

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

Alumna: Katia Giovanna Salas Balgañón.

Matrícula: 2143060960

PROYECTO GENÉRICO:

Evaluación de productos relacionados con la salud.

**“Determinación de la actividad antiinflamatoria de
Salvia ballotiflora Benth.”**

ETAPA:

Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos.

Asesora: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Asesora: Nimsi Campos Xolalpa

Lugar de desarrollo del proyecto:

Laboratorio de investigación química orgánica y productos naturales, edificio N.
(UIDIS) de la UAM-X

Fecha de inicio: 1 de Octubre del 2018

Fecha de entrega: 9 de Diciembre del 2019

Contenido

Contenido	2
Introducción	3
Marco teórico	4
Inflamación.....	4
Clasificación de la inflamación	4
Generalidades de la inflamación.....	5
Tratamiento antiinflamatorio	7
Efectos secundarios/adversos.....	7
Tratamiento alternativo	8
<i>Salvia ballotiflora</i> Benth.....	9
Objetivos:	10
Material y métodos	10
Material vegetal	10
Preparación del extracto.....	10
Separación del extracto.....	11
Evaluación de actividad antiinflamatoria in vivo	11
Inflamación aguda.....	11
Inflamación crónica:.....	12
Evaluación de actividad antiinflamatoria <i>in vitro</i>	12
Evaluación de Viabilidad	12
Determinación de óxido nítrico.....	13
Modelo de AR: Protección a la desnaturalización de proteína.....	13
Resultados y discusión	14
Extracción y aislamiento de diterpenos	14
Evaluación de toxicidad <i>in vivo</i>	16
Evaluación de actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i>	16
Edema auricular agudo inducido por TPA.....	16
Edema auricular crónico inducido por múltiples aplicaciones de TPA	17
Viabilidad de macrófagos tratados con ECL.....	18
Determinación de óxido nítrico.....	19
Evaluación de la actividad antiartrítica <i>in vitro</i>	20
Conclusiones	21
Bibliografía	22

Introducción

El conocimiento de las plantas medicinales es milenario y ha trascendido por generaciones gracias a la tradición. Se considera que nuestros antepasados obtuvieron el conocimiento del uso de las plantas después de distinguir entre las que servían como alimento y aquellas que tenían algún efecto en su organismo, a partir de estos conocimientos empezaron a diferenciarlas y seleccionarlas (Santillán, 2012). La importancia de las plantas medicinales radica en el uso y aplicación de estas como remedio de enfermedades. Por lo que, las plantas han resultado ser una fuente importante para la obtención de compuestos químicos con actividad farmacológica.

En México, uno de los géneros más representativos con mayor número de especies es el género de *Salvia*. Existen aproximadamente 300 especies, de las cuales el 85-88% son endémicas de México (Campos-Xolalpa et al, 2018). Los estudios fitoquímicos de varias plantas del género *Salvia* han llevado al aislamiento de una gran variedad de metabolitos secundarios como esteroides, flavonoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, etc. Algunas especies de *Salvia* han sido usadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como artritis, entre otras (Yi-Bing et al, 2012). Sin embargo, los metabolitos secundarios que mejor caracterizan a las plantas del género *Salvia* son los compuestos diterpénicos (Cárdenas & Rodríguez, 1995).

En la medicina tradicional, el uso de las plantas medicinales como alternativa en el tratamiento de procesos inflamatorios es una práctica común. Actualmente el interés por sustancias de origen vegetal va en aumento debido a que no son perjudiciales en muchos de los casos.

La inflamación es un padecimiento que es originado por la presencia de algún agente patógeno o por la estimulación de agentes externos que generan una lesión tisular (traumático, tóxicos, isquémicos, autoinmunes, etc.). La inflamación tiene la finalidad de adaptar al organismo a circunstancias normales (Vega- Robledo, 2008), por medio de la activación de una cascada compleja de interacciones bioquímicas y celulares, mediadas por múltiples agentes químicos, que provocan cambios en la microvasculatura (Villalba Herrera, 2014).

Siendo la inflamación uno de los temas de mayor interés en la clínica ya que se presenta en diferentes enfermedades, es de gran importancia buscar alternativas para el tratamiento de este padecimiento, debido a que los fármacos prescritos con mayor frecuencia presentan efectos adversos, como úlceras gástricas, entre otros (Espinós-Pérez et al, 2011).

Por lo que, en el presente estudio, se evaluó la actividad antiinflamatoria de *Salvia ballotiflora*, también conocida como “mejorana” ya que presenta un perfil favorable para ser propuesta como una alternativa para el tratamiento de la inflamación.

Marco teórico

Inflamación

Etimológicamente, la palabra inflamación proviene del latín *‘inflammatio’*, que significa incendio o encender fuego, y era empleado para describir un órgano con aumento de calor local. Actualmente, es el término utilizado para describir la serie de acontecimientos que implican una respuesta inmunitaria y comprenden el edema local correspondiente al reclutamiento de fagocitos y proteínas plasmáticas desde la sangre; el eritema, el dolor y el aumento de temperatura (Delves et al, 2014).

La inflamación es una respuesta inespecífica y protectora, cuyo principal objetivo es librar al organismo del elemento causante del daño celular y de las consecuencias de ese daño (Licastro, 2005). Sin embargo, si la fuente de inflamación no se elimina o persiste se vuelve crónica, y en algunas ocasiones desencadena la pérdida de la función del tejido.

Varias enfermedades involucran un proceso inflamatorio crónico tales como las cerebrovasculares, cardiovasculares, diabetes mellitus, alzheimer, arterioesclerosis, colitis crónica degenerativa, neoplasias y artritis reumatoide (Gómez, 2011) y por ello es de gran importancia contar con productos que traten esta respuesta inespecífica con el menor daño posible.

Clasificación de la inflamación

La inflamación es clasificada dependiendo el tiempo de duración, carácter del exudado, etiología, características morfológicas y localización:

1. Tiempo de duración:
 - a. Aguda: Respuesta inmediata al agente agresor o daño, cuya finalidad es la liberación de mediadores de defensa en el área de la lesión. Su duración es corta.
 - b. Crónica: Proceso prolongado en el cual hay destrucción de tejido, inflamación activa y un repetitivo intento de reparación. Su tiempo de duración es prolongado.

2. Carácter de exudado:

- a. Trasudado: Caracterizada por la presencia de líquido extravascular con bajo contenido proteico, producto de la ligera permeabilidad vascular.
- b. Exudado: Hay presencia de líquido inflamatorio extravascular con alto contenido proteico, lo que denota una gran permeabilidad en los vasos sanguíneos.

3. Etiología:

- a. Infecciosas: Por bacterias, virus, parásitos o toxinas microbianas.
- b. Traumáticas.
- c. Térmicas: Resultantes de quemaduras o congelamiento.
- d. Irradiaciones.
- e. Exposición a agentes químicos ambientales.
- f. Necrosis tisular.
- g. Presencia de cuerpos extraños.
- h. Inmunitarias o reacciones de hipersensibilidad.

4. Características morfológicas:

- a. Serosa: acúmulo de líquido tisular de bajo contenido proteico.
- b. Fibrinosa: presencia de exudado con grandes cantidades de fibrinógeno.
- c. Supurativa o purulenta: producción de exudados que constan de leucocitos y células necróticas.
- d. Abscesos: presenta tejido inflamatorio purulento acompañado de necrosis licuefactiva.
- e. Úlceras: producidas por esfacelamiento de tejido necrótico inflamado.

5. Localización:

- a. Focales: producidas en zonas y órganos específicos.
- b. Diseminados: resultado de la propagación de procesos inflamatorios persistentes. (Robbins & Cotran, 2010).

Generalidades de la inflamación

Las células de la inflamación están representadas por los monocitos-macrófagos, los neutrófilos, los basófilos-mastocitos, los eosinófilos y los linfocitos. Se diferencian entre sí, unas forman parte de los tejidos permanentemente (mastocitos y células endoteliales), otras migran y acceden al sitio afectado desde la sangre (neutrófilos polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y linfocitos). Tal es el caso de los linfocitos

y otras células, producen moléculas activas que generalmente son mediadores del proceso inflamatorio (Gómez, 2011). Los macrófagos están ampliamente distribuidos en el organismo, lo que hace que sean elementos centrales en la inflamación (Espinós-Pérez et al, 2011).

La inflamación se resume en varios fenómenos fisiológicos que involucran la disminución de proliferación y maduración de células inmunes, la inducción de la apoptosis y fagocitosis de leucocitos activos, así como a inhibición de la secreción de mediadores inflamatorios y la depuración de los mismos. Uno de los primeros cambios vasculares es la vasodilatación, inducida por la histamina, que posteriormente desencadenará la salida de líquidos del espacio intravascular al extravascular hasta generar un edema. Lo que trae como consecuencia la disminución de la velocidad sanguínea, pérdida de líquido intravascular, aumento de la viscosidad de la sangre, entre otras cosas, que resulta en la detención o estancamiento de la sangre (Gómez et al, 2011).

