

Dr. Luis Amado Ayala Pérez
Director de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud
PRESENTE

Por este medio le informo del término del Servicio Social, cuyos datos son los siguientes :

| | | | | | | | |
|--------------------|-----|-----|------|---------------------|-----|-----|------|
| Fecha de Recepción | Día | Mes | Año | Fecha de Aprobación | Día | Mes | Año |
| | 9 | 5 | 2022 | | 30 | 1 | 2023 |

Datos del Alumno

| | |
|--|--|
| Nombre : Gloria Lizet Romero Rodríguez. | |
| Matrícula : 2183027118 | Licenciatura : Química Farmacéutica Biológica <input type="checkbox"/> |
| Domicilio : 1er Cda. El Mirador 139 Coapa, Villa Quietud, Coyoacán, 04960 Ciudad de México, CDMX | |
| Teléfono : 7551158668 | Celular : 7551158668 |
| Correo Electrónico : | CURP : RORG000825MGRMDLA9 |

Datos del Proyecto

| | | | | | | | |
|---|-------------------------------|-----|------|------------------|-----|-----|------|
| Nombre del Proyecto : Aislamiento de los principios activos antiinflamatorios de Viguiera dentata y evaluación de su mecanismo de acción farmacológico. | | | | | | | |
| Lugar donde se realizó el Servicio Social : Laboratorio de productos naturales. Departamento de Sistemas Biológicos DCBS. | | | | | | | |
| Dependencia : Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco | | | | | | | |
| Entidad Federativa : Distrito Federal | | | | | | | |
| Municipio : Coyoacán | Localidad : Ciudad de México. | | | | | | |
| Fecha de Inicio | Día | Mes | Año | Fecha de Término | Día | Mes | Año |
| | 9 | 5 | 2022 | | 9 | 11 | 2022 |

PARA SER LLENADO POR LOS ASESORES

| | |
|--|--|
| Sector: 1.- Educativo <input type="checkbox"/> | Tipo: 2.- Interno <input type="checkbox"/> |
| Orientación: 6.- Educación y Comunicación <input type="checkbox"/> | |

FIRMAS

Dr. Fernando Rodríguez Ramos. 35133

Asesor Interno
Nombre, firma y No. Económico

Dra. Salud Pérez Gutiérrez. 2212

Asesor Externo
Nombre, firma y No. Económico

Gloria Lizet Romero Rodríguez

Alumno
Nombre, firma

Vo. Bo. de la Comisión
Nombre y firma de la persona que autoriza



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento de Sistemas Biológicos

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

PROYECTO DE SERVICIO SOCIAL

Proyecto Genérico del Departamento de Sistemas Biológicos:

Obtención de materias primas, principios activos, medicamentos y productos biológicos.

Etapas: Extracción de principios activos o sustancias auxiliares a partir de productos naturales.

TÍTULO DEL PROYECTO

“Aislamiento de los principios activos antiinflamatorios de *Viguiera dentata* y evaluación de su mecanismo de acción farmacológico”

Nombre del alumno:

Gloria Lizet Romero Rodríguez

Matrícula:

2183027118

Asesor interno:

Dr. Fernando Rodríguez Ramos

Asesor externo:

