorio y de maestría: Anabel, Sergio, Ceci, Maritza, Itzel, Damaris, Cinthya y Gabriela, por haberme brindado su apoyo y amistad durante la maestría.

ÍNDICE

RESUMEN	4
ÍNDICE DE FIGURAS	9
1. INTRODUCCIÓN	12
2. MARCO TEÓRICO	14
2.1 Inflamación	15
2.1.1 Manifestaciones de la inflamación	16
2.1.2 Células implicadas en el proceso inflamatorio	17
2.1.3 Mediadores inflamatorios	17
2.2 Dolor	22
2.2.1 Proceso de nocicepción	23
2.2.2 Clasificación del dolor	25
2.2.3 Sensibilización periférica	28
2.2.4 Sensibilización central	30
2.3 Terapia farmacológica	32
2.4 Medicina tradicional	36
2.4.1 Género <i>Centaurea</i>	37
2.4.1.1 <i>Centaurea americana</i> Nutt	37
3. HIPÓTESIS	39
4. OBJETIVO GENERAL	39
5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
6. MATERIAL Y MÉTODOS	40
6.1 Material vegetal	40
6.2 Obtención de los extractos	40
6.3 Animales	40

6.4 Diseño experimental	41
6.5 Fraccionamiento del extracto activo	43
6.6 Evaluación de las fracciones obtenidas	44
6.7 Análisis Estadístico	44
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
7.1 Obtención de los extractos.....	45
7.2 Efecto antiinflamatorio	45
7.3 Efecto antinociceptivo	53
7.4 Evaluación de la actividad antioxidante.....	60
8. CONCLUSIONES	63
9. PERSPECTIVAS.....	64
10. BIBLIOGRAFIA	65
11. ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Síntesis de los metabolitos del ácido araquidónico	18
Fig. 2 Procesos nociceptivos.....	23
Fig. 3 Dolor nociceptivo.....	25
Fig. 4 Dolor inflamatorio	26
Fig. 5 Dolor patológico	27
Fig. 6 Mediadores en la sensibilización periférica	29
Fig. 7 Sensibilización central	31
Fig. 8 Representación esquemática de la acción de los glucocorticoides	32
Fig. 9 Estructura química de algunos fármacos antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides)	33
Fig. 10 Estructura química de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE).....	34

Fig. 11 Representación esquemática del mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE)	34
Fig. 12 <i>Centaurea americana</i>	37
Fig. 13 Efecto antiinflamatorio de los extractos CHCl ₃ , MeOH e indometacina en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton en ratones	46
Fig. 14 Efecto antiinflamatorio de las fracciones del extracto CHCl ₃ de <i>C. americana</i> e indometacina en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton en ratones.....	47
Fig. 15 A) Estructura química de la cinaropicrina; B) Estructura química del β -sitosterol.	48
Fig. 16 Efecto antiinflamatorio de las fracciones del extracto clorofórmico de <i>C. americana</i> e indometacina en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton en ratones	50
Fig. 17 Curso-temporal del efecto del Ext. CHCl ₃ de <i>C. americana</i> (31.6, 100, 200 y 300 μ g/pata), Ext. MeOH (200 μ g/pata), diclofenaco (100 μ g/ pata) y vehículo (Sol. salina + DMSO 5%) en la prueba de formalina al 1% en rata.....	53
Fig. 18 Área bajo la curva del número de sacudidas en el grupo diclofenaco, vehículo, extracto MeOH y dosis del extracto CHCl ₃ en la prueba de formalina al 1% en rata.....	54
Fig. 19 Efecto antinociceptivo del extracto CHCl ₃ , MeOH, Diclofenaco y Vehículo en la prueba de formalina al 1% en rata.....	55
Fig. 20 A) Curso-temporal de las fracciones de <i>C. americana</i> , diclofenaco (100 μ g/pata) y vehículo (Sol. salina + DMSO 5%) en la prueba de formalina al 1% en rata; B) Efecto antinociceptivo de las fracciones de <i>C. americana</i> , diclofenaco y vehículo	57
Fig. 21 A) Curso-temporal del efecto de las fracciones de <i>C. americana</i> (200 μ g/pata), diclofenaco (100 μ g/ pata) y vehículo (Sol. salina + DMSO 5%) en la prueba de formalina al 1% en rata. B) Efecto antinociceptivo de las fracciones de <i>C. americana</i> , diclofenaco y vehículo en la prueba de formalina al 1% en rata.....	58
Fig. 22 Efecto antioxidante del extracto CHCl ₃ y Quercetina por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).....	60

Fig. 23 Estructura química de quercetina	61
Fig. 24 Efecto antioxidante del segundo fraccionamiento de <i>C. americana</i> por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).....	62

1. INTRODUCCIÓN

La inflamación es la respuesta del sistema inmunológico de un organismo al daño causado a sus células y tejidos vascularizados por patógenos bacterianos y por cualquier otro agresor de naturaleza biológica, química, física o mecánica. Aunque dolorosa, la inflamación es normalmente una respuesta reparadora. Sin embargo, en ocasiones transcurre hacia una situación crónica que suele dar lugar a una enfermedad degenerativa como artritis, arteriosclerosis o incluso cáncer (León Regal et al., 2015). Aunque suele acompañarse de una respuesta generalizada caracterizada por un cuadro clínico pasajero de sensación de malestar general y fiebre, en ocasiones la inflamación provoca una reacción orgánica generalizada que, en una secuencia de reacciones sin control conduce al fracaso funcional de los diferentes órganos y sistemas teniendo como consecuencia la muerte del individuo (Kumar, 2015).

En su conjunto, las células implicadas en el proceso inflamatorio, así como las moléculas liberadas por éstas, regulan la respuesta inflamatoria teniendo como características cuatro manifestaciones clínicas principales: calor, rubor, tumor y dolor (Vega, 2008).

El dolor, al igual que la inflamación forma parte de los sistemas que tiene el organismo para mantener la homeostasis, ya que en condiciones normales tiene una función protectora, de defensa, o alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo (Bataille & Chausset, 1997). Sin embargo, existen patologías en las que el dolor se convierte en el centro de la enfermedad (Ortega, Roca, & Micó, 2002).

Para el tratamiento de estos síntomas, en la actualidad se utilizan dos clases de fármacos. Los fármacos esteroidales y los no esteroidales (AINE). Los cuales si son administrados de forma prolongada pueden producir efectos adversos tales como: estreñimiento, sedación, depresión respiratoria, disminución de la competencia inmunológica, supresión inespecífica de la respuesta inflamatoria, incremento de la producción de ácido clorhídrico y pepsina (Bourke, 1999; Rhen, 2005) que inducen

la producción de úlcera gástrica, así como toxicidad gastrointestinal y renal. Estos efectos se deben a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en el estómago o en la médula renal (Avram, 2009; Bremmer, 2001; Renda, 2010). Lo anterior, justifica la búsqueda de nuevas moléculas con actividad antiinflamatoria y antinociceptiva, que produzcan menos efectos adversos. Las plantas medicinales representan una fuente importante de moléculas para el desarrollo de nuevos fármacos con menos efectos no deseados. México cuenta con una gran diversidad vegetal, de la cual solo muy pocas especies cuentan con estudios formales que ratifiquen su actividad biológica (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales [SEMARNAT], 2002, Informe de la situación del medio ambiente en México). Entre la diversidad vegetal se encuentra el género *Centaurea* el cual ha sido utilizado ampliamente en la medicina popular durante cientos de años como antidiarreico, antirreumático, antiinflamatorio, antipirético y antibacteriano; entre las diferentes especies se menciona *Centaurea americana*, especie perteneciente a la familia Asteraceae, la cual es nativa del norte de México (Coahuila y Nuevo León) y es utilizada por la población para diversos trastornos del hígado.

En el presente trabajo se estudió el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de los extractos clorofórmico y metanólico de las partes aéreas de *C. americana*; contribuyendo de esta manera a corroborar científicamente la actividad farmacológica que se le atribuye en la medicina tradicional mexicana, y participando en la búsqueda de nuevas moléculas que sirvan como precursores de nuevos fármacos que produzcan menos efectos adversos.

2. MARCO TEÓRICO

Entre los desafíos de la salud pública, se encuentra el manejo de las enfermedades crónico-degenerativas, enfermedades que de acuerdo con la OMS (2018) son de larga duración y de progresión lenta. Ejemplos de estas es el síndrome metabólico, la diabetes, las cardiopatías, el cáncer, enfermedades respiratorias y osteoarticulares. Estas enfermedades representaron en el año 2018, de acuerdo con el INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía), el 88.6% de las defunciones en el país. Además, estas representan una carga para el sistema de salud, pues afectan la vida productiva de la población y su calidad de vida. Además de que, al tratarse de enfermedades multifactoriales, el tratamiento se vuelve complejo. Por lo que es de suma importancia el tratar de disminuir la progresión de estas enfermedades con el fin de mejorar la calidad de vida de la población.

Como se mencionó anteriormente, las enfermedades crónico-degenerativas son multifactoriales. Algunos de los mecanismos fisiopatológicos presentes en ellas se han identificado, entre los cuales podemos mencionar: el estrés oxidativo, la inflamación (aguda y crónica), el dolor, así como la apoptosis. El tratamiento para estas patologías se enfoca en algunos de estos mecanismos para evitar la progresión de la enfermedad (OMS, 2019; Serra, 2018).

2.1 Inflamación

Existen diversos mecanismos de defensa del cuerpo humano contra estímulos exógenos o endógenos (isquemia, interacciones antígeno-anticuerpo, traumatismo, lesiones térmicas o fisicoquímicas). Uno de estos mecanismos es la inflamación, proceso que comienza tras una lesión inicial generando vasodilatación la cual a su vez origina enrojecimiento o rubor, un aumento local de la temperatura y dolor. La causa fundamental de estos efectos es la extravasación del líquido del plasma a los tejidos, debido a la vasodilatación inicial causada. Posteriormente, hay una migración celular iniciada por los neutrófilos, seguidos de los monocitos y finalmente las células reticuloendoteliales (Ríos, 1994).

La magnitud de la respuesta inflamatoria es crucial para la supervivencia del individuo. Considerando que una respuesta inflamatoria insuficiente resulta en inmunodeficiencia, lo cual puede conducir de una infección hasta el cáncer (Gómez Estrada, González Ruiz, & Domingo Medina, 2011).

Por otro lado, se ha observado un incremento de las células y metabolitos involucrados en la respuesta inflamación en enfermedades tales como: obesidad, accidentes cardiovasculares, fatiga, depresión, reacciones alérgicas (Donath, 2013; Efthimiou, 2015; Panickar, 2015), asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y peritonitis (Nathan, 1987). En este sentido, conociendo los mecanismos moleculares que vinculan la inflamación con el dolor, se pueden desarrollar o aislar nuevas moléculas para el tratamiento de la inflamación y el dolor (S. Ronchetti, 2017).

2.1.1 Manifestaciones de la inflamación

La inflamación puede ser clasificada de acuerdo con su temporalidad: en aguda y crónica. La inflamación aguda es aquella que se presenta en un lapso relativamente corto con una duración de minutos, horas o de pocos días. Tiene como principales características la exudación de fluidos y de proteínas plasmáticas formadoras del edema y el flujo de leucocitos (neutrófilos principalmente) hacia el sitio de la lesión (Susanaga, 2014). La inflamación crónica tiene una duración mayor y se caracteriza por la presencia de linfocitos y de macrófagos, así como por la proliferación de vasos sanguíneos y de tejido conjuntivo (Robbins et al, 1995). En la respuesta inflamatoria crónica, la acumulación de altas concentraciones de macrófagos activados produce lesión tisular severa, ya que dichas células liberan enzimas hidrolíticas y radicales libres. Asimismo, secretan TNF- α , citocina que ejerce actividad citotóxica contra células tumorales. La activación de los macrófagos por el IFN- γ incrementa la síntesis del TNF- α y la acción sinérgica de ambas citocinas propicia el inicio de la respuesta inflamatoria crónica (Johansson, Hansson, Nandakumar, Bäcklund, & Holmdahl, 2001).

Se cree que este tipo de inflamación incontrolada (inflamación crónica) juega un papel importante en la patogénesis de diversas enfermedades como las cardiovasculares (Libby, Ridker, & Hansson, 2009), enfermedad inflamatoria del intestino (Okamoto & Watanabe, 2016), cáncer (Crusz & Balkwill, 2015), diabetes (Pickup, 2004), asma (Kurakula, et al., 2015) y la enfermedad de Alzheimer (Ghosh, Banerjees, & Sill, 2015).

2.1.2 Células implicadas en el proceso inflamatorio

Existen diversos tipos de células implicadas en la inflamación, tales como: los mastocitos y las células endoteliales, los neutrófilos, monocitos, macrófagos y linfocitos. Estas células producen una gran cantidad de moléculas activas que de manera directa e indirecta son mediadores del proceso inflamatorio (Gómez Estrada, González Ruiz, & Domingo Medina, 2011).

Los mediadores bioquímicos del proceso inflamatorio son la histamina, citocinas, prostaglandinas, proteínas y péptidos, especies reactivas de oxígeno y lípidos; así como, el óxido nítrico (NO) y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Ríos, 1994; Yu, et al., 2010).

2.1.3 Mediadores inflamatorios

Los mediadores de la inflamación son sustancias que inician y regulan las reacciones inflamatorias. Los más importantes de la inflamación son las aminas vasoactivas, productos lipídicos (prostaglandinas y leucotrienos), citocinas (incluidas las quimiocinas) y productos de la activación del complemento.

2.1.3.1 Metabolitos del ácido araquidónico

Los mediadores lipídicos, prostaglandinas y leucotrienos, producidos a partir fosfolípidos de membrana estimulan las reacciones vasculares y celulares en la inflamación aguda. Diversos estímulos o la acción de otros mediadores liberan ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana mediante la acción de fosfolipasas. Los mediadores derivados del ácido araquidónico (Fig. 1), también llamados eicosanoides, se unen a receptores acoplados a proteínas G en numerosos tipos de células para regular gran parte del proceso inflamatorio. Son sintetizados por dos tipos principales de enzimas: las ciclooxigenasas (generando prostaglandinas) y las lipooxigenasas (produciendo leucotrienos y lipoxinas) (Richard & Aaron, 2004).

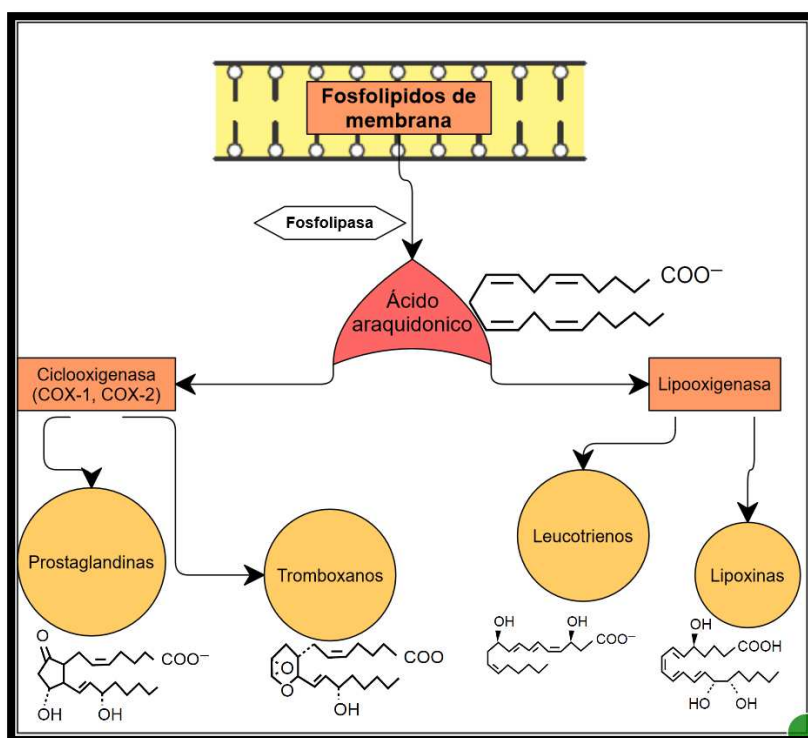


Fig. 1 Síntesis de los metabolitos del ácido araquidónico

2.1.3.1.1 Prostaglandinas

Estas son producidas por los mastocitos, macrófagos y células endoteliales participando en reacciones vasculares y sistémicas de la inflamación, las cuales son reguladoras del crecimiento de la célula y se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción de diferentes enzimas como las ciclooxigenasas (COXs) (Nelson, 1974).

La vía por la cual el ácido araquidónico se metaboliza a eicosanoides depende del tejido, del estímulo y de la presencia de inductores o inhibidores endógenos y farmacológicos (Smith, Garavito, & De Witt, 1996).