En el proceso inflamatorio el flujo de los vasos sanguíneos, así como el calibre, sufren importantes cambios que posibilitan la salida de proteínas y células plasmáticas desde la circulación hacia el foco inflamatorio. Las moléculas que inician la inflamación son un grupo de activadores y quimioatrayentes de células, como las citocinas y quimiocinas producidos por diversas células. Las principales quimiocinas y citocinas, producidas en altas concentraciones por los fagocitos y linfocitos, se denominan *proinflamatorias* (Madigan, 2015).

El óxido nítrico (NO) también puede fungir como molécula proinflamatoria, mediante la activación de la ciclooxigenasa (COX) y por lo tanto aumentar la producción de las prostaglandinas, puede inhibir la adhesión de los leucocitos al endotelio vascular, lo que impide su entrada al tejido lesionado (Gómez et al, 2011).

El óxido nítrico es un radical libre que participa en numerosos procesos fisiológicos del organismo; sin embargo, en grandes cantidades puede actuar de forma perjudicial en los tejidos (Rojo et al, 2003). Posee una acción inmuno-regulatoria importante en la inflamación pues se ha demostrado que la activación de NO es relevante en la patogénesis de enfermedades inflamatorias (Silvia et al, 2011). En la artritis reumatoide como en otras enfermedades, se ha demostrado que se encuentra presente en niveles elevados (Gómez et al, 2011).

La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad que causa dolor, entumecimiento, inflamación y a veces deformación de las articulaciones. Se presenta comúnmente en los dedos de los pies y de las manos, muñecas, codos, hombros, caderas y rodillas. En

general afecta la misma articulación a ambos lados del cuerpo. La artritis no se puede curar, pero existen medicamentos que pueden reducir la frecuencia y severidad de los ataques (Imaizumi, 2008). Esta enfermedad crónica comprende tres procesos básicos: inflamación, proliferación sinovial y destrucción del tejido articular (García- López, 2016).

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) parece ejercer un papel central en la patogénesis de esta enfermedad, junto con la remodelación tisular inducida por la matriz metaloproteínasa (MMP), la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y la sobreproducción de NO (Imaizumi, 2008).

La desnaturalización de proteínas es una causa de la inflamación ya que implica la modificación estructural de las proteínas (terciaria y cuaternaria) ya sea por estrés, el contacto con ácidos o bases fuertes, calor, etc., esto conlleva a la pérdida de función biológica (García- López, 2016)

Tratamiento antiinflamatorio

Los medicamentos usados para el tratamiento de la inflamación consisten en tres grupos de agentes antiinflamatorios:

- 1) Antiinflamatorios esteroideos o glucocorticoides,
- 2) Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)
- 3) Fármacos modificadores de la enfermedad (FARMEs) (Domínguez, 2012).

Los glucocorticoides poseen un potente efecto antiinflamatorio local debido su liposolubilidad (Cosío, 2005). En este grupo de fármacos se encuentran la dexametasona, prednisona, cortisona, hidrocortisona, entre otros.

Mientras que los AINEs disminuyen el dolor y la inflamación, mediante la inhibición de las COX-1 y 2 y el bloqueo de la secreción de mediadores proinflamatorios. Algunos de estos son: aspirina, ibuprofeno, naproxeno, entre mucho más.

Por último, los FARMEs inhiben la secreción de citocinas proinflamatorias, además disminuyen la interacción entre las células T con las células presentadoras de antígeno (Domínguez, 2012). Estos fármacos comparten acciones farmacológicas y efectos adversos, tales como la toxicidad gastrointestinal y renal (Gómez, 2011).

Efectos secundarios/adversos

En el tratamiento de la inflamación, las propiedades antipiréticas, analgésicas y antiinflamatorias de los AINEs hacen que su prescripción sea de las más frecuentes. Tal es el caso del ibuprofeno, aspirina y naproxeno. (Espinós-Pérez et al, 2011). Este tipo de fármacos ejercen su actividad antiinflamatoria a través de la inhibición de la COX 1 y

2 en el sitio de inflamación. La inhibición de la COX-1 en los tejidos gastrointestinales y renales puede limitar su utilidad terapéutica pues generan efectos no deseados, ya que depende de la capacidad de bloqueo en mayor o menor grado a estas formas de COX (Ruiz et al, 2002).

Los glucocorticoides se fijan a un receptor del citoplasma unido a una proteína formada por dos subunidades, esto permite que el complejo esteroide-receptor se desplace al núcleo y se una al ADN y posteriormente haya una inhibición de la transcripción de citocinas proinflamatorias, pero también provoca un gran número de efectos secundarios, entre estos está la hiperglucemia, hiperinsulinemia por el aumento de síntesis hepática de lipoproteínas y triglicéridos (Espinós-Pérez et al, 2011).

El tratamiento con FARMES es asociado a alteraciones hematológicas como hemorragias, hematomas; reacciones adversas que pueden poner en riesgo la vida del paciente. Algunos de estos fármacos son: cloroquina, metotrexato, sulfasalacina, entre otros (OMS, 2018).

Tratamiento alternativo

Hoy día el interés por las sustancias antiinflamatorias de origen vegetal va en aumento, gracias a que ofrecen ventajas, como la baja incidencia de efectos adversos en relación a los antiinflamatorios clásicos. Actualmente el uso de plantas en el tratamiento de enfermedades antiinflamatorias o como fuente de compuestos químicos con actividad biológica ha ido en aumento. Por lo que en el presente trabajo se propone a *Salvia Ballotiflora* la cual se usa en la medicina tradicional en el estado de San Luis Potosí para tratar problemas relacionados con la inflamación.

En México, el género *Salvia* es el segundo género con más especies. El nombre de *Salvia* proviene de la palabra salvar. Estas plantas han sido usadas como ornamentales, con propósitos culinarios y aromáticos, así como tratamiento de diferentes enfermedades. Actualmente existen estudios sobre los efectos farmacológicos de las plantas del género *Salvia*, tales como: el efecto antiinflamatorio, antinociceptivo, antibacterial, hipoglucémico, antihipertensivo, entre otros. (Campos-Xolalpa et al, 2018).

Generalmente de estas especies se aíslan flavonoides, compuestos esteroidales, triterpenos, fenólicos, entre otros. Sin embargo, los metabolitos secundarios de interés para este estudio son los compuestos diterpénicos. Existen estudios previos del aislamiento de cuatro diterpenos y posterior a esto fueron evaluadas diferentes actividades.

Salvia ballotiflora Benth



Figura 1. Planta fresca de *Salvia ballotiflora*. Imagen tomada de: https://www.wildflower.org/gallery/result.php?id_image=55933

Clasificación Taxonómica

Reino: *Plantae*

División: *Tracheophyta*

Clase: *Magnoliopsida*

Orden: *Lamiales*

Familia: *Labiatae*

Género: *Salvia*

Especie: *Salvia ballotiflora*

Salvia ballotiflora es una planta perenne del norte de México y del sur de Estados Unidos perteneciente a la familia de las lamiáceas. También es conocida como: “Arbusto Salvia azul” o “mejorana” Es usada en la medicina tradicional mexicana para aliviar los síntomas posparto (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2013). Fue descrita por George Bentham y su distribución en México incluye los estados de Coahuila, Durango, Hidalgo, Nuevo León, Zacatecas y San Luis Potosí.

El crecimiento de estos arbustos alcanza una altura de 1.2-1.8 m. Sus hojas son ovaladas y miden de 1.5 a 3.8 cm de largo, presentan márgenes ondulados o dentados con tricomas sobre las superficies superior e inferior, dando una textura áspera. Las flores de *S. ballotiflora* son de color azul púrpura con una longitud menor a 1.3 cm, las cuales florecen a partir de abril hasta octubre.

En 2013, fue evaluada la actividad antiidiarreica de 19-desoxietona que fue aislado de *Salvia ballotiflora* (Pérez-Gutiérrez et al, 2013). En 2017, fue evaluada la actividad

citotóxica de cuatro diterpenos aislados de *Salvia ballotiflora*: 19- deoxicetexona (DEOX), 7, 20- dihidroanastomosina (DAM), Ictetexona (ICT) y 19-deoxiisocetexona (DIC) (Campos-Xolalpa, et al, 2017), así como las actividades antiproliferativas, antiinflamatorias, entre otras, de once diterpenoides (Esquivel et al, 2017).

En el presente estudio se evaluó la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto clorofórmico de *S. ballotiflora* así como de uno de los compuesto aislados.

Objetivos:

General:

- Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico de *Salvia ballotiflora* Benth y cuatro de sus compuestos aislados.

Específicos:

- Determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto clorofórmico de *S. ballotiflora*.
- Determinar el posible mecanismo de acción del extracto clorofórmico y de los cuatro diterpenos aislado de *S. ballotiflora*.
- Evaluar la actividad antiartrítica *in vitro* del extracto y de los cuatro compuestos aislados de *S. ballotiflora*.

Material y métodos

Material vegetal

Salvia ballotiflora fue colectada en el mes de agosto del 2017 en el cerro de Las Comadres, en el municipio de Guadalcazar, Estado de San Luis Potosí, México. Se podaron las partes aéreas de la planta: flor, hojas y tallos, la planta fue autenticada por el taxónomo José García Pérez y un espécimen (SLPM43014) fue depositado en el herbario Isidro Palacios de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Preparación del extracto

Las partes colectadas de la planta de *Salvia ballotiflora* se dejaron secar a la sombra y a temperatura ambiente y posteriormente fueron molidas. En un matraz de fondo redondo se colocaron 564.8 g y 3.8 L de cloroformo. La mezcla se calentó a temperatura de ebullición durante 4 h, posteriormente se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida. Al producto obtenido se le realizó un lavado con hexano (ECL) y se eliminó el disolvente remanente.

Separación del extracto

El extracto clorofórmico fue separado por cromatografía en columna abierta empacada con sílica gel 60, como fase estacionaria, y como fase móvil n-hexano, la polaridad se fue incrementando con acetato de etilo. De las fracciones obtenidas se recuperaron los sólidos precipitados y una vez purificados fueron identificados por Resonancia Magnética Nuclear (RMN). Se siguió la metodología empleada en 2016 por Campos-Xolalpa.

Evaluación de actividad antiinflamatoria in vivo

Animales de experimentación

Los animales que se usaron para las pruebas *in vivo* fueron ratones macho de la cepa CD-1 de 25 a 30 g. Los cuales fueron proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Xochimilco. Los animales contaban con alimento LabDiet y agua *ad libitum*. Se mantuvieron con periodos de exposición a la luz/oscuridad de 12 horas y temperatura de 20-22 ° C. La manipulación de los roedores fue de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, específicamente en las técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Inflamación aguda

Se evaluó la actividad inflamatoria en edema auricular agudo en ratones inducido por 13-acetato de 12-O-decanoliforbol (TPA). Se usó la técnica descrita por De Young et al. 1989, en el cual una solución de 2.5 µg de TPA por ratón en 20 µL de acetona, se aplicó por vía tópica en la parte exterior e interior de la oreja derecha de los ratones (10 µl en cada lado). Después de 30 minutos de la aplicación de TPA, se administraron 2 mg por oreja del tratamiento de prueba (ECL y DEOX) e indometacina como referencia a la misma dosis. Seis horas posteriores a la administración de TPA, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, se obtuvieron círculos de 6 mm de diámetro tanto de la oreja derecha como de la izquierda. La inflamación se cuantificó como edema por diferencia de peso entre las dos orejas. La actividad antiinflamatoria se evaluó como el porcentaje de la inhibición del edema de las orejas de los ratones con tratamiento, comparados con el grupo control.

El porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente fórmula:

Fórmula 1

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(Ct - C0)_{\text{control}} - (Ct - C0)_{\text{tratado}}}{(Ct - C0)_{\text{control}}} \times 100$$

Donde Ct es el peso de la oreja con el tratamiento y C0 el peso de la oreja con el vehículo.

Inflamación crónica:

Se evaluó mediante el modelo de edema auricular crónica en ratones, producido por la aplicación tópica múltiple de TPA. El edema auricular se indujo de igual manera que en el modelo agudo, aplicando TPA y los tratamientos 5 veces, cada 48 h. La dosis de indometacina fue de 8 mg/kg y de ECL fue de 12.5, 25 50 y 100 mg/kg, los tratamientos se administraron por vía oral. Los animales se sacrificaron al finalizar el tratamiento y de igual manera, se obtuvieron discos de 6 mm de diámetro de ambas orejas y se pesaron. La diferencia de peso entre las orejas se tomó como expresión del edema. Se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula 1.

Evaluación de actividad antiinflamatoria *in vitro*

Evaluación de Viabilidad

Se empleó la línea celular de macrófagos (J774A.1), la cual se creció en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), penicilina 100 UI/ml y estreptomycinina 100 µg/ml y se incubó a una temperatura de 37 ° C en una atmósfera de 5% de CO₂.

Posteriormente, se desechó el medio de la caja de cultivo y se enjuagó con 1 mL de solución amortiguadora de sales de fosfatos (PBS). Se dejó incubar nuevamente por 5 min con 1 mL de tripsina 0.05%, posteriormente se le adicionaron 500 µL de DMEM y se suspendieron para poder trasvasar a un tubo Eppendorff y se centrifugó a 5000 rpm por 5 min y se decantó el sobrenadante. El paquete celular fue resuspendido en 1 mL de medio para realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer y seguido a esto, colocar 100 µL en cada pozo de la placa de cultivo (de 96 pozos). Cada pozo contenía 5000 células. La placa se dejó incubar a 37 ° C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. Transcurridas las 24 horas, se colocaron los tratamientos siguientes:

- Grupo control: células con vehículo.
- Grupos de prueba: células tratadas con ECL a diferentes concentraciones (100, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 3 y 1 µg/ mL).

Después de 24 horas de incubación con el tratamiento, se agregaron 10 µL de una solución de MTT (Bromuro 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-ilo)-2, 5 difeniltetrazol) a una concentración de 5 mg/mL. Se dejó incubar la placa de 1 a 2 horas hasta la formación

de cristales de formazán. Enseguida, se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 µL de Dimetil Sulfóxido (DMSO) para solubilizar los cristales previamente formados. Finalizado el procedimiento se determinó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm (Mosmann, 1983). El porcentaje de viabilidad se obtuvo con lo siguiente:

Fórmula 2

$$\% Viabilidad = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

Determinación de óxido nítrico

Para la determinación de NO, fueron sembradas 500 000 células/pozo en cajas de 6 pozos, se dejaron incubar por 24 h. Posteriormente se colocaron los tratamientos a los diferentes grupos formados: 1) LPS (5 µg/ mL), 2) Indometacina (50 µM) + LPS (5 µg/ mL) y 3) ECL (10 µg/mL) + LPS (5 µg/ mL) 4) DEOX (20 µg/mL) + LPS (5 µg/ mL) (por triplicado), y se incubaron por 24 h. Terminado el tiempo se colectó el sobrenadante En una placa de 96 pozos se colocaron 100 µL del sobrenadante de cada grupo (Basal, LPS, IND, ECL y DEOX), posteriormente a cada pozo se le agregaron 100 µL de reactivo de Griess. La placa se incubó a 37° C durante 30 minutos, una vez transcurrido el tiempo se determinaron las absorbancias en un lector de ELISA a 540 nm. El porcentaje de óxido nítrico de cada grupo fue calculado a partir de considerar el 100% al grupo de LPS.

Modelo de AR: Protección a la desnaturalización de proteína.

Para la evaluación *in vitro* de la actividad antiartrítica se usó el método de protección a la desnaturalización de proteínas de suero fetal bovino (Rahman y col., 2015). Se preparó una solución acuosa de albúmina de suero fetal bovino al 5% p/v (Sa) y se formaron los siguientes grupos: 1) Diclofenaco como fármaco de referencia, 2) ECL extracto de prueba y 3) Agua destilada como control. En tubos de ensayo se colocaron 0.450 mL de Sa y se adicionó 0.050 mL de los tratamientos correspondientes de cada grupo. Las concentraciones de diclofenaco y de ECL fueron de 25, 50, 100, 200, 500, 750 y 1000 µg/mL. Posteriormente se ajustó el pH a 6.3 con HCl 0.1 N. Las muestras se incubaron a 37 °C durante 20 min, terminado el tiempo se incrementó la temperatura a 57 °C durante 3 min. Transcurrido el tiempo se dejó enfriar las muestras y se agregaron 2.5 mL de buffer de fosfatos. La absorbancia se midió utilizando un espectrofotómetro UV-Visible a 560 nm. El grupo control representa 100% de desnaturalización de proteínas. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteínas se calculó con la siguiente formula:

Fórmula 3

$$\% \text{ Inhibición} = \left(\frac{\text{Abs muestra} - \text{Abs control}}{\text{Abs control}} \right) 100$$

Resultados y discusión

Se obtuvo un extracto clorofórmico lavado con hexano (ECL) con un rendimiento de 2.28% con respecto a la planta seca y molida, valor similar al obtenido en estudios previos (1.82 %) (Campos-Xolalpa, 2016).

Extracción y aislamiento de diterpenos

ECL se separó por cromatografía en columna y se obtuvieron 35 fracciones. En la tabla 1 se muestran las fracciones obtenidas con su respectiva polaridad y los sólidos obtenidos en cada una de ellas.

Tabla 1.- Fracciones obtenidas de la separación cromatográfica de ECL

Fracción	Polaridad (hexano-acetato de etilo)	Sólidos	Nombre del compuesto	Rendimiento con respecto a la planta seca y molida
1-4	95-5 %	Nss	Nss	-----
5-9	90-10 %	Compuesto naranja	19-deoxiicetexona (DEOX)	0.0043 %
10-11	90-10 %	Mezcla de compuesto amarillo y naranja	DEOX y DAM	_____
12-16	85-15 %	Compuesto amarillo	7,20-dihidroanastomosina (DAM)	0.002%
17-20	85-15 % 80-20 %	Nss	Nss	_____
17-21	75-25 %	Compuesto amarillo	19-deoxiisocetexona (DIC)	0.003%
22-26	80-20 %	Compuesto naranja	Icetexona (ICT)	0.0009%
27-35	75-25 % 70-30 % 50-50 %	Compuesto blanco.	Mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico (MAUO)	0.0044 %

Nss: No se precipitó sólido.