Las hormonas autacoides y otras sustancias intensifican la biosíntesis de los eicosanoides al interactuar con los receptores en la membrana plasmática, los cuales se acoplan con las proteínas reguladoras de unión, como la proteína G. El resultado es la activación de fosfolipasas, incrementando las concentraciones del

ion calcio (Ca^{2+}) intracelular y finalmente con la activación de factores de transcripción, enzimas, canales iónicos, entre otras acciones. Se piensa que estímulos físicos hacen también que penetre Ca^{2+} a la célula activando a la fosfolipasa A2 (PLA2), la cual hidroliza el enlace éster de fosfolípidos de membrana con la liberación de ácido araquidónico, el cual es metabolizado rápidamente por acción de las COXs, o algunas lipooxigenasas (LOXs) o citocromo P450 (CYP 450) hasta obtener productos oxigenados, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos (Smith, Garavito, & De Witt, 1996).

Existen tres isoformas de la enzima ciclooxygenasa: COX-1, COX-2 y COX-3. La enzima COX-1 se expresa de manera constitutiva en casi todas las células. La enzima COX-2 no se encuentra normalmente en altas concentraciones, pero pueden ser inducida por estímulos proinflamatorios, algunos factores séricos, citocinas y factores de crecimiento y se considera que es principalmente responsable de la síntesis de los mediadores prostanoideos del dolor, la inflamación y la fiebre, efecto que es inhibido por la administración de glucocorticoides como la dexametasona (García & Gómez-Reina, 2000).

Por otro lado, la enzima COX-3, una isoforma de la COX-1, al parecer juega un papel en el proceso antiinflamatorio y su inhibición explicaría el alivio del dolor y la reducción de la fiebre producida por los AINEs. Las COXs poseen dos actividades diferentes: una de sintasa de endoperóxido que oxigena y produce una estructura en anillo en el ácido graso precursor para formar endoperóxido cíclico de PGG1, y una actividad de peroxidasa que transforma la PGG1 en PGH1 (Gómez Estrada, González Ruiz, & Domingo Medina, 2011).

2.1.3.1.2 Leucotrienos

Son producidos por los leucocitos y mastocitos, por acción de la lipooxigenasa, y se ven implicados en las reacciones del músculo vascular y liso y en el reclutamiento de leucocitos. Existen tres tipos diferentes de lipooxigenasa, siendo la 5-lipooxigenasa la predominante en los neutrófilos. Esta enzima convierte el ácido araquidónico en ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico, quimiotáctica para los neutrófilos

y precursores de leucotrienos (Brogliato, et al., 2014; Serhan, Hamberg, & Samuelsson, 1984). Los leucotrienos, producen vasoconstricción intensa, broncoespasmos y aumento de la permeabilidad de las vénulas (Guimares, et al., 2018; Brain & Williams, 1990).

2.1.3.2 Citocinas

Son proteínas producidas por numerosos tipos de células (sobre todo, linfocitos, macrófagos y células dendríticas). Estas moléculas representan un grupo multifuncional de sustancias mensajeras que transportan información de una célula a otra, responsable de la inducción de varias enzimas, como por ejemplo el óxido nítrico sintetasa (ONS) y la COX-2 (Gómez Estrada, González Ruiz, & Domingo Medina, 2011).

Las citocinas pueden ser clasificadas como pro o anti-inflamatorias dependiendo de la vía en la que participen en la inflamación; por ejemplo, en el grupo de las citocinas pro-inflamatorias tenemos la interleucina 1 (IL1), el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), las IL6 e IL8, moléculas involucradas en la iniciación y amplificación de los procesos inflamatorios, en la sepsis, el shock séptico, inducción de fiebre, movilización y activación de leucocitos polimorfonucleares, inducción de las enzimas COXs y lipooxigenasa, incremento en la expresión de moléculas de adhesión celular, activación de linfocitos B y T, células asesinas naturales, y estimulación en la producción de otras citocinas (Zhang & An, 2007; Oliveira, Sakata, Issy, Gerola, & Salomao, 2011).

En el grupo de las citocinas antiinflamatorias tenemos la IL10, el factor transformador de crecimiento (TGF) y el activador natural del receptor de la interleucina 1 (IRA), los cuales modulan negativamente los eventos inflamatorios (Grisham, Jourdain, & Wink, 1999; Szekanecz, Vegvari, Szabo, & Koch, 2006).

Las citocinas son producidas tanto por células fijas como por células del sistema circulatorio (mastocitos, macrófagos y neutrófilos). Una citocina a su vez induce su propia producción y la de otras citocinas, a través de la activación de algunos factores de transcripción nuclear (Zhang & An, 2007).

2.1.3.3 Aminas vasoactivas

La principal amina vasoactiva es la histamina, esta es almacenada como molécula preformada en las células y se encuentra entre los primeros mediadores liberados en la inflamación. La histamina se encuentra en los mastocitos y estos a su vez están presentes en el tejido conjuntivo adyacente a los vasos. La histamina se almacena en gránulos de los mastocitos y es liberada por desgranulación de estos en respuesta a diferentes estímulos causando dilatación de las arterias y el incremento de la permeabilidad vascular; sin embargo, esta produce constricción de las arterias de mayor calibre (Gómez Estrada, González Ruiz, & Domingo Medina, 2011).

2.1.3.4 Óxido Nítrico (ON)

El ON regula numerosos procesos fisiológicos, incluyendo la neurotransmisión, la contractilidad del músculo liso, la reactividad plaquetaria y la actividad citotóxica de las células inmunes. Por otro lado, se ha encontrado elevados niveles de ON en patologías como artritis reumatoide, inflamación crónica intestinal, shock séptico, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, isquemia cerebral e infarto del miocardio (Grisham, Jourdain, & Wink, 1999).

El ON, es un gas soluble producido a partir de la arginina por acción del óxido nítrico sintetasa (ONS). Existen tres tipos distintos de ONS: la endotelial (eONS), la neuronal (nONS) y la inducible (iONS).

La isoforma iONS cataliza la producción de ON, que puede ser tóxico en ciertas circunstancias o para ciertos grupos celulares. El ON puede funcionar como una molécula proinflamatoria, mediante la activación de las enzimas COX y con ello aumentar la producción de las prostaglandinas (Gilmore, 2006).

En su conjunto, las células implicadas en el proceso inflamatorio, así como las moléculas liberadas por estas regulan la respuesta inflamatoria teniendo como características cuatro manifestaciones clínicas principales: calor, rubor, tumor y dolor (Vega, 2008).

2.2 Dolor

En 1979, la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) presentó la definición de dolor más utilizada. La IASP definió el dolor como una "experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial, y descrito en términos de dicho daño". Esta definición enfatiza que el dolor es una sensación compleja que incluye múltiples dimensiones (IASP, 1979).

El dolor al igual que la inflamación, forma parte de los sistemas que tiene el organismo para mantener la homeostasis, pues en circunstancias fisiológicas tiene una función protectora, así como de defensa o alarma para proteger al organismo y aumentar la supervivencia del individuo (Bataille & Chausset, 1997). Sin embargo, existen patologías en que el dolor se convierte en el centro de la enfermedad (Ortega, Roca, & Micó, 2002)

El dolor es una sensación compleja, pues la percepción de la sensación dolorosa se ve influenciada no solo por algún estímulo, sino también por componente cognitivos y emocionales que están (o no) asociados al estímulo, por lo que es necesario diferenciar los procesos que están involucrados en la detección de un estímulo nocivo y la percepción de la sensación dolorosa.

2.2.1 Proceso de nocicepción

Al empezar a hablar de nocicepción puede resultar confusa la diferencia entre la nocicepción y el dolor, mientras que el dolor, de acuerdo con la IASP resalta que no solo es el proceso de percepción de un estímulo si no que abarca también dimensiones como el factor social, psicológico y emocional entre otros. Por otro lado, desde el punto de vista neurofisiológico, la percepción de un estímulo nocivo esta mediada por un sistema sensorial especializado denominado sistema nociceptivo en donde se precisa de la participación del sistema nervioso central (SNC) y del sistema nervioso periférico (SNP) (Basbaum, Bautista, Scherrer, & Julius, 2009)

Cuando un estímulo nocivo sobrepasa el umbral de activación se activan los nociceptores (fibras nerviosas periféricas), desencadenando una serie de reacciones en ambos sistemas que permite la percepción de este, con la finalidad de disminuir la causa y limitar las consecuencias.

La nocicepción se caracteriza por cuatro procesos; transducción, transmisión, modulación y percepción (Zegarra, 2007) (Fig. 2).

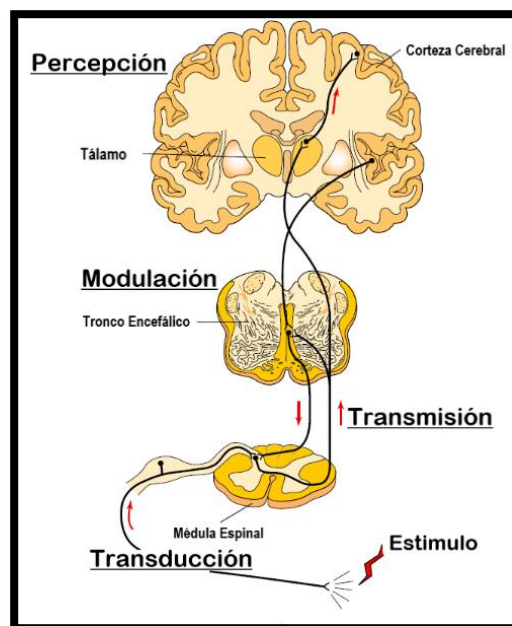


Fig. 2 Procesos nociceptivos

El primer paso en el procesamiento de la sensación dolorosa es una conversión de un estímulo nocivo en un potencial de acción en las terminales periféricas de las fibras sensoriales (transducción). Si el estímulo es lo suficientemente intenso se produce un impulso nervioso el cual es propagado desde la periferia (transmisión) hacia el sistema nervioso central (SNC) (Romera, Perena, & Rodrigo, 2000). Dichos mensajes son transportados por los nociceptores o fibras aferentes primarias las cuales se dividen con base en su estructura y velocidad de conducción del estímulo (Besson & Chaouch, 1987):

- Fibras tipo A (α y β) las cuales son fibras mielinizadas de 1-5 μm responden a estímulos mecánicos de alta intensidad por lo que son llamados mecanorreceptores de umbral alto.
- Fibras tipo C, son no mielinizadas (amielínicas) de diámetro de 0.3-1.5 μm transmiten estímulos nociceptivos térmicos, mecánicos y químicos.

Los mensajes transportados por los nociceptores son recibidos en el asta dorsal de la médula espinal en donde las neuronas nociceptivas son activadas por diversos neurotransmisores. Posteriormente la modulación se lleva a cabo en el SNC en donde ocurren cambios como respuesta al estímulo nocivo, dichos cambios están presentes en la médula espinal, así como en el tronco encefálico. Finalmente, la percepción representa la integración de la información de la periferia, así como de diversos factores tales como: cognitivos y emocionales para la generación de la sensación dolorosa (Zegarra, 2007).

2.2.2 Clasificación del dolor

El dolor para su estudio ha sido clasificado de acuerdo con su temporalidad (agudo y crónico), así como a su intensidad (leve, moderado o grave). Sin embargo, la clasificación de Woolf (2010) es la más ampliamente utilizada, la cual menciona que el dolor puede ser clasificado de acuerdo con los mecanismos que lo generen, describiendo así tres tipos de dolor: nociceptivo, inflamatorio y patológico (Woolf, 2010).

2.2.2.1 Dolor nociceptivo

Este dolor se produce por la activación de los nociceptores ante estímulos térmicos, químicos o físicos, pues representa un sistema de alerta que detecta y minimiza el contacto con el estímulo nocivo. Este dolor refleja la percepción de los estímulos nocivos. La información del estímulo intenso se transmite desde la periferia hasta el tálamo y la corteza cerebral donde la sensación dolorosa es percibida, dando como resultado una acción inmediata por parte del organismo a fin de disminuir el daño o que se genere un daño tisular (Fig. 3). El dolor nociceptivo, es, por lo tanto, una sensación fisiológica vital (Basbaum, Bautista, Scherrer, & Julius, 2009).

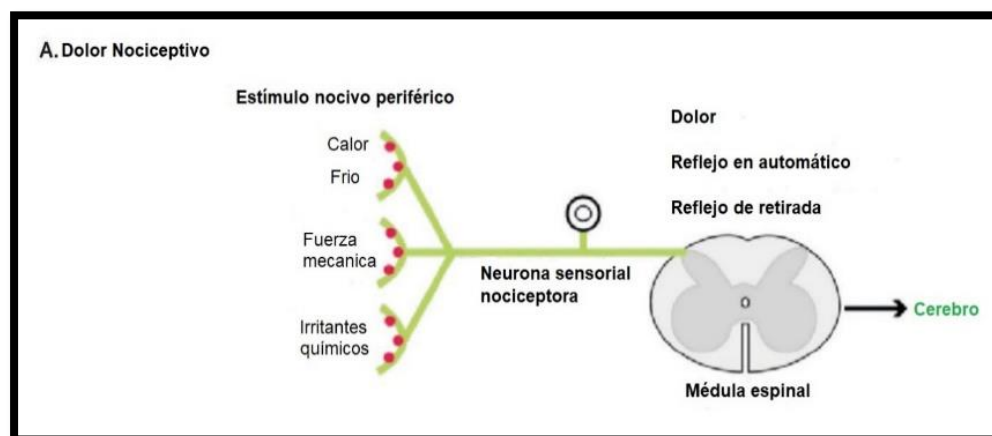


Fig. 3 Dolor nociceptivo: representa la sensación asociada con la detección de un estímulo nocivo o daño tisular y suele ser de protección. (Woolf et al., 2004)

El dolor nociceptivo representa la sensación asociada con la detección de posibles estímulos nocivos perjudiciales para el tejido, así como una función protectora ya que exige atención y acciones inmediatas. Si se produce daño en el tejido a pesar del sistema de defensa nociceptivo (traumatismo, cirugía o enfermedades inflamatorias) el organismo cambia la protección contra los estímulos nocivos para promover la curación del tejido dañado (Woolf & Scholz, 2002).

2.2.2.2 Dolor inflamatorio

Si se presenta daño tisular por un estímulo nocivo se activa el sistema inmunológico, dando como resultado el reclutamiento de las células del sistema inmunológico y liberación de los mediadores inflamatorios, tales como: los metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y lipoxinas), histamina, citocinas y radicales libres entre otros. Algunos de los mediadores inflamatorios tienen la capacidad de activar a los nociceptores generando potenciales de acción (Fig. 4), provocando un aumento en la sensibilidad en la parte afectada y como resultado se evita el contacto o movimiento de la parte afectada hasta que se lleve a cabo la reparación del daño. Una vez finalizado el proceso inflamatorio el dolor desaparece (Woolf , 2004; Woolf , 2010).

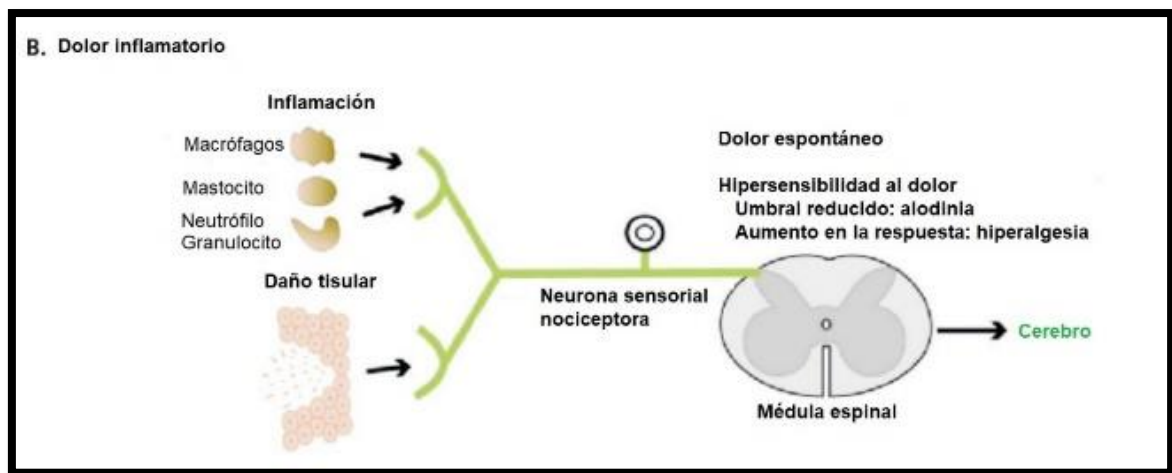


Fig. 4 Dolor inflamatorio: dolor asociado a un daño tisular con la infiltración de células del sistema inmune, puede promover la reparación del daño mediante la hipersensibilidad hasta que la reparación ocurra (Woolf et al., 2004).

El dolor inflamatorio se asocia con daño tisular y la infiltración de células inmunitarias y puede promover la reparación causando hipersensibilidad al dolor hasta que se produce la cicatrización, este dolor no es protector, sino mal adaptante.

2.2.2.3 Dolor patológico

Cuando se ve afectado el funcionamiento normal del SNC, da como resultado el dolor patológico (Fig. 5). El que a su vez se puede dividir en dos: primero el dolor neuropático es aquel causado por consecuencia directa de una lesión que afecta al sistema somatosensorial y el segundo, el dolor disfuncional, que se caracteriza por la ausencia del estímulo nocivo, sin embargo, se puede percibir la señal dolorosa. El dolor patológico es un estado de enfermedad causado por daño al sistema nervioso o por su función anormal (Jensen, 2011)

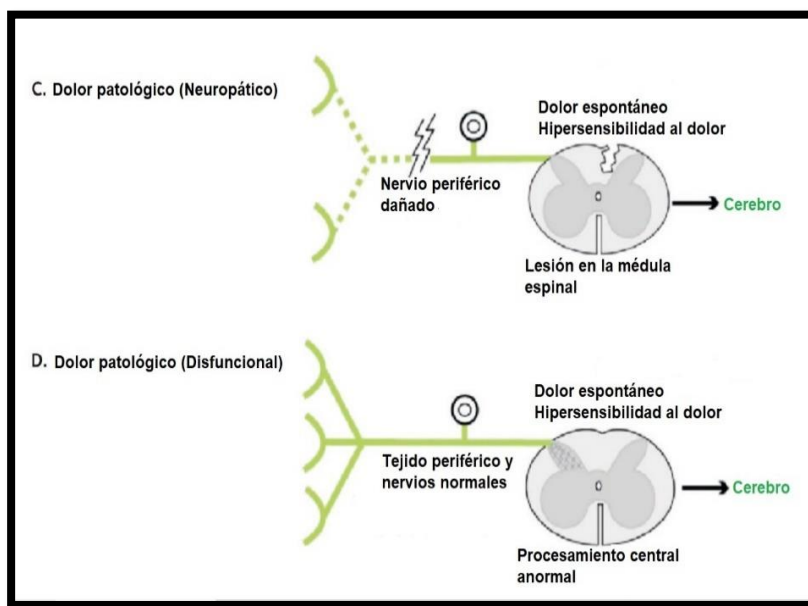


Fig. 5 Dolor patológico: estado causado por el daño al sistema nervioso (neuropático) o por una función anormal del mismo (disfuncional) ((Woolf et al., 2004).

2.2.3 Sensibilización periférica

Este proceso resulta de una lesión o inicio de la inflamación. Estos procesos dan como resultado cambios en las terminales periféricas de los nociceptores, llevando a una acumulación de las sustancias liberadas por las células (mastocitos, macrófagos, neutrófilos, entre otros) en la periferia, sustancias tales como: metabolitos del ácido araquidónico (prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas y tromboxanos), neurotransmisores (sustancia p), citocinas entre otras. Ante este aumento de mediadores del proceso inflamatorio, los nociceptores de la periferia expresan una mayor cantidad de receptores capaces de reconocer y responder a cada una de las sustancias liberadas (Fig. 6) (Costigan & Woolf, 2000; Dray, 1995; Woolf & Costigan, 1999).

Los receptores activados inician una cascada de señalizaciones, las cuales generan una modulación de las moléculas efectoras, así como cambios en la transcripción de genes. Por mencionar una de estas cascadas de señalización tenemos, la fosforilación del canal de sodio TTXr por la proteincinasa A (PKA) y la proteincinasa C (PKC) que aumenta la entrada de sodio en la terminal nerviosa, de modo que un estímulo despolarizante produce una mayor excitación, lo que reduce el umbral de activación de las terminales (Costigan & Woolf, 2000; Cesare & McNaughton, 1997). Las manifestaciones de la sensibilización periférica son una reducción en el umbral de activación, así como un aumento en la capacidad de respuesta.

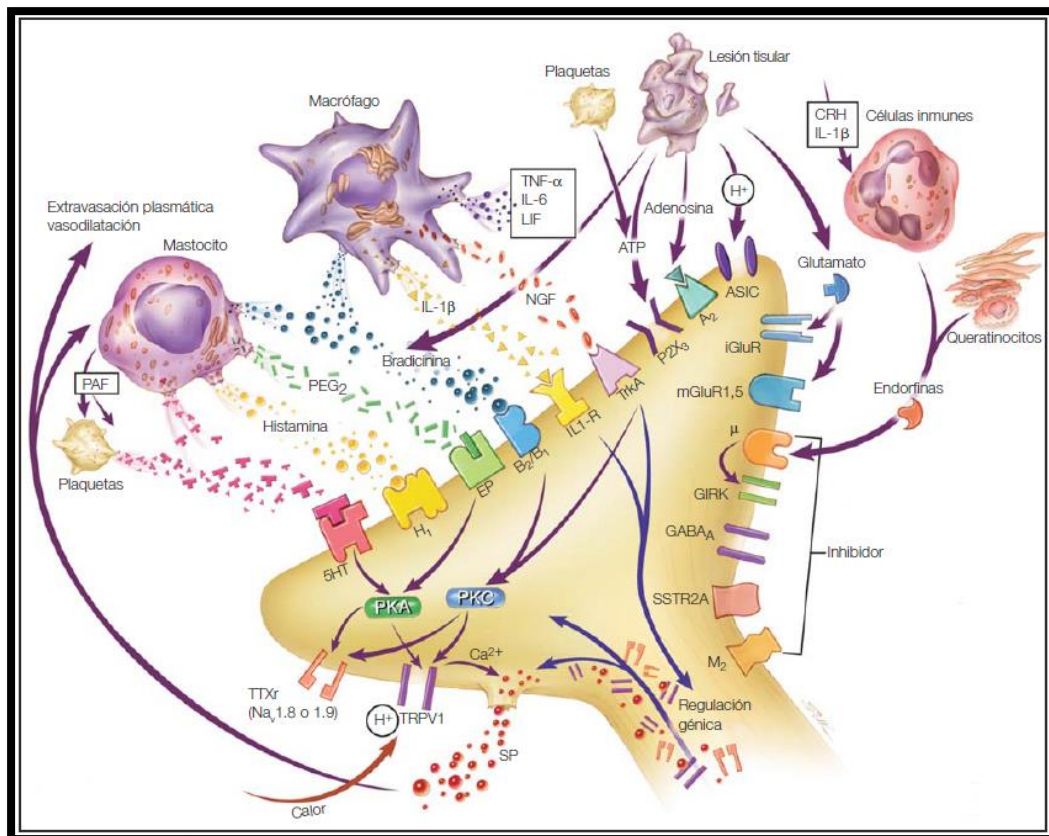


Fig. 6 Mediadores en la sensibilización periférica. Tras una lesión tisular comienza el reclutamiento de células del sistema inmune liberando sus metabolitos para dar inicio al proceso inflamatorio, estos metabolitos pueden actuar directa o indirectamente en la alteración de la sensibilidad de las terminaciones nerviosas periféricas. ASIC, canal iónico sensibilizado por ácido; CRH, hormona liberadora de corticotropina; GIRK, canal rectificador de potasio asociado internamente a proteína G; iGluR, receptor ionotrópico del glutamato; IL-1 β , interleucina-1 β ; IL-6, interleucina-6; mGluR, receptor metabotrópico del glutamato; NGF, factor de crecimiento nervioso; PAF, factor activador de las plaquetas; PGE2, prostaglandina E2; PKA, proteína cinasa A; PKC, proteína cinasa C; SSTR2A, receptor 2^a de la somatostatina; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; TrkA, receptor de la tirosina cinasa A; TTXr, canal del sodio resistente a la tetrodotoxina; μ , receptor opiode mu; M2, receptor muscarínico; 5HT, serotonina; LIF, factor inhibidor de la leucemia. (Diseño gráfico de Ian Suk, Johns Hopkins University, adaptado de Woolf & Costigan 1999.) (Imagen tomada de "Tratado del Dolor", 5^a edición)

2.2.4 Sensibilización central

Una terminal periférica puede sensibilizarse después de una lesión o inicio del proceso inflamatorio, este fenómeno no solo ocurre en la periferia, pues como se ha mencionado, en la percepción del dolor, está involucrado el SNC y SNP, por lo que las neuronas a nivel central (médula espinal) también pueden sensibilizarse.

La sensibilización central (Fig. 7) se refiere al proceso mediante el cual hay un incremento en el procesamiento de los mensajes nociceptivos, lo cual facilita la transferencia de información a la médula espinal (Woolf C., 2011).

La entrada de información de la periferia a nivel central da como resultado el inicio de una cascada de señalizaciones en el asta dorsal de la médula espinal, que se activan mediante la liberación de los transmisores en las terminales centrales de los nociceptores, por lo que hay un aumento en la transmisión de la señal dolorosa. Entre los transmisores de estas señales está el glutamato, el cual se une a varios tipos de receptores, como los NMDA y AMPA. Este se une preferentemente a los NMDA el cual está bloqueado (en condiciones normales) por el ion magnesio (Mg^{2+}) (Costigan & Woolf, 2000; Thompson, King, & Woolf, 1990).

Un aumento en la liberación de glutamato produce la eliminación del bloqueo del ion magnesio, por lo que aumenta el tiempo durante el cual el receptor está abierto, dando como resultado un incremento en el flujo de Ca^{2+} intracelular; al incrementar las concentraciones de Ca^{2+} intracelular se promueve la activación de múltiples receptores, así como de diversas enzimas (ONS, COX, lipoxigenasa) y cinasas (PKA y PKC). Las protein cinasas fosforilan a los receptores de membrana y canales iónicos haciendo más excitable a la neurona (Costigan & Woolf, 2000; Woolf C. , 1983). La sensibilización central se manifiesta a través de hiperalgesia (sensación de dolor desproporcionado ante estímulos nocivos) y alodinia (sensación de dolor ante estímulos inocuos) (Woolf C., 2011)

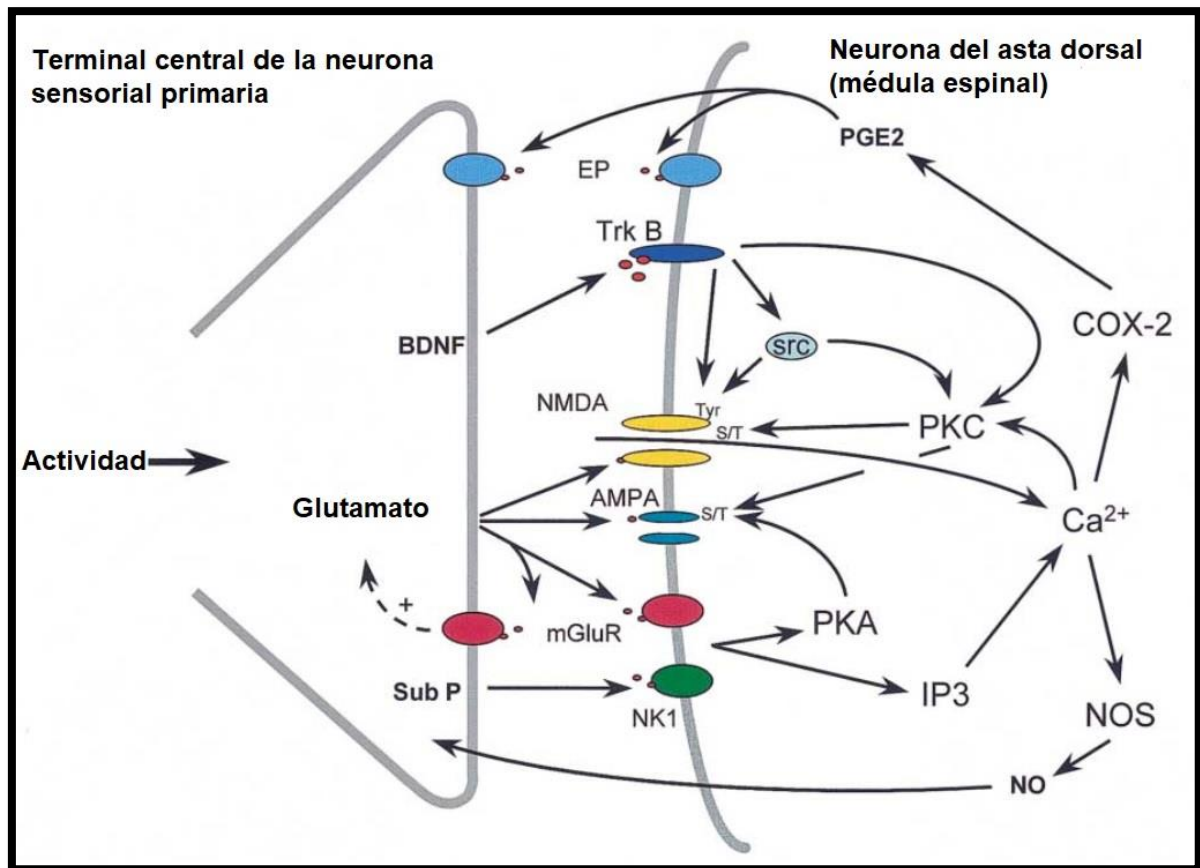


Fig. 7 Sensibilización central. La actividad sostenida en la neurona presináptica da como resultado la liberación de transmisores, que actúan sobre los receptores metabotrópicos y de tirosina quinasa en la neurona del asta dorsal para iniciar múltiples fases de transducción de señales. Estas cascadas convergen en los receptores postsinápticos NMDA y AMPA, alterando sus propiedades por fosforilación, iniciando así la sensibilización central. Las neuronas del asta dorsal postsinápticas pueden modular su propia actividad, así como la de la neurona presináptica mediante la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) y óxido nítrico (NO), respectivamente. (Woolf et al., 2000).

2.3 Terapia farmacológica

Debido a que las moléculas responsables implicadas en el proceso inflamatorio y doloroso son generalmente las mismas, los fármacos utilizados como antiinflamatorios poseen también actividad analgésica.

Los esteroideos (o glucocorticoides) son los más potentes antiinflamatorios que actúan sobre la inflamación por diversos mecanismos; por ejemplo, reducen el número y la activación de eosinófilos, desencadenando la apoptosis de estos y disminuyendo algunos de sus factores quimiotácticos que incluyen las interleucinas 3 y 5, el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), eotaxina y la citocina RANTES (citoquina expresada y secretada en células T normales), entre otras. El principal mecanismo de acción de este grupo de fármacos es la inhibición de la fosfolipasa (Fig. 8), enzima encargada de catalizar la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana dando como resultado ácido araquidónico el cual es el precursor de eicosanoides (metabolitos del ácido araquidónico), los cuales son mediadores en las señales de transducción en la inflamación (Rhen & Cidlowski, 2005).

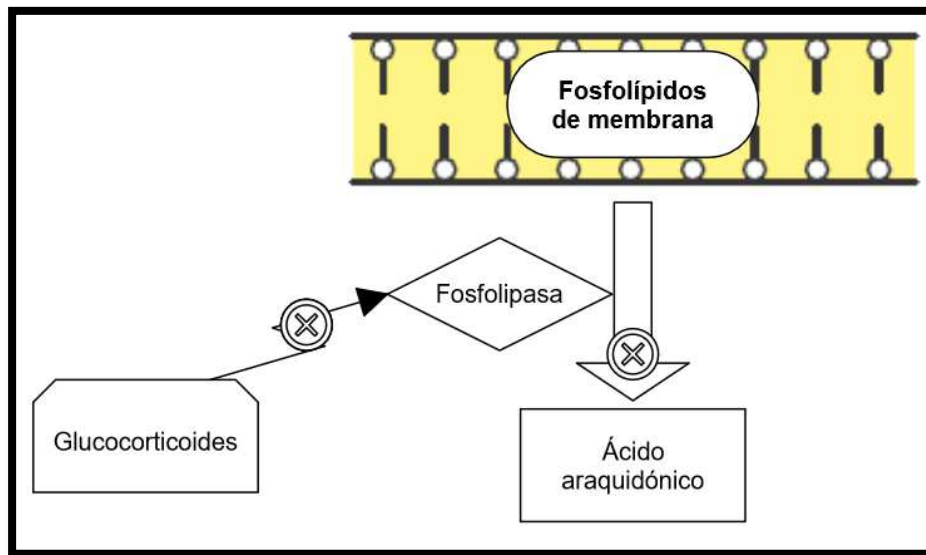


Fig. 8 Representación esquemática de la acción de los glucocorticoides

En este grupo de fármacos (Fig. 9) se encuentran la dexametasona, prednisona, prednisolona, metilprednisolona, cortisona, hidrocortisona, mometasona, entre otros.