Los cristales naranjas fueron obtenidos a partir de la fracción con hexano-acetato de etilo (90:10, v/v), compuesto que fue determinado como DEOX; de la fracción con hexano-acetato de etilo (85:15 v/v) se obtuvieron cristales amarillos identificados como DAM; el sólido amarillo, identificado como DIC fue obtenido a partir de la fracción de hexano-acetato de etilo (75:25 v/v), a partir de la fracción de hexano-acetato de etilo (80:20 v/v) fue obtenido ICT. Las estructuras de estos compuestos se corroboraron por Resonancia Magnética Nuclear (Figura 2) en 2016 por Campos-Xolalpa y a su vez comparados con los espectros obtenidos por Esquivel y col., (1997).

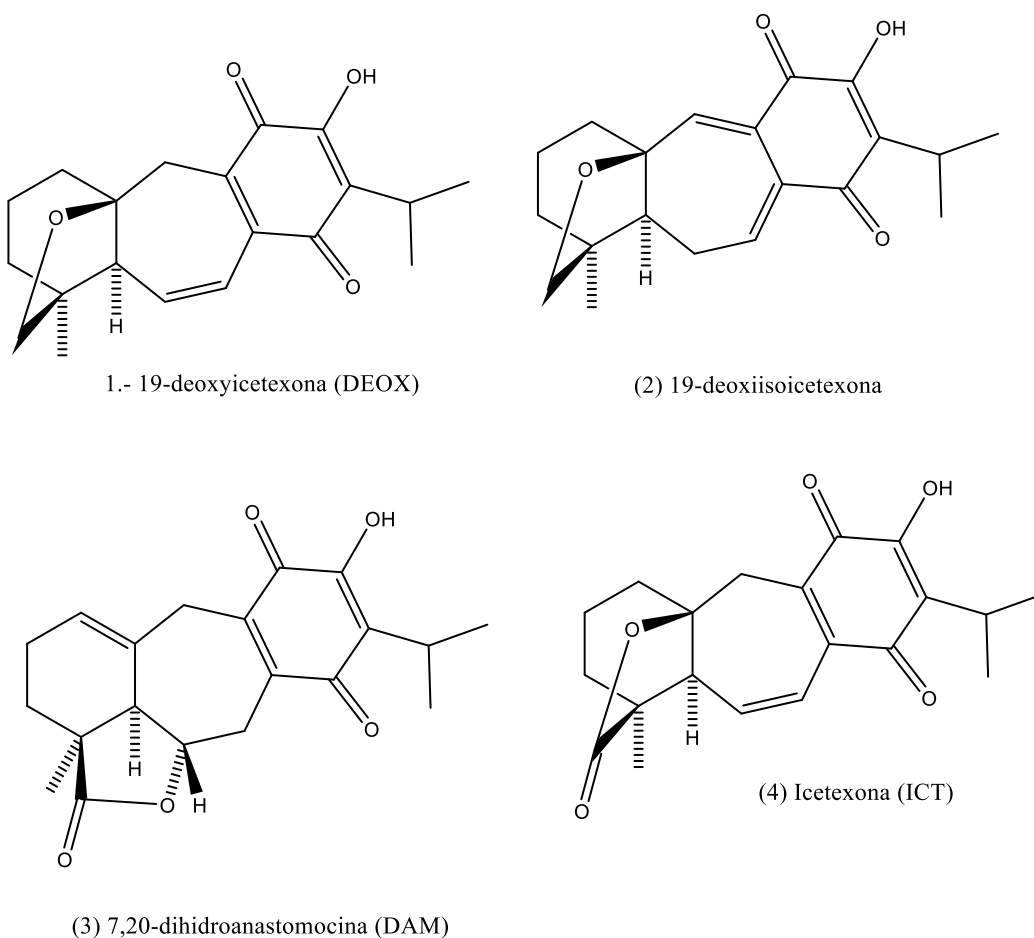


Figura 2.- Estructura química de los diterpenos aislados del ECL.

Las salvas presentan una composición con abundantes metabolitos de naturaleza diterpénica y triterpénica, derivados del ursano y oleanano, por lo que también se encontró una mezcla ácido ursólico y ácido oleanólico (MAUO) en la separación (Ortega et al, 2002) como se muestra en la tabla 1.

Los sólidos obtenidos presentaron un bajo rendimiento, esto fue una limitante para su evaluación, por ende, se continuó evaluando la actividad antiinflamatoria solo del extracto y DEOX solo en el modelo agudo.

Evaluación de toxicidad *in vivo*.

Previo a la evaluación de la actividad antiinflamatoria aguda y crónica, se determinó la toxicidad de ECL en ratones machos CD-1 con peso de 20 a 25 g. Se probaron las dosis de 400 a 5000 mg/Kg. En la tabla 2 se muestran los daños causados por las diferentes dosis de ECL en: estómago, hígado, bazo y riñones del ratón.

Tabla 2.- Toxicidad *in vivo* de ECL a diferentes dosis

Dosis (mg/kg)	Ratones muertos	Daño de órgano			
		Estómago	Hígado	Bazo	Riñones
400	0 de 10	SD	SD	SD	SD
625	0 de 10	SD	SD	RO	SD
800	0 de 10	SD	SD	RO	DO
950	0 de 10	SD	SD	RT	DO
1000	0 de 10	SD	SD	RO	DO
1250	0 de 10	SD	RO	DO	DO
2500	5 de 10	SD	RO	DO	DO
5000	4 de 10	SD	RO	DO	DO

SD: Sin daño

RO: Rojizo

DO: Dañado

RT: Reducción de tamaño

Con las dosis de 625 a 5000 mg/kg, se presentó daño en la mayoría de los órganos, a excepción del estómago. A partir de la dosis de 2500 mg/kg murió la mitad del grupo en estudio, pero a partir de la dosis de 400 mg/kg no se mostró algún daño en los órganos evaluados. Por lo tanto, se determinó la evaluación de la actividad antiinflamatoria crónica con dosis menores de 400 mg/kg.

Evaluación de actividad antiinflamatoria *in vivo*

Edema auricular agudo inducido por TPA

Se determinó la actividad antiinflamatoria aguda de ECL por el modelo de edema auricular inducido por TPA. En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos con indometacina, ECL, DEOX y vehículo.

Tabla 3.- Actividad antiinflamatoria aguda de ECL.

Grupo	Dosis (mg/oreja)	% de inhibición
Vehículo	0	0
Indometacina	2	88.35 ± 6.36
ECL	2	84.01 ± 6.63 ^{NS}
DEOX	2	68.83 ± 12.65

Media ± EE (n=8), NS. p>0.05, comprado con el grupo Indometacina.

ECL disminuyó el edema 84.01 ± 6.63 % al compararse como el control positivo (88.35 ± 6.36), se encontró que no hay diferencia significativa entre los dos grupos (p>0.05).

Es importante señalar que DEOX presentó actividad antiinflamatoria, sin embargo, fue menor comparada con ECL e indometacina.

Edema auricular crónico inducido por múltiples aplicaciones de TPA

En el modelo de edema auricular en ratón inducido por múltiples aplicaciones de TPA los ratones fueron tratados con ECL a diferentes dosis (tabla 4). El porcentaje de inhibición de inflamación obtenido con ECL a la dosis de 100 mg/kg no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con respecto al grupo de indometacina. La dosis efectiva media fue de 45.33 mg/kg.

Tabla 4.- Actividad antiinflamatoria de ECL en edema auricular inducido por múltiples aplicaciones.

Grupo	Dosis mg/kg	% de inhibición de inflamación
Vehículo	0	0
Indometacina	8	64.32 ± 2.47
ECL	12.5	26.43 ± 7.12
	25	30.07 ± 2.41
	50	53.28 ± 2.21
	100	62.71 ± 2.30 ^{NS}

Media ± EE (n=8), Ns. $P > 0.05$, comprado con el grupo Indometacina

Al ser aplicado de forma tópica, el TPA inicia la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la fosfolipasa A₂, además de la producción de mediadores que intervienen en el efecto inflamatorio (García et al, 2004). De acuerdo con los resultados obtenidos, ECL probablemente interviene en la inhibición de PCK y A₂, lo que podría indicar su efecto en la reducción del edema auricular.

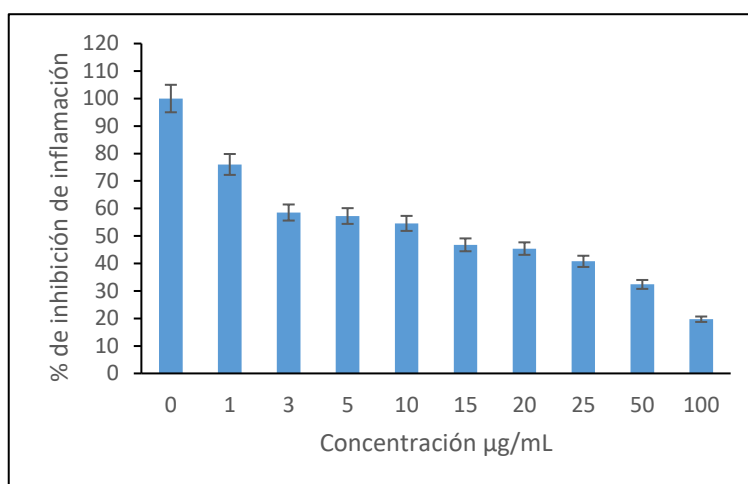
De acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que ECL muestra actividad antiinflamatoria en modelo agudo y crónico, por lo tanto, se continuó con la evaluación de la actividad antiinflamatoria en modelos *in vitro*, con la finalidad de conocer un posible mecanismo de acción de ECL.