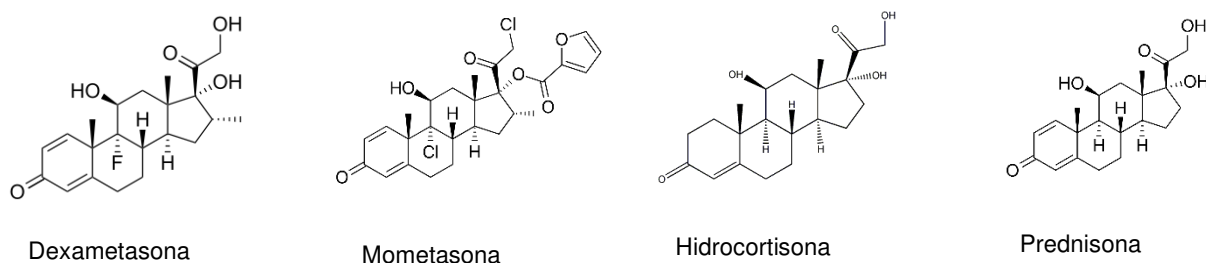


Fig. 9 Estructura química de fármacos antiinflamatorios esteroideos (glucocorticoides)

Los antiinflamatorios esteroideos producen los siguientes efectos adversos: estreñimiento, sedación, depresión respiratoria, alucinaciones, inducen disminución de la competencia inmunológica, supresión inespecífica de la respuesta inflamatoria, incrementan la producción de ácido clorhídrico y pepsina, reducen la barrera protectora de moco en el estómago, la absorción de Ca^{2+} y la consolidación de las fracturas, retrasan el crecimiento en niños y crean tolerancia y dependencia. (Bourke & Moynagh, 1999; Rhen & Cidlowski, 2005).

Los AINE son un grupo de agentes de estructura química diferente (Fig. 10). Son sustancias capaces de suprimir los signos y síntomas de la inflamación, algunos también ejercen acciones antipiréticas y analgésicas, pero son sus propiedades antiinflamatorias las que los hacen útiles en el tratamiento de trastornos en los cuales el dolor está relacionado con el proceso inflamatorio. Tienen como efecto primario inhibir la síntesis de prostaglandinas las cuales son mediadoras en el inicio de la respuesta inflamatoria, así como del dolor a través de la inhibición de la enzima COX (Fig. 11) (Batlouni, 2010).

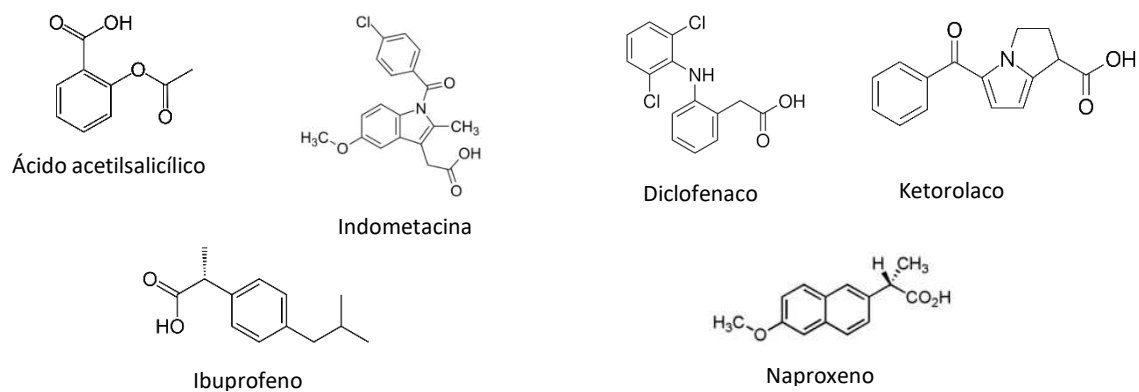


Fig. 10 Estructura química de algunos fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

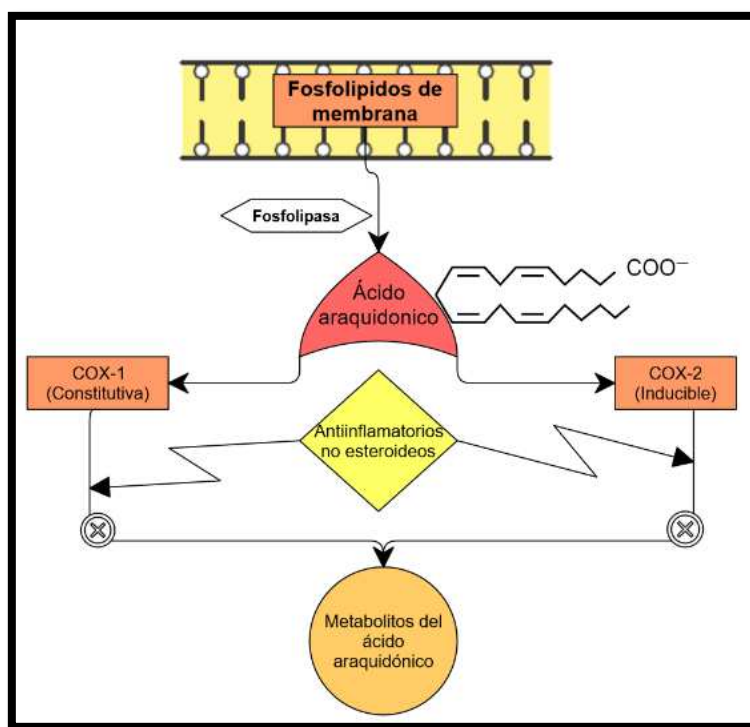


Fig. 11 Representación esquemática del mecanismo de acción de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE)

Los AINE se agrupan en varias clases químicas:

Salicilatos, pirazolonas y análogos, paraminofenol, derivados indolacéticos (indoles), derivados arilacéticos o fenilacéticos, fenamatos o arilantranílicos (fenamatos), derivados arilpropiónicos, oxicanes, derivados del ácido nicotínico, derivados de la naftilalcanonas derivados de ácidos heterocíclicos, derivados de la sulfonanilida, derivados de las benzoxazocinas, analgésicos opiáceos e inhibidores selectivos de COX-2 (Guzmán, Camaras, Espinel, & Ojeda Carpio, 2017).

Existen diversos efectos indeseables en la terapia con los AINE, tales como la toxicidad gastrointestinal y renal, estos efectos se deben en parte a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en el estómago o en la médula renal. La existencia de las dos isoenzimas de la COX en el organismo podría explicar los efectos antiinflamatorios a través de la inhibición de la COX-2 y los efectos indeseables (como los gastrointestinales y renales) por la inhibición de la COX-1 (Bremner & Heinrich, 2001; Renda, 2010).

2.4 Medicina tradicional

El empleo alternativo de plantas medicinales en la terapia antiinflamatoria y para el dolor permite, en muchos casos, reducir el proceso patológico y en otros resolverlo sin llegar a producir efectos indeseados. Entre las ventajas de la fitoterapia frente a la farmacoterapia existe la posibilidad de actuar a diferentes niveles en el proceso inflamatorio, ya que, si bien la eficacia farmacológica del principio activo de la planta suele ser netamente inferior a la del fármaco de síntesis, la variedad de principios activos presentes en la planta o extractos de esta permite una acción aditiva o potenciadora de los efectos farmacológicos (Ríos, 1994-1995). Desde hace poco más de 20 años ha renacido el interés por recurrir a la medicina tradicional. México cuenta con una gran diversidad vegetal, es el cuarto país del mundo con mayor número de diversidad vegetal, de la cual solo muy pocas especies cuentan con estudios formales que ratifiquen su actividad biológica. Por lo anterior, los estudios de productos naturales con potencial actividad antiinflamatoria y antinociceptiva deben estar dirigidos a la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos que representen una alternativa a la terapia antiinflamatoria y antinociceptiva habitual.

Los productos naturales son considerados recursos valiosos para el aislamiento y obtención de moléculas nuevas lo que potencialmente llevaría al descubrimiento de nuevos fármacos.

Ejemplo de moléculas obtenidas a partir de plantas se encuentran los triterpenos y diterpenos de *Salvia officinalis* (carnosol y ácido carnósico) a los cuales se les confiere actividad antiinflamatoria (Bauer et al, 2012), Kim, Li, Wu, Lee, & Ryu, (2013) reportan la actividad antiinflamatoria de diterpenos a partir de *Thuja orientalis* disminuyendo la producción de ON, prostaglandina E2, así como la disminución en la actividad transcripcional de NF- κ B.

2.4.1 Género *Centaurea*

Entre la diversidad vegetal se encuentra el género *Centaurea*, el cual ha sido utilizado en la medicina popular durante cientos de años como antidiarreico, antirreumático, antiinflamatorio, antipirético y antibacteriano (Barrero et al., 1997; Farrag, Abd El Aziz, & El-Domiaty, 1993; Kaij-a-Kamb, Amoros, & Girre, 1992; Orallo, Lamela, Camina, Uriatre, & Calleja, 1998; Armitage, 2001).

Las propiedades farmacológicas de las especies del género *Centaurea* se deben probablemente a la presencia de lactonas sesquiterpénicas, pues se ha reportado la existencia de estos metabolitos en numerosas especies del género (Öksüz & Ayyildiz, 1986; Kurian & Sankar, 2007).

2.4.1.1 *Centaurea americana* Nutt

Entre las diferentes especies se encuentra *Centaurea americana* (Fig. 12) una especie perteneciente a la familia Asteraceae, es nativa del norte de México, tiene los pétalos de color rosa con un centro de color crema. Las flores son de 10 cm de diámetro y se producen entre los meses de mayo-junio. La planta puede llegar a los 15 cm de altura, es utilizada por la población para diversos trastornos del hígado.



Fig. 12 *Centaurea americana*

De acuerdo con Domínguez, González, & Rojas, (1972), la caracterización fitoquímica de esta especie comprende cinaropicrina (lactona sesquiterpénica), lignanos y β -sitosterol (terpeno); Elsebai, Mocan, & Atanasov , (2016) reportaron diversas actividades biológicas de cinaropicrina, entre ellas: antiviral, antitumoral y antiinflamatoria.

Elsebai, Mocan, & Atanasov, (2016), demostraron la actividad antiviral *in vitro* de cinaropicrina contra el virus de la hepatitis tipo C, pues impidió la entrada del virus a células de hepatoma humano inhibiendo así la proliferación del virus.

La cinaropicrina obtenida a partir de *Saussurea salicifolia* presentó actividad antitumoral dosis-dependiente inhibiendo el crecimiento de células de adenocarcinoma gástrico con una IC_{50} = 30.22 μ g/mL (Kang et al., 2007).

Cho y colaboradores (1998) demostraron que la cinaropicrina aislada a partir de *Saussurea lappa* suprimió la liberación de TNF- α (una citocina proinflamatoria), así como la liberación de ON en macrófagos. Estos resultados sugieren que la cinaropicrina puede ser un agente útil para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias.

El β -sitosterol es un compuesto presente en numerosas plantas, al cual se le ha atribuido propiedades biológicas como inmunomoduladoras y antiinflamatorias (Awad & Fink, 2000). La capacidad antiinflamatoria del β -sitosterol ha sido evaluada por Paniagua-Pérez y colaboradores (2017) mediante el uso de reacciones agudas inflamatorias, inhibiendo el edema auricular inducido con TPA (13-acetato de 12-tetradecanoilforbol) en el ratón.

Los reportes anteriores mencionan la presencia y actividad farmacológica de la cinaropicrina (sesquiterpeno), lignanos y β -sitosterol (terpeno) en otras especies vegetales. Sin embargo, no hay evidencia de la actividad farmacológica de *C. americana*, por lo que resulta de interés el estudio de ésta como una fuente potencial de moléculas de interés farmacológico.

3. HIPÓTESIS

Centaurea americana contiene metabolitos biológicamente activos por lo que presentará actividad antiinflamatoria y antinociceptiva en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton y en la prueba de la formalina, respectivamente.

4. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva de los extractos clorofórmico y metanólico de *Centaurea americana*.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtener los extractos metanólico y clorofórmico de *C. americana*.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de los extractos metanólico y clorofórmico de *C. americana* en el ensayo del edema auricular inducido con aceite de croton.
- Evaluar la actividad antinociceptiva de los extractos de *C. americana* mediante la prueba de la formalina.
- Evaluar la actividad antioxidante de los extractos metanólico y clorofórmico de *C. americana* por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).
- Separar el extracto activo por cromatografía en columna abierta.
- Determinar las fracciones con actividad farmacológica

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Material vegetal

Centaurea americana se colectó en el Municipio de Guadalcázar, San Luis Potosí, México. La autenticación taxonómica fue realizada por José García-Pérez en el Herbario Isidro Palacios de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

6.2 Obtención de los extractos

Se colocaron 100 g de planta seca y previamente molida en matraces bola, se le adicionó el respectivo disolvente (metanol o cloroformo) y la mezcla se calentó a reflujo durante 4 horas. Posteriormente, los extractos obtenidos se dejaron enfriar y se filtraron. Los disolventes se eliminaron a presión reducida en un evaporador rotatorio.

6.3 Animales

Como reactivo biológico se utilizaron ratones macho CD-1 de 7-8 semanas de edad (20-30 g de peso corporal) y ratas Wistar hembra de 180-200 g de peso. Los animales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL-Bioterio) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (No. de protocolo aprobado por el CICUAL 140). Los animales se mantuvieron en periodos de luz-oscuridad de 12:12 y se les suministró alimento y agua “*ad libitum*”.

Todos los experimentos se llevaron a cabo siguiendo las recomendaciones del Comité de Investigación y Ética de la Asociación Internacional para el Estudio del Dolor, los Lineamientos y Estándares Éticos para la Investigación del Dolor Experimental en Animales (Zimmermann, 1983) y acordes a un protocolo experimental que cumple con los requisitos establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

6.4 Diseño experimental

6.4.1 Efecto antiinflamatorio

Para la evaluación de la actividad antiinflamatoria se siguió la metodología reportada por Young y De Young (1989); y Paya et al., (1994), para la cual se utilizó una solución de aceite de croton al 5% (v/v) en acetona y se aplicaron 10 µl de la solución tópicamente, tanto en la superficie externa como en la interna de la oreja derecha del animal.

Después de 30 min de la aplicación del aceite de croton, se administraron tópicamente los tratamientos (extracto MeOH, CHCl₃, indometacina y vehículo) en ambos lados de la oreja derecha.

Los animales se sacrificaron 6 horas después de la aplicación del aceite de croton, posteriormente se realizó una perforación con un sacabocados en ambas orejas del animal y se registró el peso del tejido auricular.

Para la evaluación de los extractos MeOH y CHCl₃, los animales se separaron en 5 grupos (n=6). Los extractos se administraron tópicamente a una concentración de 2 mg/oreja en 10 µL, al grupo control positivo se le administró indometacina (2 mg/oreja) y a otro grupo acetona como vehículo.

La actividad antiinflamatoria se determinó como porcentaje de inhibición con respecto al edema formado en los animales del grupo administrado únicamente con acetona por medio de la siguiente formula: $\% \text{ de inhibicion} = \frac{(w-w^0)-(w'-w^{0'})}{(w-w^0)} \times 100$

Donde:

W= peso de la oreja con aceite (control)

W⁰ = peso de la oreja con vehículo (control)

W' = peso de la oreja con aceite (tratada)

W^{0'} = peso de la oreja con vehículo (tratada)

6.4.2 Efecto antinociceptivo

Para la evaluación del efecto antinociceptivo se utilizó el modelo experimental de la prueba de la formalina al 1% reportado por Wheeler-aceto & Cowan, 1991.

Las ratas se colocaron en cilindros transparentes de acrílico para su observación por un periodo de 30 min con la finalidad de permitirles ambientarse al entorno. Después de este periodo, se administraron los tratamientos (extracto MeOH, CHCl₃, diclofenaco y vehículo) de manera local en un volumen de 50 µL en el dorso de la pata posterior derecha. Después de 10 min de la aplicación de los tratamientos se administraron 50 µL de una solución de formaldehído al 1% en el dorso de la pata posterior derecha. Los animales se colocaron nuevamente en el cilindro y se cuantificó la conducta dolorosa a intervalos de 1 min cada 5 min, durante 60 min; las respuestas típicas en la prueba incluyen levantamiento de pata, lamida, mordisqueos o sacudidas. Todos los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Para la evaluación de los tratamientos se utilizaron 6 grupos de 6 ratas cada uno; los extractos se administraron en dosis crecientes de 31.6, 100, 200, 300 y 400 µg/pata disueltos en solución salina y dimetil sulfoxido (DMSO) al 5%. Un grupo recibió diclofenaco (control positivo) a una concentración de 100 µg/pata y otro grupo recibió solución salina $\pm$ DMSO al 5% (vehículo) como tratamiento.

6.4.3 Actividad antioxidante

La evaluación del efecto antioxidante de los extractos crudos de *C. americana* se realizó por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH) mediante una solución 0.2 mM de reactivo (DPPH) en MeOH.