Basado en los resultados obtenidos podemos sugerir que tanto ECL y DEOX inhiben la producción de mediadores proinflamatorios, lo que nos sugirió hacer la evaluación *in vitro*.

Viabilidad de macrófagos tratados con ECL

Se evaluó la viabilidad de células J774 A.1 (macrófagos de murino) tratados con ECL. La evaluación de la viabilidad tiene la finalidad de conocer la concentración de ECL necesaria para llevar a cabo la cuantificación de citocinas proinflamatorias.

El método de reducción de la sal de tetrazoilo (MTT) indica una buena función de la membrana celular y la capacidad metabolizadora debido a que en las células vivas se rompe el anillo tetrazolilo por acción de las deshidrogenasas mitocondriales formando cristales de formazán color azul-violeta, solubles en dimetilsulfóxido (DMSO). La concentración celular es directamente proporcional la producción de formazán (Mosmann, 1983).



Gráfica 1. Viabilidad de Macrófagos tratados con ECL. (Media \pm error estándar, (n=10) del al menos tres experimentos.)

La viabilidad de ECL fue evaluada a diferentes concentraciones: 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$, como se muestra en la gráfica 1. La concentración inhibitoria del 50 % de la población (CI_{50}) de ECL fue de 14.23 ± 0.75 , por lo tanto, para la cuantificación de óxido nítrico se usó una concentración de 10 y de 15 $\mu\text{g/mL}$ de ECL y DEOX respectivamente.

Tabla 5.- Viabilidad de macrófagos tratados con ECL.

Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% Viabilidad
0	100
1	76.02
3	58.54
5	57.26
10	54.57
15	46.78
20	45.41
25	40.77
50	32.38
100	19.71

Determinación de óxido nítrico

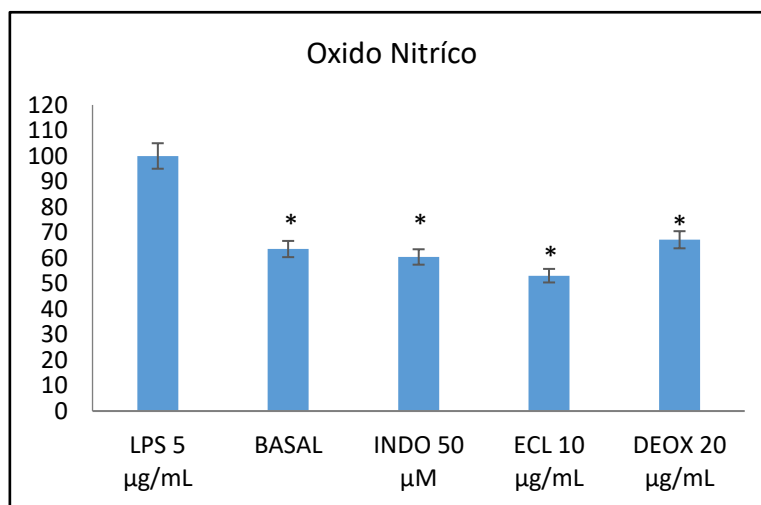
El óxido nítrico es secretado por células endoteliales, células neuronales y por macrófagos durante el mecanismo de inflamación. La determinación del porcentaje de óxido nítrico (NO) se obtuvo en macrófagos estimulados con LPS, esto simula el inicio de un proceso inflamatorio. Por lo tanto, el grupo tratado con LPS se considera el grupo con el mayor nivel de NO, ya que la producción incontrolada de este puede producir vasodilatación, proceso involucrado en diversas enfermedades inflamatorias (Silvia et al, 2011).

Tabla 6.- Determinación de óxido nítrico

Grupo	%
LPS 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$	100
Basal	63.52
INDO 50 μM	60.41
ECL 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	53.07 <i>Ns</i>
DEOX 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$	67.15 <i>Ns</i>

Media \pm EE (n=3), *Ns.* $P>0.05$, comprado con el grupo Indometacina

Se realizó un análisis de varianza que muestra que la diferencia entre los grupos es significativamente alta ($p < 0.05$).



Gráfica 2. Porcentaje de óxido nítrico producido por macrófagos estimulados con LPS tratados con Indometacina (INDO), ECL y el DEOX. (Media del Porcentaje de promedio ($n=3$); Comparación de LPS con los grupos, $*p < 0.05$; Comparación de INDO con los grupos ECL y DEOX, $^{NS} p > 0.05$)

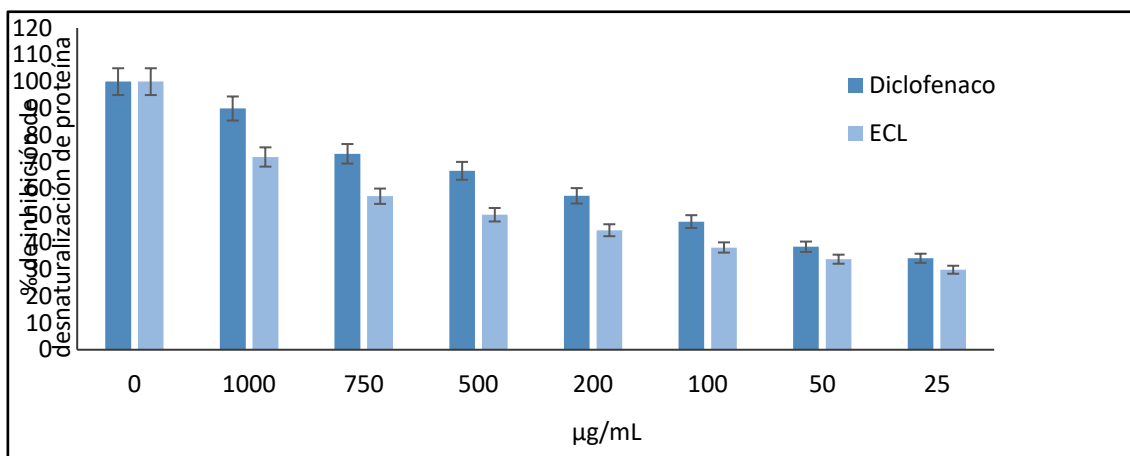
En la gráfica 2 se observa los porcentajes de óxido nítrico producido en los tres grupos prueba, por lo que se sugiere que tanto el fármaco de referencia como ECL y DEOX disminuyen la producción de óxido nítrico y por lo tanto la vasodilatación celular, además de que al realizarse la comparación entre los grupos se encontró no hay diferencia significativa ($p > 0.05$) entre los grupos ECL y DEOX comparados con el grupo indometacina.

Evaluación de la actividad antiartrítica *in vitro*

La artritis es una enfermedad autoinmune que implica la inflamación de una o más articulaciones, lo que conlleva a producir dolor, rigidez y hasta la pérdida de la función de la articulación. Se ha reportado que en la artritis reumatoide hay desnaturalización de las proteínas y la producción de auto-antígenos puede ocurrir por este proceso. El mecanismo de desnaturalización probablemente sea por la alteración de la unión electrostática de hidrógeno y de los enlaces disulfuro (Arya et al, 2014).

En la gráfica 3 se muestra el porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteína por calor, tratada con Diclofenaco (DICLO) y ECL a diferentes concentraciones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se encontró que el porcentaje de protección de proteína expuesta a ECL y DICLO se incrementó conforme aumentó la concentración. Como se observa en la gráfica 3, a partir de la concentración de 750 y 1000 µg/mL de ECL la protección fue del 57.26 y 71.89 % respectivamente y la inhibición es similar a la obtenida con DICLO.



Gráfica 3.- Inhibición de la desnaturalización de albúmina al 5% por Diclofenaco y ECL de 25 µg/mL a 1000 µg/mL. (Media del porcentaje de inhibición (n=3) ± el error estándar, de tres experimentos independientes).

Los resultados reportados aportan evidencia para continuar con el estudio en busca de compuestos naturales con actividad antiinflamatoria, con el propósito de ofrecer fármacos alternativos a los ya existentes. Sin embargo, todavía falta mucho recorrido para poder alcanzar ésta última meta.

Conclusiones

ECL y DEOX presentaron actividad antiinflamatoria en modelos *in vivo* e *in vitro*.

Además, ECL presentó actividad antiartrítica, ya que demostró tener una actividad protectora de la desnaturalización de proteínas.

Bibliografía

- Arya, D., Meena, M., Grover, N., & Patni, V. (2014). *In vitro* anti-inflammatory and anti-arthritis activity in methanolic extract of *Cocculus hirsutus* (L.) diels. *In vivo* and *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 1957-1962. Recuperado en Noviembre de 2019, de <https://pdfs.semanticscholar.org/c8d5/d4f660c15dbbae6dce27577ee803f54f481a.pdf>
- Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. (2013). *Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana*. Recuperado en Octubre 2019, de Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana: <http://www.medicinatradicional.unam.mx>
- Campos-Xolalpa, Nimsi. (2016). Evaluación de la actividad citotóxica de compuestos aislados de *Salvia ballotiflora* Benth (Lamiaceae). Tesis de Maestría, UAM-X. Recuperado en Noviembre de 2019
- Campos-Xolalpa, Nimsi., Alonso-Castro, Ángel Josabad., Sánchez-Mendoza, Ernesto., Zavala-Sánchez, Miguel Ángel., Pérez-Gutiérrez, Salud (2017). Cytotoxic activity of the chloroform extract and four diterpenes isolated from *Salvia ballotiflora*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27, 302-305.
- Campos-Xolalpa, N., Pérez-Gutiérrez, S., Pérez-González, C., Mendoza-Pérez, J., & Alonso-Castro, A. J. (2018). Terpenes of the Genus *Salvia*: Cytotoxicity and Antitumoral Effects. En *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements*. Springer Nature Singapore, 163-205.
- Cárdenas, J., & Rodríguez Hahn, L. (1995). Abietane and iceteane diterpenoids from *Salvia candicans*. *Phytochemistry*, 199-204.
- Chakraborty, A. D. (2004). Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. *Indian Journal Pharmacol*, 36, 148-150.
- Cosío, B. G. (2005). Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol*, 1(41), 34-41.
- Dal Pra, Valeria., B. Bisol, Lais., Detoni, Suelen Detoni, Marjorie Denti., Grando, Jaine., Pollo, Camila., R. PAsqualiu, Tiago., Hoffmann, Arno Ernesto., MAzutti, Marcio A. & Macedo, Sandra M. (2011). Anti-inflammatory activity of fractionated extracts of *Salvia officinalis*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 7(1). Recuperado en Octubre de 2019, de www.jaonline.com, 67-71.
- De Young, L. K. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, 26(3-4), 335-341.
- Delves-J., P., Martin-J., S., Burton-R., D., & Roitt-M., I. (2014). *Inmunología. Fundamentos* (12a ed.). España: Médica Panamericana.
- Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM). (2014). *Stevia tomentosa* Kunth, *ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares*. (UNAM, Editor) Retrieved Marzo 2018, from <http://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:1294864>
- Domínguez, L. H. (2012). Tratamientos farmacológicos contra alternativos en el manejo de pacientes con artritis reumatoide. *Revista mexicana de ciencias farmacéuticas*, 2(43), 23-30.

- Domínguez, X. A. (1976). Mexican medicinal plants XXIX. Three new diterpene quinones from *Salvia ballotaeflora*. *Planta medica*, 7(30), 237-241.
- Espinós-Pérez, D., López-Buenacicha, A., & Calvo-Manuel, E. (2011). Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia(XV)*, 237-286. Obtenido de Real Academia Nacional de Farmacia.
- Esquivel, B., Calderón, J., Flores, E., Sánchez, A. A., Rivera, R. R. (1997). Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotaeflora* and *Salvia axillaris*. *Phytochemistry*, 46(3), 531-534.
- Esquivel, B. (2017). *Contribución al estudio químico sistemático del género Salvia (Lamiaceae) en México*. Tesis doctoral, UNAM, Instituto de Química, México. Recuperado el Octubre de 2019
- Esquivel, B., Burgueño-Tapia, E., Bustos-Brito, C., Pérez-Hernández, N., Quijano, L., & Joseph-Nathan, P. (2018). Absolute configuration of the diterpenoids icetexone and conacytone from *Salvia ballotaeflora*. *Chirality*, 30, 177-188.
- Esquivel, B., Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Nieto-Camacho, A., Ramírez-Apan, T., Joseph-Nathan, P., & Leovigido-Quijano. (2017). Estructura, configuración absoluta y actividad antiproliferativa de los diterpenoides de abietano e icetexano de *Salvia ballotiflora*. *Molecules*, 22(10).
- Esquivel, B., Bustos-Brito, C., Sánchez-Castellanos, M., Nieto-Camacho, A., Ramírez-Apan, T., Joseph-Nathan, P., & Quijano, L. (2017). Structure, Absolute Configuration, and Antiproliferative Activity of Abietane and Icetexane Diterpenoids from *Salvia ballotiflora*. *Molecules*, 10(22). Obtenido de <https://www.mdpi.com/1420-3049/22/10/1690>
- Esquivel, B., Calderón, J.-S., Flores, E., Sánchez, A.-A., & Rosas-Rivera, R. (1997). Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotaeflora* and *Salvia axiallaris*. *Phytochemistry*, 46(3), Recuperado en Octubre 2019, 531-534.
- Esquivel-Rodríguez, B., & Sánchez. (2005). Diterpenoides de icetexano reordenados de las raíces de *Salvia thymoides* (Labiatae). 19(4).
- Freshney, I. (2000). *Culture of animals cells: a Manual of asic Technique* (Cuarta edición ed.). Jonh Wiley and Sons Inc.
- García- López, E. B. (2016). *Evaluación de la actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones de macroalgas de Baja California Sur, México*. Tesis de Maestría , Instituto Politécnico Nacional, CICIMAR-IPN, La paz.
- García, M. D. (2004). Antinociceptive and antiinflammatory effect of the aqueous extract from leaves of pimienta racemosa var ozua (Mirtaceae). *Journal of Ethnopharmacology* (91), 69-73.
- Gómez Estrada, H. A., & Domingo Medina, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3). Recuperado en Agosto de 2019, de www.redalyc.org/articulo.oa?id=85618379003, 182-217.
- Imaizumi, T. A. (2008). Involvement of retinoic acid-inducible gene-I in inflammation of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes. *Clinical & Experimental Immunology* , 153, 240-244.

- Licastro, F. C. (2005). Innate immunity and inflammation in ageing: a key for understanding age-related diseases. *Immunity & Ageing*, 2, 8.
- Madigan, M. T. (2015). *Brock. Biología de los microorganismos* (14a ed.). España: Pearson.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Organización Mundial de la Salud. (2013). *Estrategia de OMS sobre medicina tradicional 2014-2023*. China: Organización Mundial de la Salud.
- Ortega Hernández-Agero, T., Carretero Accadame, M. E., & Villar del Fresno, Á. (Julio-Agosto de 2002). Salvia Fitoquímica. farmacología y terapéutica. *Farmacia profesional*, 16(7). Recuperado en Octubre de 2019, de <https://www.elsevier.es/es-revista-farmacia-profesional-3-pdf-13034818>, 60-63.
- Ospina, L. F. (2000). Estudio de la actividad antiinflamatoria de una benzoquinona de origen natural: Rapanona. *Tesis doctoral*.
- Payá, M. F. (1993). Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*, 7, 159-162.
- Pérez-Gutiérrez, S. Z.-M.-M.-M.-G.-M. (2013). Antidiarrheal activity of 19-deoxycetexone isolated from *Salvia ballotiflora* Benth in mice and rats. *Molecules*, 8(18), 8895-8905.
- Pérez-Gutiérrez, Salud., Zavala Mendoza, Daniel., Hernández-Munive, A., Mendoza-Martínez, Ángel Josabad., Pérez-González, Cuahemoc., & Sánchez-Mendoza, Ernesto. (2013). Antidiarrheal Activity of 19-Deoxycetexone Isolated from *Salvia ballotiflora* Benth in Mice and Rats. *Molecules*, 18(8), 8895-8905.
- Rahman, H., Chinna-Esaraiah, M., & Dutta, A. M. (2015). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritis Activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, 1(15), 115-121.
- Robbins, & Cotran. (2010). *Patología estructural y funcional. Capítulo: Inflamación aguda y crónica* (8a edición ed.). España: Elsevier.
- Santillán, L. D.-U. (2012). *Ciencia UNAM*. Obtenido de Ciencia UNAM: http://ciencia.unam.mx/leer/97/El_uso_tradicional_de_las_plantas_medicinales_un_aporte_para_la_ciencia
- Sen, S., Chakraborty, R., Sridhar, C., Reddy, Y. S., & De, B. (2010). Free radicals, Antioxidants, diseases and phytomedicines: current status and future prospect. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 3(21), 91-100.
- Serrano Vega, J. R. (2015). Estudio químico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos orgánicos de *Senna crotalarioides* Kunth. *Tesis de Maestría*. Recuperado en Octubre de 2019
- Sughisita, E. A. (1981). Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *Pharmacobio-dynamics*, 4(8), 565 - 575.
- Vega- Robledo, G. B. (Septiembre-Octubre de 2008). Inflamación. *Rev Fac Med UNAM*, 51(5).
- Villalba Herrera, E. W. (2014). INFLAMACION I. *Rev. Act. Clin. Med [online]*, 43. Obtenido de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_arttext, 2261-2265.