En una placa de ELISA de 96 pozos los extractos se evaluaron por triplicado a concentraciones de 6.25, 12.5, 25 y 50 µg/mL, se utilizó quercetina como referencia y MeOH como blanco. La mezcla de ensayo consistió en 100 µL de la solución de DPPH y 100 µL de la muestra a evaluar, se incubó la mezcla a temperatura ambiente y en la oscuridad por 30 min y posteriormente se leyó su absorbancia a 520 nm.

A partir de las absorbancias obtenidas se determinó el porcentaje de actividad antioxidante mediante la siguiente formula:

$$\% \text{ de actividad} = \left[\frac{(\text{Control A} - \text{Muestra A})}{\text{Control A}} \right] \times 100$$

Donde:

Control A: Absorbancia de DPPH y metanol

Muestra A: Absorbancia de las muestras

6.5 Fraccionamiento del extracto activo

La separación del extracto se realizó mediante cromatografía en columna abierta con silica gel como fase estacionaria; hexano se utilizó como fase móvil incrementando la polaridad gradualmente con acetato de etilo. Fracciones de 200 mL fueron recolectadas obteniendo 18 fracciones, a las cuales se les realizó cromatografía en capa fina y aquellas con patrones similares se juntaron.

6.6 Evaluación de las fracciones obtenidas

Las fracciones obtenidas se evaluaron mediante el edema auricular inducido con aceite de croton y el modelo de formalina al 1%. Las fracciones activas se compararon por cromatografía en capa fina, registrando los R_f (factores de retención), las fracciones con R_f semejantes se unieron para una posterior separación bajo las mismas condiciones.

6.7 Análisis Estadístico

Los resultados de la evaluación de la actividad antiinflamatoria, así como de la actividad antinociceptiva están expresados como la media aritmética de los valores $\pm$ el error estándar. Un análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para determinar diferencias significativas entre los grupos, así como la prueba complementaria de Tukey para comparaciones múltiples. Los resultados con una $p < 0.05$ se consideraron significativos.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Obtención de los extractos

De 100 g de planta seca y molida se obtuvieron 10.13 g de extracto MeOH y 0.76 g de extracto CHCl₃ con un rendimiento del 10.13% y 0.76%, respectivamente.

7.2 Efecto antiinflamatorio

En la Fig. 13 se muestran los datos obtenidos en la evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos MeOH y CHCl₃ de *C. americana* en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton. Las orejas de los animales que recibieron únicamente el aceite de croton (control) desarrollaron edema de 14.87 ± 1.63 mg 6 horas después de la aplicación del aceite. Los animales del grupo vehículo (acetona) desarrollaron un edema (13.08 ± 1.02 mg) similar al grupo control con un porcentaje de inhibición del $0.38 \pm 8.89\%$. Por otro lado, los animales que recibieron indometacina (2 mg/oreja) desarrollaron edema menor (1.05 ± 0.20 mg) en comparación con el grupo control mostrando inhibición del $92.94 \pm 1.56\%$.

El grupo tratado con el extracto CHCl₃ (2 mg/oreja) desarrolló edema de 9.55 ± 0.84 mg, mostrando un porcentaje de inhibición del $59.41 \pm 6.96\%$. El extracto MeOH presentó edema de 11.15 ± 1.37 mg, equivalente a una inhibición del $27.04 \pm 8.98\%$. El extracto MeOH no mostró actividad antiinflamatoria estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en comparación con el grupo que recibió vehículo.

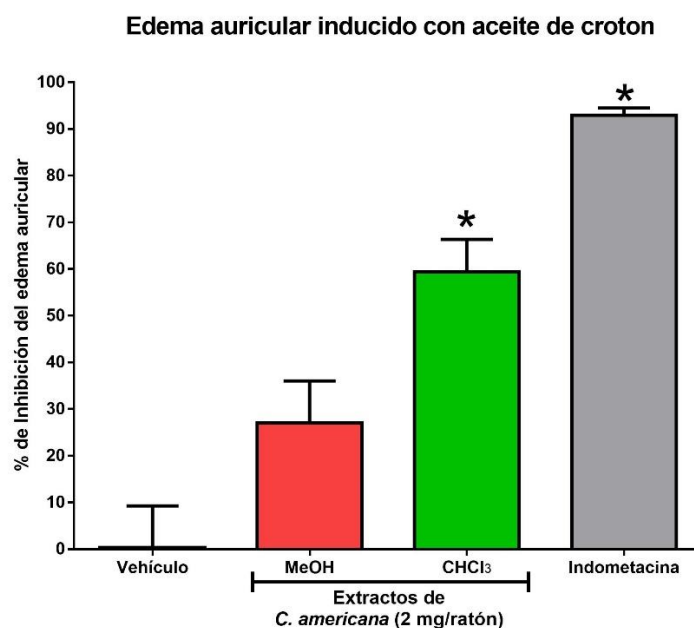


Fig. 13 Efecto antiinflamatorio de los extractos CHCl₃, MeOH e indometacina en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton en ratones. * $p < 0.05$ con respecto al grupo vehículo; $n=6$; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

Con base en los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos de *C. americana*, la aplicación tópica del extracto CHCl₃ a una concentración de 2 mg/oreja inhibió la formación del edema auricular inducido con aceite de croton. Si bien esta inhibición del edema es menor en comparación con la que se obtuvo de la indometacina, nuestros datos corroboran la actividad antiinflamatoria de la planta.

Consideramos, con base en lo anterior, que el extracto CHCl₃ representa una fuente para la obtención de posibles moléculas con actividad antiinflamatoria, ya que de acuerdo a lo reportado por Domínguez y col. en 1972, el extracto CHCl₃ de *C. americana* contiene sesquiterpenos como la cinaropicrina la cual se le atribuyen efectos: antiviral, antitumoral y antiinflamatorio (Elsebai, Mocan, & Atanasov, 2016), y terpenos como el β -sitosterol al que se le han reportado actividades inmunomoduladora y antiinflamatoria (Awad & Fink, 2000). Estos compuestos son de baja polaridad y por lo tanto son extraídos con disolventes poco polares, como es el caso del CHCl₃, lo que coincide con los resultados obtenidos. Por otro lado, es posible que existan otro tipo de compuestos de baja polaridad que contribuyan al

efecto antiinflamatorio, por lo que se decidió continuar con el fraccionamiento de este extracto a fin de tratar de aislar e identificar los metabolitos presentes en el mismo que posean el efecto farmacológico deseado.

La separación del extracto de CHCl_3 dio como resultado 18 fracciones, a las cuales se les realizó cromatografía en capa fina y aquellas con patrones similares se juntaron; se obtuvieron 9 fracciones, las cuales fueron evaluadas en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton. En la Fig. 14 se muestran los resultados de la evaluación.

El grupo que recibió únicamente aceite de croton desarrolló edema de 13 ± 1.09 mg (Fig. 14). Por otro lado, el grupo que recibió indometacina desarrolló un edema de 2.08 ± 0.44 mg con un porcentaje de inhibición del $83.97 \pm 3.95\%$; en las fracciones evaluadas, las tres primeras fracciones (F1, F2 y F3) no mostraron actividad antiinflamatoria estadísticamente significativa ($p > 0.05$) ($29.71 \pm 4.82\%$, $37.27 \pm 11\%$, $30.13 \pm 11.41\%$ de inhibición del edema, respectivamente). El resto de las fracciones evaluadas (F4-F9) tuvieron una actividad antiinflamatoria significativa en comparación con el grupo vehículo.

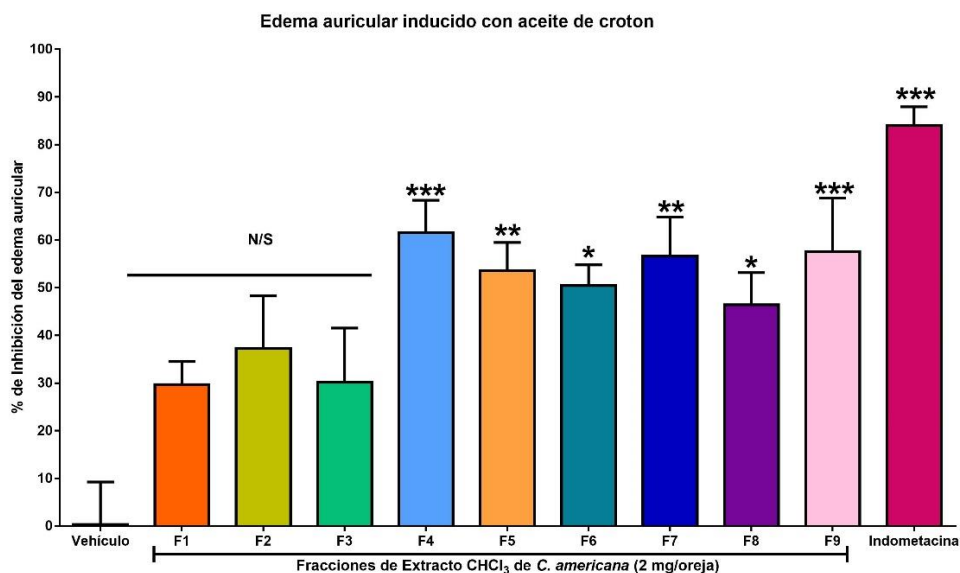


Fig. 14 Efecto antiinflamatorio de las fracciones del extracto clorofórmico de *C. americana* e indometacina en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton en ratones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo, $n=6$, N/S no significativo; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

Como se puede observar en la evaluación de las fracciones obtenidas, 6 fracciones (F4-F9) mostraron actividad antiinflamatoria estadísticamente significativa sin diferencia entre ellas, estos datos nos sugieren que los metabolitos presentes en las fracciones podrían ser los mismos. Por otro lado, no todas las fracciones se obtuvieron en la misma polaridad, pues la polaridad se incrementó gradualmente para la separación del extracto, por lo que podría tratarse de más de un metabolito o compuesto presente en cada una de las fracciones; como se describió anteriormente, se ha reportado la presencia de terpenos y sesquiterpenos en el extracto CHCl_3 de *C. americana*, estos compuestos, de acuerdo a su estructura química (Fig. 15), el β -sitosterol es menos polar en comparación con la cinaropicrina, por lo que el β -sitosterol podría estar presente en aquellas fracciones de menor polaridad (F1-F3). La cinaropicrina al ser de mayor polaridad estaría presente en aquellas fracciones más polares (F4-F9), por lo que el efecto antiinflamatorio de las fracciones podría deberse a la presencia de la cinaropicrina.

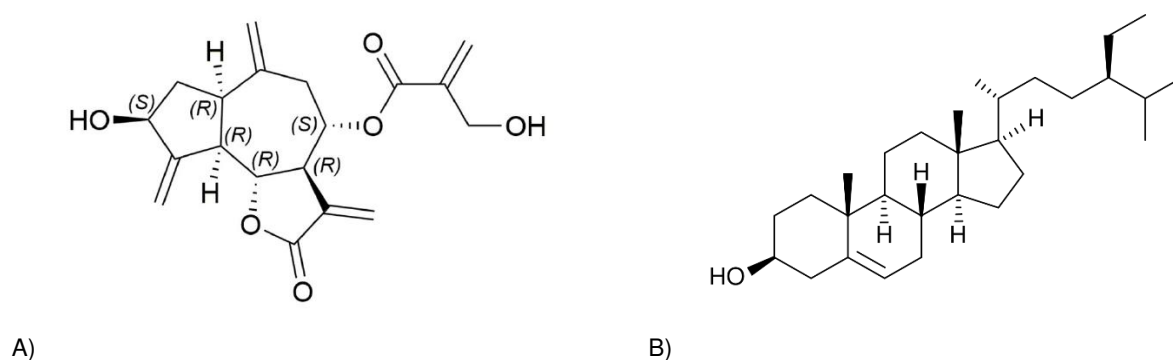


Fig. 15 A) Estructura química de la cinaropicrina; B) Estructura química del β -sitosterol.

Debido a que la actividad antiinflamatoria fue muy similar entre las fracciones F4-F9, se les realizó cromatografía en capa fina y se juntaron aquellas con patrones similares, para obtener una fracción enriquecida y separarla nuevamente.

A la fracción obtenida se le identificó como AB, y se realizó cromatografía en columna abierta siguiendo la metodología descrita en el fraccionamiento del extracto CHCl_3 crudo.

En el segundo fraccionamiento se obtuvieron 18 fracciones, las cuales fueron sometidas al mismo procedimiento de cromatografía en capa fina descrito anteriormente, se descartaron aquellas fracciones de las que se obtuvieron menos de 15 mg, evaluando solamente 5 fracciones (Fig. 16).

El grupo al cual se le administró la fracción AB-3 desarrolló edema de 9.98 ± 0.68 mg, correspondiendo a una inhibición del $8.40 \pm 7.26\%$, esta fracción no presentó actividad antiinflamatoria significativa en comparación con el grupo vehículo; por otro lado, la fracción AB-5 no presentó actividad farmacológica en este modelo ya que se observó un edema equivalente al desarrollado por el grupo que recibió únicamente aceite de croton.

Las fracciones AB-4, AB-6 y AB-7 desarrollaron edema de 5.48 ± 0.78 mg, 9.43 ± 1.45 mg y 10.71 ± 1.64 mg, respectivamente, resultados que corresponden a un porcentaje de inhibición del $49.69 \pm 8.33\%$, $48.36 \pm 9.22\%$ y $41.33 \pm 10.37\%$ correspondientemente.

En el segundo fraccionamiento se observó una separación en el efecto antiinflamatorio de las fracciones obtenidas, pues una fracción intermedia no mostró actividad en el modelo. Si bien la fracción AB-4, 6 y 7 presentaron actividad antiinflamatoria, la polaridad en la que fueron obtenidas no fue la misma, la fracción AB-4 fue obtenida a una menor polaridad en comparación con las fracciones AB-6 y 7. Con base en estos datos y en el análisis de TLC (cromatografía en capa fina) (Fig. 17) podemos decir que los metabolitos presentes en cada una de las fracciones son diferentes y que hay más de un metabolito responsable del efecto antiinflamatorio.

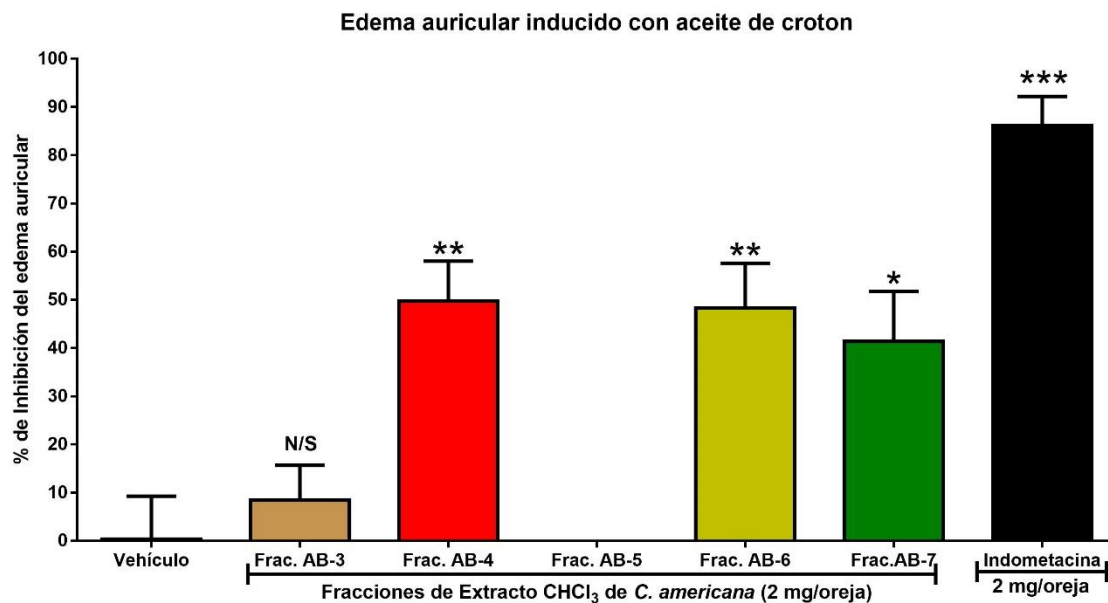


Fig. 16 Efecto antiinflamatorio de las fracciones del extracto clorofórmico de *C. americana* e indometacina en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton en ratones. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo, $n=6$, N/S no significativo; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

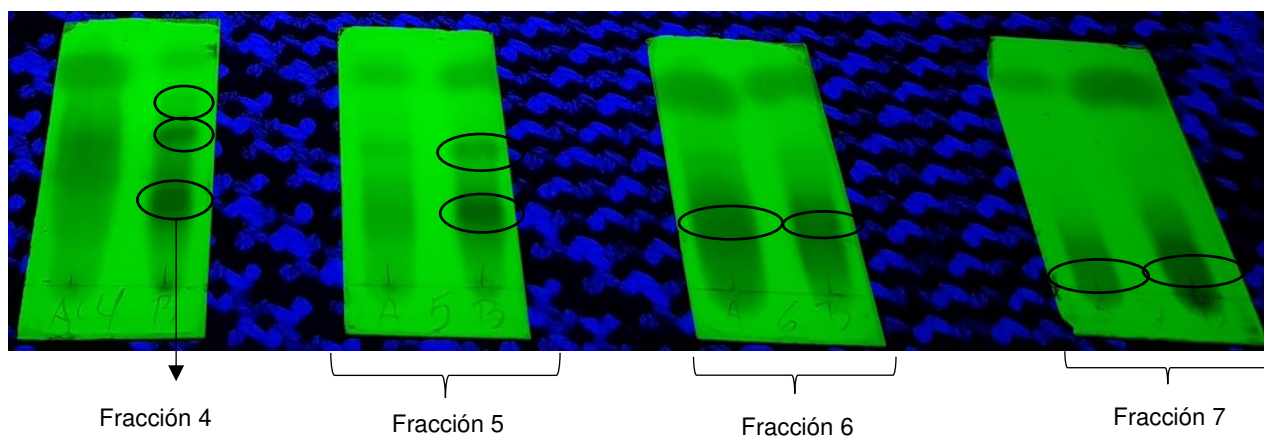


Fig. 17 Cromatografía en capa fina (TLC) de las fracciones AB-4, 5, 6 y 7.