- Winter, C. &. (1957). Effect of alteration in side chain upon antiinflammatory and liver glycogens activities of hydrocortisone esters. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 46(9), 515 - 519.
- Yi-Bing, W., Zhi-Yu, N., Qing-Wen, S., Dong, M., Hiromasa, K., & Yu-Cheng, G. a. (2012). Constituents from Salvia Species and Their Biological Activities. *Medical Reviews*, 5967-6026.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

Alumna: Katia Giovanna Salas Balgañón.

Matrícula: 2143060960

PROYECTO GENÉRICO:

Evaluación de productos relacionados con la salud.

“Determinación de la actividad antiinflamatoria de *Salvia ballotiflora* Benth.”

ETAPA:

Evaluación fármaco toxicológica de compuestos activos.

Asesora: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Asesora: Nimsi Campos Xolalpa

Lugar de desarrollo del proyecto:

Laboratorio de investigación química orgánica y productos naturales, edificio N.
(UIDIS) de la UAM-X

Fecha de inicio: 1 de Octubre del 2018

Fecha de entrega: 9 de Diciembre del 2019

Introducción

El conocimiento de las plantas medicinales es milenario y ha trascendido por generaciones gracias a la tradición. Se considera que nuestros antepasados obtuvieron el conocimiento del uso de las plantas después de distinguir entre las que servían como alimento y aquellas que tenían algún efecto en su organismo, a partir de estos conocimientos empezaron a diferenciarlas y seleccionarlas (Santillán, 2012). La importancia de las plantas medicinales radica en el uso y aplicación de estas como remedio de enfermedades. Por lo que, las plantas han resultado ser una fuente importante para la obtención de compuestos químicos con actividad farmacológica.

En México, uno de los géneros más representativos con mayor número de especies es el género de *Salvia*. Existen aproximadamente 300 especies, de las cuales el 85-88% son endémicas de México (Campos-Xolalpa et al, 2018). Los estudios fitoquímicos de varias plantas del género *Salvia* han llevado al aislamiento de una gran variedad de metabolitos secundarios como esteroides, flavonoides, sesquiterpenoides, diterpenoides, etc. Algunas especies de *Salvia* han sido usadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como artritis, entre otras (Yi-Bing et al, 2012). Sin embargo, los metabolitos secundarios que mejor caracterizan a las plantas del género *Salvia* son los compuestos terpénicos (Cárdenas & Rodríguez, 1995).

En la medicina tradicional, el uso de las plantas medicinales como alternativa en el tratamiento de procesos inflamatorios es una práctica común. Actualmente el interés por sustancias de origen vegetal va en aumento debido a que no son perjudiciales en muchos de los casos.

La inflamación es un padecimiento que es originado por la presencia de algún agente patógeno o por la estimulación de agentes externos que generan una lesión tisular (traumático, tóxicos, isquémicos, autoinmunes, etc.). La inflamación tiene la finalidad de adaptar al organismo a circunstancias normales (Vega- Robledo, 2008), por medio de la activación de una cascada compleja de interacciones bioquímicas y celulares, mediadas por múltiples agentes químicos, que provocan cambios en la microvasculatura (Villalba, 2014). Siendo la inflamación uno de los temas de mayor interés en la clínica ya que se presenta en diferentes enfermedades, es de gran importancia buscar alternativas para el tratamiento de este padecimiento, debido a que los fármacos prescritos con mayor frecuencia presentan efectos adversos, como úlceras gástricas, entre otros (Espinós-Pérez et al, 2011).

Por lo que, en el presente estudio, se evaluó la actividad antiinflamatoria de *Salvia ballotiflora*, también conocida como “mejorana” ya que presenta un perfil favorable para ser propuesta como una alternativa para el tratamiento de la inflamación.

Objetivos:

General:

- Determinar la actividad antiinflamatoria del extracto clorofórmico de *Salvia ballotiflora* Benth y cuatro de sus compuestos aislados.

Específicos:

- Determinar la actividad antiinflamatoria *in vivo* del extracto clorofórmico de *S. ballotiflora*.
- Determinar el posible mecanismo de acción del extracto clorofórmico y de los cuatro diterpenos aislado de *S. ballotiflora*.
- Evaluar la actividad antiartrítica *in vitro* del extracto y de los cuatro compuestos aislados de *S. ballotiflora*.

Material y métodos

Material vegetal. *Salvia ballotiflora* fue colectada en el mes de agosto del 2017 en el cerro de Las Comadres, municipio Guadalcázar, Estado de San Luis Potosí, México. Se realizó una poda ecológica partes aéreas de la planta y fue autenticada por el taxónomo José García Pérez (SLPM43014), espécimen depositado en el herbario Isidro Palacios de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí.

Preparación del extracto. Las partes colectadas de la planta fueron secadas y molidas. La planta molida se dejó a ebullición con diclorometano por 4 h, posteriormente el disolvente fue eliminado y se continuó con un lavado con hexano (ECL) y se eliminó el disolvente remanente.

Separación del extracto. ECL fue separado por cromatografía en columna abierta empacada con silica gel 60, (fase estacionaria) y n-hexano (fase móvil), la polaridad se fue incrementando con acetato de etilo.

Animales de experimentación. Se usaron ratones macho CD-1 de 25 a 30 g. Proporcionados por la UPEAL UAM-X. Fueron expuestos a la luz/oscuridad de 12 h. y a 20-22 ° C con alimento LabDiet y agua *ad libitum*. La manipulación de los roedores fue de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Inflamación aguda. Se usó la técnica descrita por De Young et al. 1989. Una solución de 2.5 µg de 13-acetato de 12-O-decanoliforbol (TPA) en 20 µL de acetona por ratón, se aplicó en la parte exterior e interior de la oreja derecha (10 µl en cada lado). Después de 30 minutos, se administraron 2 mg/oreja de ECL, DEOX e indometacina. 6 h posteriores a la administración de TPA, los ratones fueron sacrificados y se obtuvieron círculos de 6 mm de las orejas. La actividad antiinflamatoria se evaluó como el porcentaje de la inhibición del edema de las orejas de los ratones con tratamiento, comparados con el grupo control, mediante la siguiente fórmula:

Fórmula 1

$$\text{Inhibición (\%)} = \frac{(Ct-C0)_{\text{control}} - (Ct-C0)_{\text{tratado}}}{(Ct-C0)_{\text{control}}} \times 100$$

Donde Ct es el peso de la oreja con el tratamiento y C0 el peso de la oreja con el vehículo.

Inflamación crónica. Se evaluó mediante el modelo de edema auricular en ratones producida por la aplicación tópica múltiple de TPA y los tratamientos 5 veces, cada 48 h. La dosis de indometacina fue de 8 mg/kg y ECL fueron de 12.5, 25 50 y 100 mg/kg, por vía oral. Los ratones fueron sacrificados para obtener discos de 6 mm de diámetro de ambas orejas. La diferencia de peso entre las orejas se tomó como expresión del edema. Se calculó el porcentaje de inhibición con la fórmula 1.

Evaluación de Viabilidad: En cajas de 96 pozos fueron sembradas 5000 células /pozo por 24 h. Posteriormente las células fueron tratadas con ECL a diferentes concentraciones (100, 50, 25, 20, 15, 10, 5, 3 y 1 µg/ mL) por 24 h. Terminado el tiempo se agregaron 10 µL de una solución de MTT (5mg/mL) para que después de 4 h se revelara la placa con 100 µL de DMSO. La placa fue leída en un espectrofotómetro a λ de 540 nm (Mosmann, 1983). El porcentaje de viabilidad se obtuvo con lo siguiente:

Fórmula 2

$$\% Viabilidad = \frac{DO \text{ células tratadas}}{DO \text{ células control}} \times 100$$

Determinación de óxido nítrico (NO). En cajas de 6 pozos fueron sembradas 5x10⁵ células/pozo por 24 h. Posteriormente se colocaron los tratamientos a los diferentes grupos formados: 1) LPS (5 µg/ mL), 2) Indometacina (50 µM) + LPS (5 µg/ mL) y 3) ECL (10 µg/mL) + LPS (5 µg/ mL) 4) DEOX (20 µg/mL) + LPS (5 µg/ mL) (por triplicado), y se incubaron por 24 h. Terminado el tiempo se colectó 100 µL del sobrenadante de cada grupo (Basal, LPS, IND, ECL y DEOX), posteriormente a cada grupo se le agregaron 100 µL de reactivo de Griess. Los grupos fueron incubados por 37° C por 30 minutos, terminado el tiempo se obtuvieron las absorbancias en un espectrofotómetro 540 nm. El % NO de cada grupo se calculó considerando como 100% al grupo de LPS.

Modelo de AR. Se usó el método de protección a la desnaturalización de proteínas de suero fetal bovino (Rahman y col., 2015) Se preparó una solución de albúmina de suero fetal bovino al 5% p/v (Sa) y se formaron los grupos: 1) Diclofenaco, 2) ECL y 3) Agua destilada como control. Se colocaron 0.450 mL de Sa y se adicionaron 0.050 mL de los tratamientos correspondientes de cada grupo. Las concentraciones de diclofenaco y de ECL fueron: 25, 50, 100, 200, 500, 750 y 1000 µg/mL. Posteriormente se ajustó el pH a 6.3 con HCl 0.1 N. Las muestras se incubaron a 37 °C por 20 min, y posteriormente a 57 °C por 3 min. Se dejaron enfriar las muestras y se agregaron 2.5 mL de PBS. Las absorbancias se midieron con un espectrofotómetro UV-Visible a 560 nm. El grupo control representa 100% de desnaturalización de proteínas. El porcentaje de inhibición de la desnaturalización de proteínas se calculó con la siguiente formula:

Fórmula 3

$$\% Inhibición = \left(\frac{Abs \text{ muestra} - Abs \text{ control}}{Abs \text{ control}} \right) 100$$

Resultados y discusión

Obtención del extracto clorofórmico y aislamiento de los compuestos. El rendimiento de ECL obtenido fue de 2.28% con respecto a la planta seca y molida (Campos-Xolalpa, 2016). ECL fue separado por cromatografía en columna abierta y se obtuvieron los compuestos terpénicos en las siguientes fracciones con hexano-acetato de etilo: Fracción de 90:10 v/v, se obtuvo 19-deoxiicetexona (DEOX, 0.0043 %); de la fracción de 85:15 v/v se obtuvo 7,20-dihidroanastomosina (DAM, 0.002%); de la fracción 75:25 v/v se identificó a 19-deoxiisocetexona (DIC, 0.003%) y a partir de la fracción de 80:20 v/v fue obtenida icetexona (ICT, 0.0009%). En las fracciones finales se presentó una mezcla de ácido ursólico y ácido oleanólico (MAUO). Las estructuras de estos compuestos se corroboraron por RMN y fueron comparados con los espectros obtenidos por Esquivel y col., (1997). Por el bajo rendimiento de ECL y los compuestos se continuó evaluando la actividad antiinflamatoria solo con ECL y DEOX en modelo *in vivo* agudo y en modelo *in vitro* (cuantificación de óxido nítrico).

Evaluación de toxicidad *in vivo*. De acuerdo a los resultados se encontró que a dosis de 625 a 5000 mg/kg, se presentó daño en la mayoría de los órganos y a 400 mg/kg no se mostró daño. Por lo tanto, se determinó la evaluación de la actividad antiinflamatoria crónica con dosis menores de 400 mg/kg.

Evaluación de actividad antiinflamatoria por la inducción de edema auricular agudo y crónico inducido por TPA. En la inflamación aguda, ECL disminuyó el edema en 84.01 ± 6.63 %, el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con indometacina (88.35 ± 6.36). Además, DEOX presentó actividad antiinflamatoria, sin embargo, fue menor comparada con ECL e indometacina. Se realizó un análisis de varianza el cual arrojó que no existe una diferencia significativa entre los grupos INDO, ECL y DEOX (Tukey $p > 0.05$). En inflamación crónica se encontró que ECL a 100 mg/kg disminuyó el edema en un 62.71 ± 2.30 % el cual no presentó diferencia significativa ($p > 0.05$) con el grupo indometacina (8 mg/kg). La dosis efectiva media fue de 45.33 mg/kg.

Viabilidad de macrófagos tratados con ECL y DEOX: Al evaluar la viabilidad de células J774 A.1 tratados con ECL (1-100 $\mu\text{g/mL}$), se determinó la concentración de ECL necesaria para la cuantificación de óxido nítrico (NO). La CI_{50} fue de 14.23 ± 0.75 , por lo tanto, para la cuantificación de óxido nítrico se usó una concentración de 10 y de 15 $\mu\text{g/mL}$ de ECL y DEOX respectivamente.

Cuantificación de NO. El NO es secretado por células endoteliales, neuronales y macrófagos en el mecanismo de inflamación. La determinación del porcentaje de NO se obtuvo en macrófagos estimulados con LPS, esto simula el inicio de un proceso inflamatorio. El % de NO producido en cada grupo fue: 63.52 % para Basal, 60.41% en indometacina (50 μM), 53.07 % en ECL y 67.15 % para DEOX. El grupo tratado con LPS se considera el grupo con el mayor nivel de NO, ya que la producción incontrolada de este puede producir vasodilatación, proceso involucrado en diversas enfermedades inflamatorias (Silvia et al, 2011). Por lo tanto, ECL y DEOX disminuyen la producción de NO y por lo tanto la vasodilatación celular ($p < 0.05$).

Evaluación de la actividad antiartrítica *in vitro*. Se ha reportado que en la artritis reumatoide se presenta desnaturalización de las proteínas y en consecuencia producción de auto-antígenos. El mecanismo de desnaturalización probablemente sea

por la alteración de la unión electrostática de hidrógeno y de los enlaces disulfuro (Arya et al, 2014). Al realizar la evaluación sobre la protección de la desnaturalización de proteínas tratadas con ECL y diclofenaco, se encontró que el porcentaje de protección de proteína fue mayor conforme aumentó la concentración. A partir de la concentración de 750 y 1000 µg/mL de ECL la protección fue del 57.26 y 71.89 % respectivamente, al realizar la comparación con el grupo de diclofenaco se mostró una inhibición similar a la del grupo ECL.

Conclusiones

ECL y DEOX presentaron actividad antiinflamatoria en modelos *in vivo* e *in vitro*.

Además, ECL presentó actividad antiartrítica, ya que demostró tener una actividad protectora de la desnaturalización de proteínas.

Bibliografía

- Arya, D., Meena, M., Grover, N., & Patni, V. (2014). *In vitro* anti-inflammatory and anti-arthritic activity in methanolic extract of *Cocculus hirsutus* (L.) diels. *In vivo* and *in vitro*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 5(5), 1957-1962. Recuperado en Noviembre de 2019, de <https://pdfs.semanticscholar.org/c8d5/d4f660c15dbbae6dce27577ee803f54f481a.pdf>
- Campos-Xolalpa, Nimsi. (2016). Evaluación de la actividad citióxica de compuestos aislados de *Salvia ballotiflora* Benth (Lamiaceae). Recuperado el Noviembre de 2019
- Campos-Xolalpa, Nimsi., Pérez-Gutiérrez, Salud., Pérez-González, Cuahutemoc., Mendoza-Pérez, Julia., & Alonso-Castro, Ángel Josafad. (2018). Terpenes of the Genus *Salvia*: Cytotoxicity and Antitumoral Effects. En *Anticancer Plants: Natural Products and Biotechnological Implements*. Springer Nature Singapore. 163-205
- Cárdenas, J., & Rodríguez Hahn, L. (1995). Abietane and iceteane diterpenoids from *Salvia candicans*. *Phytochemistry*, 199-204.
- De Young, L. K. (1989). Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*, 26(3-4), 335-341.
- Espinós-Pérez, D., López-Buenacicha, A., & Calvo-Manuel, E. (2011). Bases farmacológicas y tratamiento de la inflamación. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia*(XV), Obtenido de Real Academia Nacional de Farmacia, 237-286.
- Esquivel, B., Calderón, J.-S., Flores, E., Sánchez, A.-A., & Rosas-Rivera, R. (1997). Abietane and icetexane diterpenoids from *Salvia ballotaeflora* and *Salvia axiallaris*. *Phytochemistry*, 46(3), Recuperado en 2019, 531-534.
- García, M. D. (2004). Antinociceptive and antiinflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *pimienta racemosa* var *ozua* (Mirtaceae). *Journal of Ethnopharmacology*(91), 69-73.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological Methods*, 65(1-2), 55-63.
- Rahman, H., Chinna-Esaraiah, M., & Dutta, A. M. (2015). In-vitro Anti-inflammatory and Anti-arthritic Activity of *Oryza sativa* Var. Joha Rice (An Aromatic Indigenous Rice of Assam). *American-Eurasian J. Agric. & Environ*, 1(15), 115-121.
- Santillán, L. DGDC-UNAM. (2012). *Ciencia UNAM*. Obtenido de Ciencia UNAM: http://ciencia.unam.mx/leer/97/El_uso_tradicional_de_las_plantas_medicinales_un_aporte_para_la_ciencia

- Silvia Gomes, D. A., Rico Pires, J., Partata Zuza, E., Rivas Gutiérrez, J. C., Corr ea de Toledo, B. E., Spolidorio, L. C., & Palomari Spolidorio, D. M. (2011). El papel del óxido nítrico en la modulación del proceso inflamatorio de la enfermedad periodontal. *Acta Odontológica Venezolana*, 49(4). Recuperado en Noviembre de 2019, de <https://www.actaodontologica.com/ediciones/2011/4/art-24/>
- Vega- Robledo, G. B. (2008). Inflamación. *Rev Fac Med UNAM*, 51(5).
- Villalba Herrera, E. W. (2014). INFLAMACION I. *Rev. Act. Clin. Med [online]*, 43, Obtenido de http://www.revistasbolivianas.org.bo/scielo.php?pid=S2304-37682014000400004&script=sci_arttext, 2261-2265.
- Yi-Bing, W., Zhi-Yu, N., Qing-Wen, S., Dong, M., Hiromasa, K., & Yu-Cheng, G. a. (2012). Constituents from Salvia Species and Their Biological Activities. *Medical Reviews*, 5967-6026.