El modelo del edema auricular inducido con aceite de croton es ampliamente empleado en la evaluación de nuevos fármacos, así como de extractos con posible actividad antiinflamatoria pues se sabe que la aplicación tópica del aceite desencadena como respuesta el inicio del proceso inflamatorio (Payá et al., 1993). Esta respuesta se lleva a cabo por la acción de los esteres de forbol presentes en el aceite de croton. Los esteres de forbol actúan como sustitutos del DGA (diacilglicerol) activando así la PKC y promoviendo la formación de los metabolitos del ácido araquidónico dando como resultado el inicio del proceso inflamatorio (De Young, Kheifets, Ballaron, & Young, 1989).

El fármaco utilizado como referencia en este trabajo (indometacina) mostró un efecto antiinflamatorio de alrededor del 80% en cada una de las evaluaciones llevadas a cabo. Este efecto antiinflamatorio obtenido concuerda con lo reportado en la literatura (Payá et al., 1993; De Young, Kheifets, Ballaron, & Young, 1989). Así mismo el vehículo (acetona) utilizado para disolver los extractos no produjo efecto antiinflamatorio por lo que podemos decir que éste se debe a los tratamientos (indometacina, extractos y fracciones) administrados.

El mecanismo de acción de la indometacina se debe a que es un inhibidor no selectivo reversible de la enzima ciclooxigenasa, enzima que como se describió anteriormente es la responsable de la síntesis de los metabolitos del ácido araquidónico, al inhibir dicha enzima se detiene el proceso de síntesis de prostaglandinas, metabolitos que entre sus efectos en la respuesta inflamatoria esta la regulación del tono vascular, así como el de agregación plaquetaria y desencadenamiento de la respuesta inflamatoria.

Con base en los resultados podemos suponer que el efecto farmacológico del extracto así como de las fracciones, podría ser en principio del tipo AINE, pues se sabe que al inhibir la síntesis de los metabolitos del ácido araquidónico, se atenúa la continuación de la respuesta inflamatoria, sin embargo, debido a la gran cantidad de moléculas involucradas en el proceso inflamatorio, así como de las moléculas presentes en el extracto y en las fracciones, una sola molécula no estaría involucrada en el efecto antiinflamatorio, por lo que se necesitan más estudios para

tratar de aislar el o los compuestos responsables de la actividad farmacológica y elucidar su estructura y su posible mecanismo de acción.

Considerando que los fármacos usados como antiinflamatorios presentan también actividad analgésica, se decidió evaluar la actividad antinociceptiva, del extracto, así como de las fracciones obtenidas, esta evaluación se llevó a cabo en el modelo de la formalina al 1% en rata con la finalidad de relacionar la actividad antiinflamatoria con la actividad analgésica y corroborar el uso tradicional de la planta como analgésico; los resultados se presentan a continuación.

77.3 Efecto antinociceptivo

En el modelo de formalina al 1% en rata, la inyección subcutánea de formalina produce una respuesta dolorosa caracterizada por la sacudida de la pata inyectada. En este modelo de dolor, la disminución en el número de sacudidas se interpreta como efecto analgésico o antinociceptivo, al graficar el número de sacudidas en función del tiempo se obtiene la Fig.18. En ésta se puede observar la respuesta bifásica característica de la prueba (la primera fase de 0-10 min y la segunda fase de 11-60 min después de la inyección del irritante). En la Fig. 18 se muestran los resultados obtenidos del grupo vehículo (Sol. salina + DMSO 5%), diclofenaco (100 µg/pata) así como del extracto CHCl₃ (31.6, 100, 200, 300 y 400 µg/pata) y MeOH (200 µg/pata) de *C. americana*. La administración local de diclofenaco disminuyó el número de sacudías en ambas fases de la prueba en comparación con el grupo vehículo. El extracto CHCl₃ mostró una disminución del número de sacudidas similar a las observadas en el grupo diclofenaco en cada una de las concentraciones evaluadas. Por otro lado, la administración local del extracto MeOH no disminuyó el número de sacudidas, por lo que este extracto no presentó actividad farmacológica en la prueba.

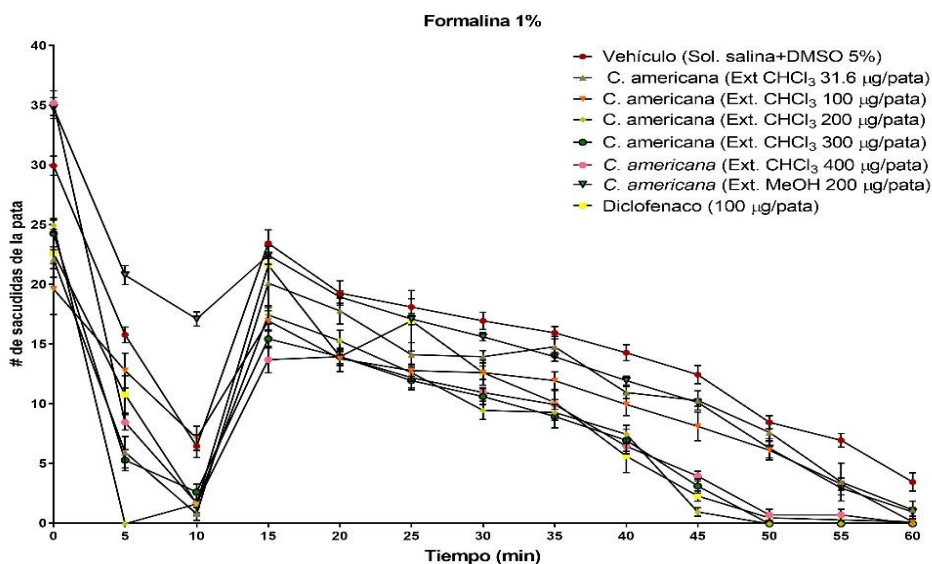


Fig. 18 Curso-temporal del efecto del extracto CHCl₃ de *C. americana* (31.6, 100, 200, 300 y 400 µg/pata), Ext. MeOH (200 µg/pata), diclofenaco (100 µg/pata) y vehículo (Sol. salina + DMSO 5%) en prueba de formalina al 1% en rata. Los datos son el promedio de 6 ratas ± error estándar.

El efecto antinociceptivo de los tratamientos administrados se observó con mayor claridad cuando se calculó el área bajo la curva (ABC) de los cursos temporales en ambas fases de la prueba, los resultados se muestran en la Fig. 19.

Como se observa en la Fig. 19 el grupo vehículo fue el que mostró una mayor ABC en ambas fases del modelo (Fase I 170.41 ± 4.80 y Fase II 706.7 ± 23.25), por lo que el podemos decir que el vehículo no presentó afecto farmacológico en el modelo. En contraste, la administración local de diclofenaco (100 $\mu\text{g/pata}$) modificó la conducta nociceptiva, se obtuvo una disminución significativa del ABC en ambas fases (Fase I 115 ± 10.99 y Fase II 426.3 ± 26.15) en comparación con el grupo vehículo. La inyección local del extracto CHCl_3 a las dosis de 31.6, 100, 200, 300 y 400 $\mu\text{g/pata}$ también produjo disminución del ABC en ambas fases (87.50 ± 7.30 , 131.30 ± 10.74 , 66.67 ± 2.47 , 94.17 ± 5.94 , 122.9 ± 7.94 , respectivamente en la fase I; 572.5 ± 28.15 , 498.3 ± 24.85 , 368.3 ± 18.75 , 363.3 ± 20.82 , 366.7 ± 14.57 , respectivamente en la fase II) con un efecto dependiente de la dosis en la fase II.

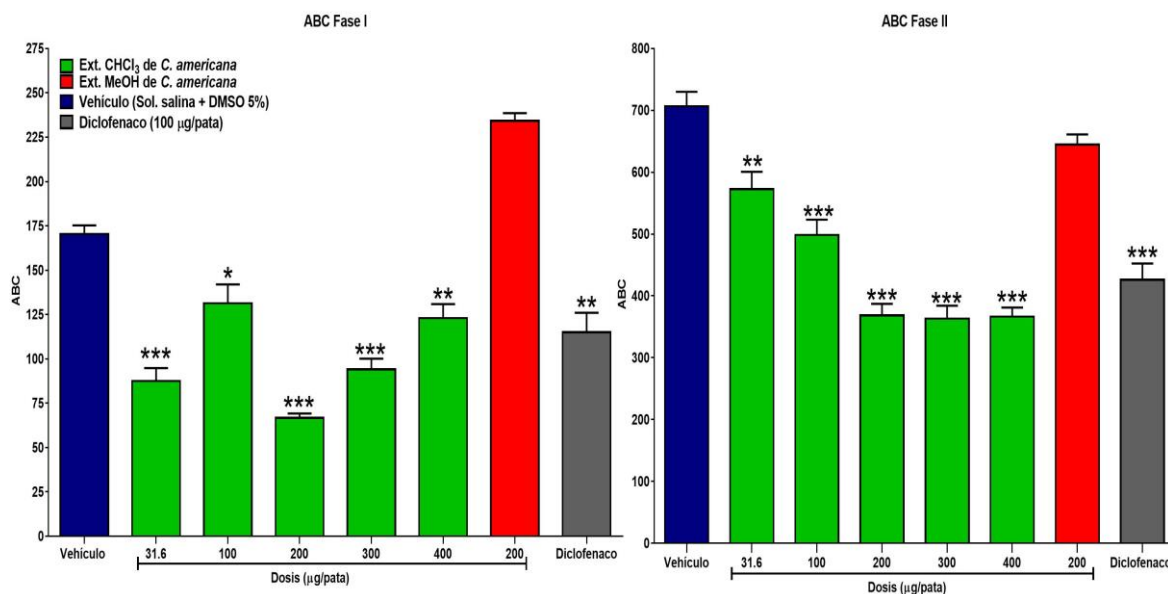


Fig. 19 Área bajo la curva del número de sacudidas en el grupo diclofenaco, vehículo, extracto MeOH y dosis del extracto CHCl_3 en la prueba de la formalina al 1% en rata. Fase I de 0-10 min tras la administración de 50 μL de formalina al 1%, Fase II 10-60 min. Los resultados están expresados como la media aritmética de los valores $\pm$ el error estándar de la media, $n=6$. * $p<0.05$, ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$ con respecto al grupo vehículo; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

Con los datos obtenidos del ABC se calculó el porcentaje de antinocicepción, siguiendo lo reportado por Ortiz (2018), los resultados se muestran en la Fig. 20. La administración subcutánea de 100 $\mu\text{g/pata}$ de diclofenaco produjo efecto antinociceptivo en ambas fases del modelo con un mayor porcentaje de antinocicepción en la fase II ($39.68 \pm 3.12\%$). Los resultados de la evaluación del efecto antinociceptivo muestran un efecto dosis-dependiente del extracto CHCl_3 con un efecto máximo ($48.11 \pm 2.71\%$) a la dosis de 200 $\mu\text{g/pata}$ en la fase II. El extracto MeOH no mostró actividad farmacológica.

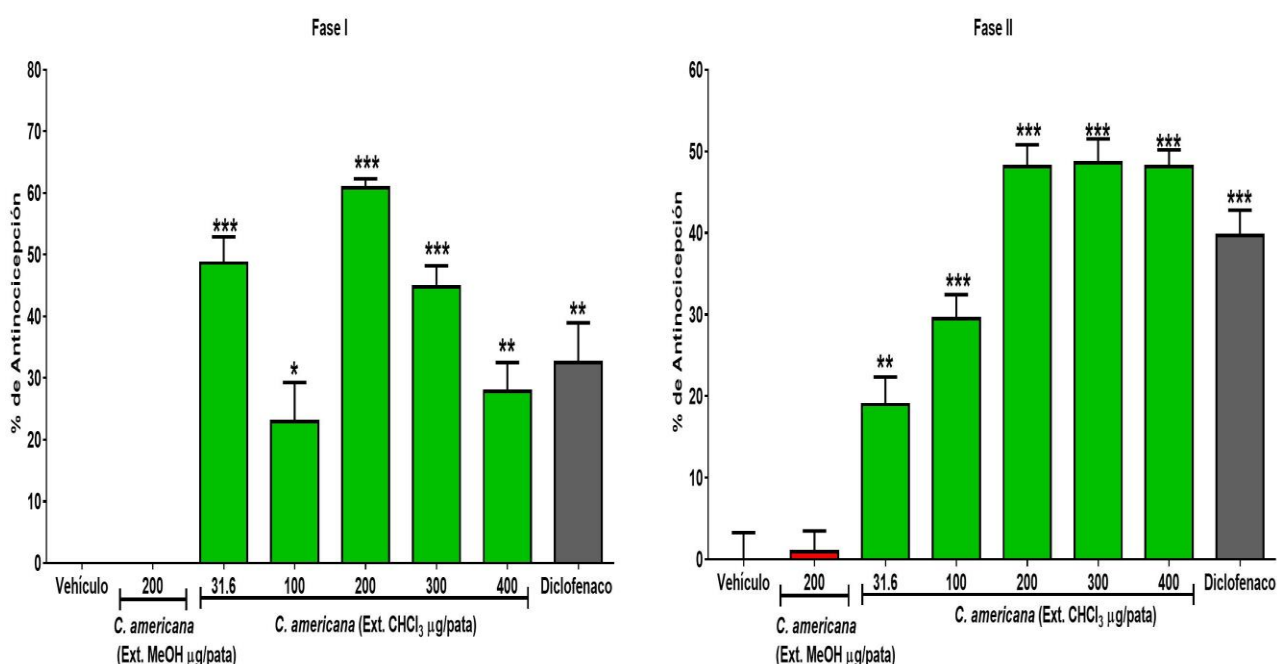


Fig. 20 Efecto antinociceptivo del extracto CHCl_3 , MeOH, diclofenaco y vehículo en la prueba de formalina al 1% en rata. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$, *** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo; $n = 6$; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

En la prueba de la formalina se presentan dos fases después de la administración de formaldehído al 1%, la primera fase (0-10 min) refleja dolor neurogénico debido a la irritación química de la formalina sobre los nociceptores, entre ellos el TRPA1. La segunda fase (11-60 min) refleja el dolor de tipo inflamatorio, por lo que las prostaglandinas (PGs) están involucradas ya que estas moléculas sensibilizan las terminales nerviosas en el sitio de la lesión periférica o estímulo.

Como fármaco de referencia se utilizó diclofenaco (100 µg/pata) el cual produjo efecto antinociceptivo en ambas fases. El efecto antinociceptivo del diclofenaco se debe a que es un inhibidor de la COX-1 enzima responsable de la síntesis de prostaglandinas y presente en la fase II (Torres López & Granados Soto, 2001; McNamara et al., 2007). El diclofenaco produjo efecto a nivel central, pues también presentó antinocicepción durante la fase I.

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antinociceptivo del extracto CHCl₃ muestran efecto antinociceptivo dependiente de la dosis, alcanzando el máximo efecto a la dosis de 200 µg/pata. Así mismo los datos muestran que no hay diferencia significativa (a partir de la dosis de 100 µg/pata) en el efecto antinociceptivo del extracto CHCl₃ y diclofenaco (100 µg/pata) por lo que sumado a los resultados obtenidos del efecto antiinflamatorio del extracto corroboramos el uso popular de *C. americana* en la medicina tradicional. Así como una fuente de moléculas con efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de *C. americana*. Santosh, Bhanudas , & Sagar (2016) reportaron actividad analgésica y antiinflamatoria del β-sitosterol aislado a partir de *Oxalis corniculata*. Por otro lado, Hailong, Xianwei , Yaya, & Yifei (2017) reportan actividad analgésica de la cinaropicrina, por lo que el efecto antinociceptivo del extracto CHCl₃ de *C. americana* podría deberse a la presencia de estos metabolitos. Al tratarse de un extracto crudo es posible que exista otros metabolitos que contribuyan al efecto antinociceptivo, por lo que se continuó el trabajo evaluando las fracciones obtenidas de la primera separación del extracto crudo.

Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto antinociceptivo (curso temporal y efecto antinociceptivo) de las fracciones de la primera separación del extracto CHCl₃ se observan en la Fig. 21.

En base a los resultados obtenidos del efecto antiinflamatorio se decidió omitir la evaluación antinociceptiva de las fracciones F1, F2 y F3, debido a que no presentaron actividad antiinflamatoria estadísticamente significativa, por lo que se evaluó el efecto antinociceptivo a partir de la fracción F4.

Como se observa en al Fig. 21, los resultados obtenidos en el efecto antinociceptivo de las fracciones de la primera separación del extracto CHCl_3 , concuerdan con los resultados obtenidos en la evaluación del efecto antiinflamatorio, pues el porcentaje de antinocicepción fue el mismo en las fracciones evaluadas, por lo que se omitió la evaluación del resto de las fracciones (F6-F9), se realizó cromatografía en capa fina y se juntaron aquellas con patrones similares, para obtener una fracción a la que se le identificó como AB y separarla nuevamente.

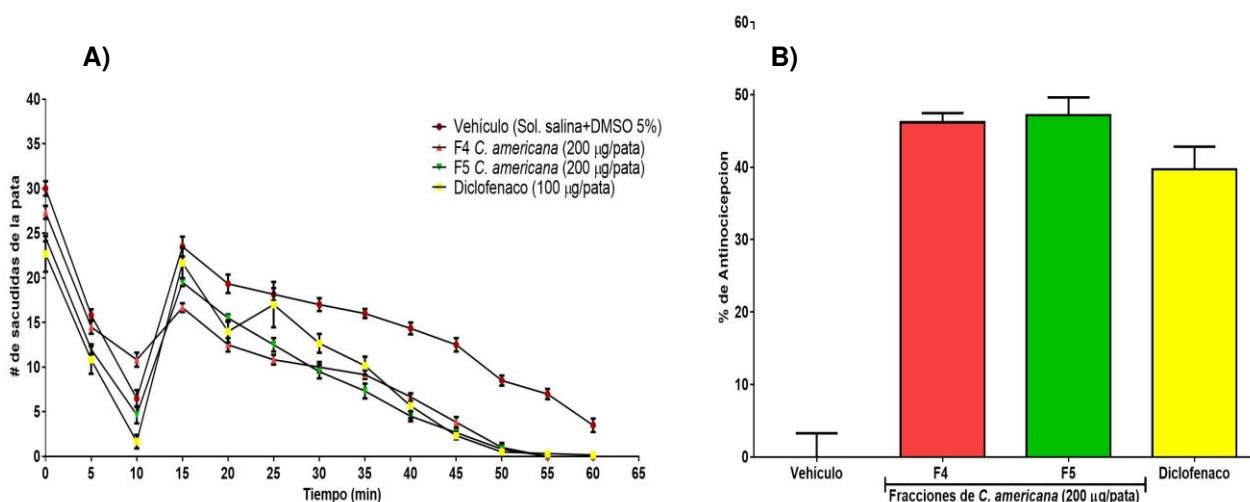


Fig. 21 A) Curso-temporal de las fracciones de *C. americana*, diclofenaco (100 µg/pata) y vehículo (Sol. salina + DMSO 5%) en el modelo de la formalina al 1% en rata; B) Efecto antinociceptivo de las fracciones de *C. americana*, diclofenaco y vehículo, Los datos son el promedio de 6 ratas $\pm$ error estándar.

En la Fig. 22 se observa el curso temporal de las fracciones obtenidas de la segunda separación. Como se observa, las fracciones AB-3 y 5 no mostraron actividad antinociceptiva significativa, las fracciones AB-4, 6 y 7 presentaron actividad antinociceptiva significativa; así mismo se obtuvo un mejor efecto en comparación con el fármaco de referencia (diclofenaco 100 µg/pata) en las fracciones AB-6 y 7.

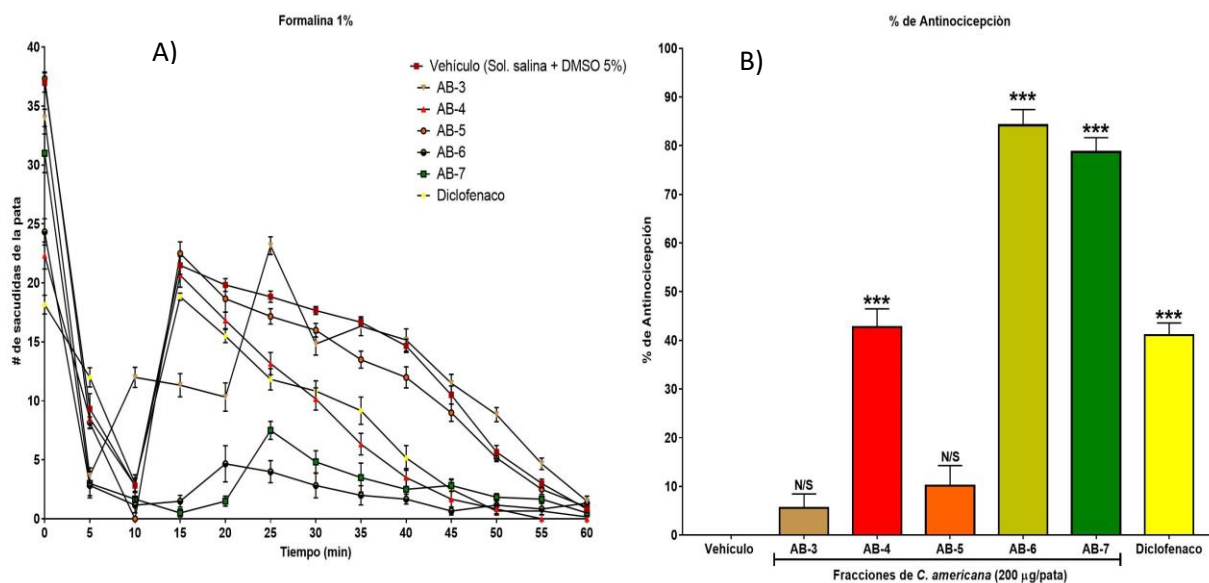


Fig. 22 A) Curso-temporal del efecto de las fracciones de *C. americana* (200 µg/pata), diclofenaco (100 µg/ pata) y vehículo (Sol. salina + DMSO 5%) en la prueba de formalina al 1% en rata. B) Efecto antinociceptivo de las fracciones de *C. americana*, diclofenaco y vehículo en la prueba de formalina al 1% en rata. *** $p < 0.0001$ con respecto al grupo vehículo; $n=6$; N/S no significativo; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

En el segundo fraccionamiento, se observó que las fracciones AB-3 y 5 no poseen actividad estadísticamente significativa. La evaluación del resto de las fracciones (AB-4, 6 y 7) mostraron el mismo comportamiento que en su efecto antiinflamatorio, pues se observó la misma separación del efecto farmacológico. Los datos sugieren que podría tratarse de más de un metabolito ejerciendo el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo, tomando en cuenta la polaridad de los metabolitos reportados en *C. americana*, podríamos decir que el β -sitosterol está presente en las fracciones de menor polaridad (AB-4) y la cinaropicrina en las fracciones más polares (fracciones AB-6 y AB-7), por lo que se realizó cromatografía en capa fina de la fracción 4 y se reveló con p -anisaldehído dando positivo para la presencia del β -sitosterol. Estos datos demuestran que el efecto antiinflamatorio y antinociceptivo de la fracción AB-4 se debe a la presencia del β -sitosterol.



Fracción AB-4

Fig. 23 Cromatografía en capa fina de la fracción AB-4 revelada con p-anilsadehído

La administración local subcutánea del extracto CHCl_3 de *C. americana*, así como de las fracciones produjeron antinocicepción en la fase II de la prueba. Este efecto podría deberse a una inhibición de la COX-1 pues se ha comprobado que dicha enzima es la responsable del dolor de tipo inflamatorio en la prueba. Debido a la gran cantidad de compuestos presentes en el extracto crudo, así como en las fracciones no participa una sola molécula como responsable del efecto, así como tampoco un solo mecanismo de acción.

Durante las respuestas inflamatorias y dolorosa están involucradas diversas moléculas, entre estas moléculas se encuentran las especies reactivas de oxígeno, por lo que al inhibir o disminuir el número de estas moléculas se atenúa la respuesta inflamatoria y dolorosa. En base a esto, se decidió evaluar la actividad antioxidante del extracto CHCl_3 de *C. americana* y sus fracciones; los resultados se muestran a continuación.

7.4 Evaluación de la actividad antioxidante

La Fig. 24 muestra los resultados obtenidos de la actividad antioxidante del extracto crudo CHCl_3 de *C. americana*, así como de la quercetina por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH).

El extracto CHCl_3 de *C. americana* presentó una actividad antioxidante dependiente de la concentración obteniendo el máximo de actividad a la concentración de 50 $\mu\text{g/mL}$.

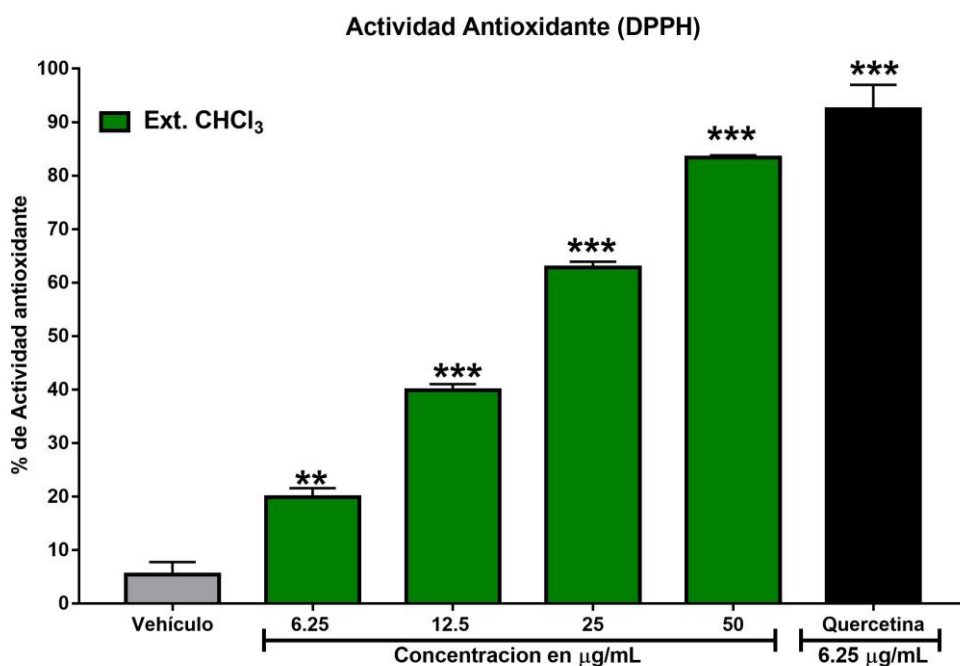


Fig. 24 Efecto antioxidante del extracto CHCl_3 y Quercetina por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH). Los valores corresponden a la media obtenida de tres replicas ($n=3$) $\pm$ error estándar; ** $p<0.001$, *** $p<0.0001$ con respecto al grupo vehículo; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

En la evaluación de la actividad antioxidante de los extractos de *C. americana* se utilizó el reactivo 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH) el cual se emplea como sustrato en la evaluación de la actividad antioxidante de diferentes compuestos, dicho reactivo actúa en la presencia de sustancias que contengan grupos $-\text{OH}$ los reduce a 2,2-difenil-1-picrihidrazina.

El extracto CHCl_3 mostró actividad antioxidante dependiente de la concentración, por lo que el efecto del extracto CHCl_3 se podría deber a la presencia de metabolitos con grupos $-\text{OH}$, tomando en cuenta la estructura química de los metabolitos reportados en *C. americana*, la cinaropicrina y el β -sitosterol, poseen en su estructura grupos $-\text{OH}$, así como carbonilo, por lo que el efecto antioxidante del extracto CHCl_3 de *C. americana* podría deberse a la presencia de estos metabolitos. Se utilizó quercetina como referencia mostrando un efecto de casi el 100% en la concentración más baja. El efecto antioxidante de la quercetina (Fig. 25) se debe a la presencia de grupos OH - en la molécula, por lo que se utiliza como referencia en la evaluación de actividad antioxidante (Soto et al., 2007).

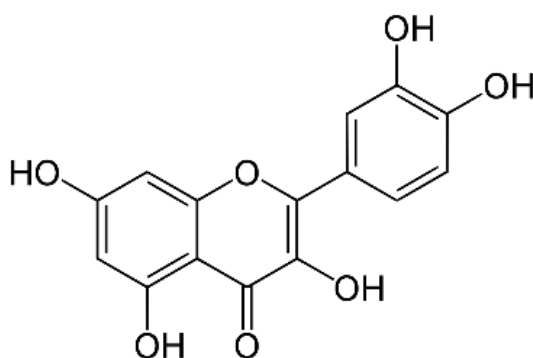


Fig. 25 Estructura química de quercetina

En la Fig. 26 se observa la actividad antioxidante del segundo fraccionamiento de *C. americana*.

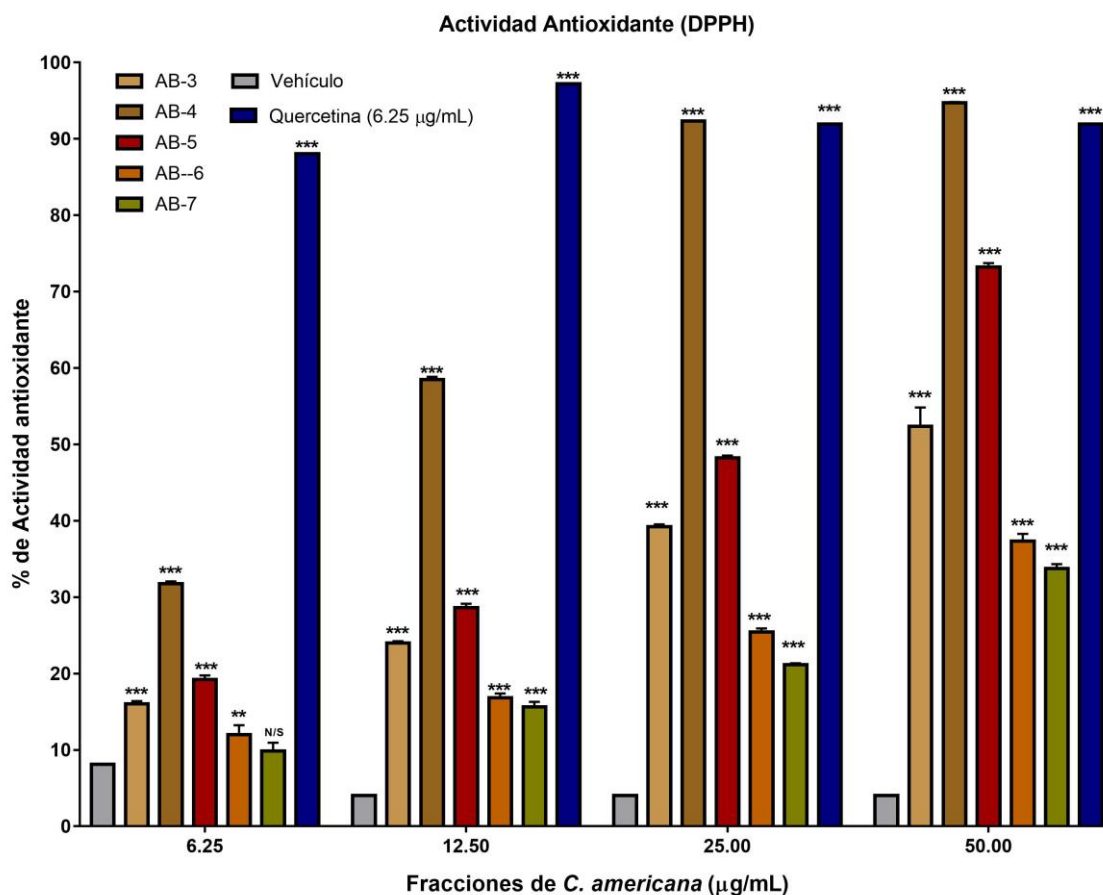


Fig. 26 Efecto antioxidante del segundo fraccionamiento de *C. americana* por el método del radical libre 2,2-difenil-1-picrihidracilo (DPPH). Los valores corresponden a la media obtenida de tres replicas ($n=3$) $\pm$ error estándar; $p^{***}<0.0001$ con respecto al grupo vehículo; N/S no significativo; ANOVA de una vía seguido de una prueba de comparaciones múltiples (Tukey).

Como se observa en la Fig. 26, cada una de las fracciones evaluadas mostraron actividad antioxidante a las concentraciones utilizadas. Estos resultados nos permiten decir que no hay una relación directa entre la actividad antiinflamatoria y antinoceptiva con la actividad antioxidante, ya que la fracción AB5 que no presentó actividad farmacológica en los modelos de evaluación antiinflamatoria y antinoceptiva mostro una actividad antioxidante significativa, por lo que podemos decir que la actividad antioxidante no está relacionada con los efectos antiinflamatorios y analgésicos en las fracciones de la segunda separación.

8. CONCLUSIONES

El estudio sistemático de las plantas representa una fuente de moléculas nuevas con diversos efectos, así como aplicaciones. En el área de la salud resultan de gran interés para la búsqueda de nuevas terapias para las enfermedades, así como para su sintomatología que en ocasiones llega a hacer el problema medular de alguna patología.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la aplicación tópica del extracto CHCl₃ de *C. americana* en el modelo del edema auricular inducido con aceite de croton en ratón, así como la administración subcutánea en la prueba de la formalina al 1% en rata, refuerzan el uso popular de esta planta como agente antiinflamatorio y antinociceptivo pues se comprobaron ambas actividades farmacológicas. Por otro lado, se evaluó también la actividad antioxidante de la planta, actividad relacionada con su efecto antiinflamatorio y antinociceptivo.

La separación del extracto CHCl₃ en búsqueda de las moléculas responsables de la actividad farmacológica, dio como resultado fracciones activas, tales como: fracciones AB-4,6 y 7 con el mayor efecto farmacológico. Se necesitan otras técnicas para la separación de los metabolitos presentes en las fracciones identificadas como posibles responsables de la actividad antiinflamatoria y antinociceptiva de *C. americana*.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar la composición de las fracciones obtenidas en el segundo fraccionamiento que mostraron actividad farmacológica. En su caso estandarizar el extracto activo.
- Aislar e identificar el o los compuestos responsables de la actividad farmacológica.
- Elucidar el posible mecanismo de acción antiinflamatorio y antinociceptivo de la fracción activa y/o de los compuestos aislados.

10. BIBLIOGRAFIA

- Avram S, D.-S. D. (2009). Aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs as ciclooxigenasa inhibitors: state of the art, barriers and perspectives. *Curr Comp Aided Drug Design* , 1-12.
- Awad, A. B., & Fink, C. S. (2000). Phytosterols as Anticancer Dietary Components: Evidence and Mechanism of Action. *Recent Advances in Nutritional Sciences*, 2127-2130.
- Barrero, A., Herrador, M., Arteaga, P., Cabrera, E., Rodriguez-Garcia, I., Garcia-Moreno, M., & Gravalos, D. (1997). Cytotoxic Activity of Flavonoids from *Carthamus arborescens* *Ononis natrix* ssp. *ramosissima* and *Centaurea malacitana*. *Fitoterapia*, 281-283.
- Basbaum, A., Bautista, D., Scherrer, G., & Julius, D. (2009). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 267-284.
- Bataille, E., & Chausset, R. (1997). Pain: Bases Neurophysiologiques. *Soins*, 6-8.
- Bauer, J., Kuehnl, S., Rollinger, J., Scherer, O., Northoff, H., Stuppner, H., . . . Koeberle, A. (2012). Carnosol and Carnosic Acids from *Salvia officinalis* Inhibit microsomal prostaglandin E2 synthase-1. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 169-176.
- Besson , J., & Chaouch, A. (1987). Peripheral and Spinal Mechanisms of Nociception. *Physiological Reviews*, 67-186.
- Bourke, E., & Moynagh, P. (1999). Antiinflammatory effects of glucocorticoids in brain cells, independent of NF- B. *Journal of Immunology*, 2113-2119.
- Brain, S., & Williams, T. (1990). eukotrienes and Inflammation. *Pharmac. Ther*, 57-66.
- Bremner, P., & Heinrich, M. (2001). Natural products as targeted modulators of the nuclear factor- κ B pathway. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 453-472.

- Brogliato, A., Moor, A., Kesi, S., Guilherme, R., Georgii, J., Peters-Golden, M., . . . Benjamin, C. (2014). Critical Role of 5-Lipoxygenase and Heme Oxygenase-1 in Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology*, 1436-1445.
- Cesare, P., & McNaughton, P. (1997). Peripheral pain mechanisms. *Current Opinion in Neurobiology*, 493-499.
- Cho, J., Park, J., Yoo, E. S., Baik, K., Jung, J., & Lee, J. (1998). Inhibitory effect of Sesquiterpene lactones from *Saussurea lappa* on tumor necrosis factor- α production in murine macrophage-like cells. *Planta Med*, 594-597.
- Costigan, M., & Woolf, C. (2000). Pain: Molecular Mechanisms. *The Journal of Pain*, 35-44.
- Crusz, S., & Balkwill, F. (2015). Inflammation and cancer: advances and new agents. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 584-596.
- De Young, L., Kheifets, J., Ballaron, S., & Young, J. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions*, 335-341.
- Domínguez, X. A., González, L. A., & Rojas, P. (1972). Terpenoids of *centaurea americana*. *Phytochemistry*, 850-851.
- Donath, M. D.-S. (2013). Inflammation in obesity and diabetes: islet dysfunction and therapeutic opportunity. *Cell Metabolism*, 860-872.
- Dray, A. (1995). Inflammatory mediators of pain. *British Journal of Anaesthesia*, 125-131.
- Efthimiou, P. &. (2015). Impact of IL-1 inhibition on fatigue associated with autoinflammatory syndromes. *Modern Rheumatology*, 3-8.
- Elsebai, M. F., Mocan, A., & Atanasov, A. G. (2016). Cynaropicrin: A Comprehensive Research Review and Therapeutic Potential As an Anti-Hepatitis C Virus Agent. *Frontiers in Pharmacology*, 1-15.

- Farrag, N., Abd El Aziz, E., & El-Domiaty, M. (1993). Phytochemical Investigation of *Centaurea araneosa* Growing in Egypt, Zag. *J. Pharm. Sci.*, 29-45.
- García, J., & Gómez-Reina, J. (2000). Fisiopatología de la ciclooxigenasa-1 y ciclooxigenasa-2. *Revista española de reumatología*, 33-35.
- Ghosh, S., Banerjees, S., & Sill, P. (2015). The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: a recent update. *Food and Chemical Toxicology*, 111-124.
- Gilmore, T. (2006). Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene*, 6680-6684.
- Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N., & Domingo Medina, J. (2011). Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3), 182-217.
- Grisham, M., Jourdeuil, D., & Wink, D. (1999). Nitric Oxide Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: implications in inflammation. *American Physiological Society*, 315-321.
- Guimares, F., Sales-Campo, H., Nardini, V., Alvares da costa, T., Costa, M., Rodrigues, V., . . . Ribeiro, C. (2018). The inhibition of 5-Lipoxygenase (5-LO) products leukotriene B₄ (LTB₄) and cysteinyl leukotrienes (cysLTs) modulates the inflammatory response and improves cutaneous wound healing. *Clinical Immunology*, 74-83.
- Guzmán, K., Camaras, A., Espinel, N., & Ojeda Carpio, A. (2017). Panorámica sobre la indicación de los antiinflamatorios no esteroideos de uso regular en la práctica clínica reumatológica. *Revista Cubana de Reumatología*.
- Hailong, S., Xianwei, Z., Yaya, C., & Yifei, Q. (2017). Analgesic activity of cynaropicrinon on post-inflammatory irritable bowel syndrome visceral hypersensitivity in a rat model. *Experimental and therapeutic medicine*, 4476-4482.

- IASP. (1979). Pain terms: a list with definitions and notes on usage: recommended by the IASP Subcommittee on Taxonomy. *Pain*.
- Jensen, T. (2011). A new definition of neuropathic pain. *Pain*, 2204-2205.
- Johansson, Å., Hansson, A.-S., Nandakumar, K., Bäcklund, J., & Holmdahl, R. (2001). IL-10-Deficient B10.Q Mice Develop More Severe Collagen-Induced Arthritis, but Are Protected from Arthritis Induced with Anti-Type II Collagen Antinbodies. *The Journal of Immunology*, 3505-3512.
- Kaij-a-Kamb, M., Amoros, M., & Girre, L. (1992). The chemistry and biological activity of the genus *Centaurea*. *Pharm. Acta. Helv*, 178-188.
- Kang, K., Lee, H. J., Kim, C. Y., Lee, S. B., Tunsag, J., Batsuren, D., & Nho, C. W. (2007). The Chemopreventive Effects of *Saussurea salicifolia* through Induction of Apoptosis and Phase II Detoxification Enzyme. *Biol. Pharm. Bull.*, 2352-2359.
- Kim, T.-H., Li, H., Wu, Q., Lee, H., & Ryu, J.-H. (2013). A new labdanoid terpenoid with anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 760-767.
- Kumar, V. A. (2015). *Robbins y Cotran Patología estructural y funcional*. España: Elsevier.
- Kurakula, K., Vos, M., Logiantara, A., Roelofs, J., Nieuwenhuis, M., Koppelman, G., . . . de Vries, C. (2015). Nuclear Receptor Nur77 Attenuates Airway Inflammation in Mice by Suppressing NF-κB Activity in Lung Epithelial Cells. *The Journal Of Immunology*, 1388-1398.
- Kurian, A., & Sankar, A. (2007). *Medicinal plants. Horticulture Science Series*. New Delhi: New India.
- León Regal, M., Alvarado Borges, A., de Armas García, J., Miranda Alvarado, L., Varens Cedeño, J., & Cuesta del Sol, J. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares: cifras alarmantes. *Finlay*, 5(1), 47-62.

- Libby, P., Ridker, P., & Hansson, G. (2009). Inflammation in atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *Journal of the American College of Cardiology*, 2129-2138.
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D., Siemens, J., Deranian, K., Zhao, M., . . . Fanger, C. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *PNAS*, 13525-13530.
- Nathan, C. (1987). Neutrophil activation on biological surfaces. Massive secretion of hydrogen peroxide in response to products of macrophages and lymphocytes. *Journal of Clinical Investigation*, 1550-1560.
- Nelson, N. A. (1974). Prostaglandin Nomenclature. *Journal of Medicinal Chemistry*, 911-918.
- Okamoto, R., & Watanabe, M. (2016). Role of epithelial cells in the pathogenesis and treatment of inflammatory bowel disease. *Journal of gastroenterology*, 11-21.
- Oliveira, C., Sakata, R., Issy, A., Gerola, L., & Salomao, R. (2011). Citocinas y Dolor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 137-142.
- Orallo, F., Lamela, M., Camina, M., Uriarte, E., & Calleja, M. (1998). Preliminary study of the potential vasodilator effects on rat aorta of Centaurein and Centaureidin, two flavonoids from *Centaurea corubionensis*. *Planta. Med.*, 116-119.
- Ortega, A., Roca, A., & Micó, J. (2002). Modelos animales de dolor. Una visión crítica. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 447-453.
- Ortiz, M. I., Cariño-Cortés, R., Ponce-Monter, H. A., Castañeda-Hernández, G., & Chávez-Piña, A. E. (2018). Pharmacological interaction of α -bisabolol and diclofenac on nociception, inflammation, and gastric integrity in rats. *Drug Dev. Res.*, 29-37.

- Panickar, K. J. (2015). The beneficial role of anti-inflammatory dietary ingredients in attenuating markers of chronic low-grade inflammation in aging. *Hormone Molecular Biology and Clinical Investigation*, 59-70.
- Payá, M., Ferrándiz, M., Sanz, M., Bustos, G., Blasco, R., Rios, J., & Alcaraz, M. (1993). Study of the Antioedema Activity of some Seaweed and Sponge Extracts from the Mediterranean-Coast in Mice. *Phytotherapy research*, 159-162.
- Pickup, J. (2004). Inflammation and Activated Innate Immunity in the Pathogenesis of Type 2 Diabetes. *American Diabetes Association Diabetes Care*, 813-823.
- Renda, G. Z. (2010). Aspirin-triggered lipoxin in patients treated with aspirin and selective vs. nonselective COX-2 inhibitors. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 303-306.
- Rhen, T., & Cidlowski, J. (Octubre de 2005). Antiinflammatory action of glucocorticoidsnew mechanisms for old drugs. *The New England Journal of Medicine*, 353, 1711-1723.
- Richard, M., & Aaron, N. (2004). Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: Multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacology & Therapeutics*, 147-166.
- Ríos, J. (1994-1995). Fitoterapia de la inflamación. *Natura Medicatrix: Revista médica para el estudio y difusión de las medicinas alternativas*, 80-85.
- Romera, E., Perena, M., & Rodrigo, M. (2000). Neurofisiología del dolor. *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 11-17.
- S. Ronchetti, G. M. (2017). Association of inflammatory mediators with pain perception. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 1445-1452.

- Santosh , B. D., Bhanudas , S. K., & Sagar , B. W. (2016). Analgesic and anti-inflammatory activity of β -sitosterol isolated from leaves of *Oxalis corniculata*. *International Journal of Pharmacological Research*, 109-113.
- Serhan, C., Hamberg, M., & Samuelsson, B. (1984). Lipoxins: Novel series of biologically active compounds formed from arachidonic acid in human leukocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 5335-5339.
- Serra, M. S. (2018). Las enfermedades crónicas no transmisibles: magnitud actual y tendencias futuras. *Finlay*.
- Smith, W., Garavito, R., & De Witt, D. (1996). Prostaglandin Endoperoxide H Synthases (Cyclooxygenases)-1 and 2. *The journal of biological chemistry*, 33157-33160.
- Susunaga, A. (2014). Estudio químico biodirigido del efecto antiinflamatorio de *Senna villosa* (Miller) H.S. Irwin & Barneby (Leguminosae) en el edema de la oreja inducido por TPA. *Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana*.
- Szekanecz, Z., Vegvari, A., Szabo, Z., & Koch, A. (2006). Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Current Drug Targets*, 91-102.
- Torres López, J. E., & Granados Soto, V. (2001). Participación de las ciclooxigenasa-1 en el dolor inflamatorio. *Universidad y Ciencia*.
- Vega, G. (Septiembre de 2008). Inflamación. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 51, 220-222.
- Woolf , C., & Costigan, M. (1999). Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proc Nat Acad Sci*, 7723-7730.
- Woolf, C. (2004). Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. *Annals of Internal Medicine*, 441-451.
- Woolf, C. (2010). What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, 3742-3744.

- Woolf, C. (2011). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, S2-S15.
- Woolf, C., & Scholz, J. (2002). Can we conquer pain? *Nature neuroscience supplement*, 1062-1067.
- Yu, T., Lee, J., Lee, Y., Byeon, S., Kim, M., Sohn, E., . . . Cho, J. (2010). In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of ethanol extract from *Acer tegmentosum*. *Journal of Ethnopharmacology*, 139-147.
- Zhang, J., & An, J. (2007). Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin*, 27-37.

Certificate of Recognition

conferenceseries.com

47 Churchfield Road, London, W3 6AY, UK

Conference Series and the Editors of Natural Products Chemistry & Research, Journal of Marine Science: Research & Development and Journal of Pharmacognosy & Natural Products wish to thank

Prof/Dr/Mr/Ms. Jimenez P E

Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico

for his Poster Presentation on

"Chemical-Pharmacological study of Centaurea americana"

at the "4th International Conference and Exhibition on Natural Products, Medicinal Plants & Marine Drugs"

held during June 11-12, 2018 in Rome, Italy

Luca Mancini
Luca Mancini
University of Trento, Italy



"INNOVACIÓN Y DESARROLLO FARMACÉUTICO
CON IMPACTO EN LA SALUD Y BIENESTAR DE LA POBLACIÓN"

LI Congreso Nacional de CIENCIAS FARMACÉUTICAS

La Asociación Farmacéutica Mexicana. A.C.
otorga el presente



RECONOCIMIENTO a:

Miguel Angel Zavala Sanchez, Estanislao Jiménez Pérez, Beatriz Godínez
Chaparro, Luis Alfonso Moreno Rocha

**Por la presentación del trabajo:
Estudio de la actividad antiinflamatoria de Centaurea americana**

Dr. Efrén Hernández Baltazar
Presidencia de la Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.

Septiembre 2018, Puerto Vallarta, Jalisco.

Dra. Verónica Rodríguez López
Dirección de Ciencia y Tecnología de la Asociación Farmacéutica Mexicana, A. C.