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Introducción | 3 |
| 2. Marco teórico | 4 |
| 2.1 Inflamación | 4 |
| 2.2 Clasificación de la inflamación | 4 |
| 2.3 Tratamientos para la inflamación | 5 |
| 2.4 <i>Viguiera dentata</i> y sus características..... | 6 |
| 2.5 El modelo de edema auricular de ratón | 6 |
| 2.6 Patología de las úlceras gástricas..... | 7 |
| 2.7 Compuestos antiinflamatorios derivados de plantas medicinales | 8 |
| 3. Justificación | 9 |
| 4. Objetivo general | 10 |
| 4.1 Objetivos específicos..... | 10 |
| 5. Hipótesis | 10 |
| 6. Metodología | 11 |
| 6.1 Recolección de la planta y preparación de los extractos orgánicos..... | 11 |
| 6.2 Animales de experimentación | 11 |
| 6.3 Evaluación antiinflamatoria en modelo de edema auricular inducido por TPA. | 11 |
| 6.4 Separación y evaluación de las fracciones del extracto. | 12 |
| 6.5 Evaluación de toxicidad aguda | 12 |
| 6.6 Evaluación antiinflamatoria crónica | 13 |
| 6.7 Evaluación de actividad antiulcerogástrica..... | 13 |
| 7. Resultados | 15 |
| 7.1 Evaluación antiinflamatoria de los extractos | 15 |
| 7.2 Separación y evaluación de las fracciones del extracto. | 15 |
| 7.3 Evaluación de toxicidad aguda | 18 |
| 7.4 Evaluación antiinflamatoria crónica | 19 |
| 7.5 Evaluación de actividad antiulcerogástrica..... | 19 |
| 8. Discusión | 21 |
| 9. Perspectivas futuras | 21 |
| 10. Conclusión | 22 |
| Bibliografía | 22 |

1. Introducción

En México las plantas medicinales constituyen uno de los principales recursos terapéuticos y la medicina tradicional se convierte en una alternativa médica eficaz para más de 40 millones de mexicanos. Una planta medicinal es un recurso que se emplea como tratamiento de alguna afección, en donde la parte de la planta empleada puede administrarse bajo diferentes formas, por ejemplo, como infusión, decocción, cataplasma, extracto, entre otras (Hernández et al., 2018). Así mismo, las plantas siguen siendo una fuente primordial en la búsqueda de nuevos fármacos (Waizel & Martinez, 2011).

Viguiera dentata, es una hierba perenne nativa de México, y se encuentra desde el suroeste de los Estados Unidos hasta Honduras. Un estudio etnobotánico previo mostró que *V. dentata* fue reconocida como una de las plantas más importantes de entre las 46 especies más utilizadas en la medicina tradicional de los habitantes de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, México (Canales et al., 2008) y se ha evaluado su actividad antimicrobiana (Canales et al., 2005), sin embargo, no existen estudios acerca de sus propiedades antiinflamatorias.

Los problemas inflamatorios se tratan comúnmente con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y corticosteroides, sin embargo, los efectos secundarios que causan pueden ser de importancia clínica (Pérez-Gutiérrez et al., 2012).

Con base a lo anterior, el objetivo de este proyecto de servicio social fue llevar a cabo el aislamiento de metabolitos con actividad antiinflamatoria presentes en *Viguiera dentata* que pudieran ser utilizados para el desarrollo de nuevos medicamentos.

2. Marco teórico

2.1 Inflamación

La inflamación es una respuesta del organismo ante una lesión o una infección. Es un proceso complejo que involucra a varios sistemas del cuerpo, como el sistema inmunológico, el sistema nervioso y el sistema endocrino. La inflamación se caracteriza por la presencia de calor, enrojecimiento, dolor, hinchazón y pérdida de función en el área afectada. Según Buse y colaboradores, la inflamación puede contribuir al desarrollo de enfermedades crónicas, incluyendo enfermedades cardíacas, diabetes, obesidad, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas, entre otras. La inflamación también juega un papel importante en el proceso de envejecimiento, ya que, con el tiempo, la respuesta inflamatoria crónica puede causar daño a los tejidos y órganos del cuerpo (Buse & Bakris, 2008).

2.2 Clasificación de la inflamación

La inflamación se puede clasificar de acuerdo con diferentes criterios. Una clasificación comúnmente utilizada es la basada en la duración de la respuesta inflamatoria, dividiéndola en inflamación aguda y crónica (Wendie, 2004).

La inflamación aguda se caracteriza por una respuesta rápida y temporal del cuerpo a una lesión o una infección. Los síntomas incluyen calor, enrojecimiento, dolor, hinchazón y pérdida de función en el área afectada. La inflamación aguda es una respuesta normal del cuerpo para protegerse de una lesión o una infección. La inflamación aguda es un proceso transitorio y temporal que se activa para combatir una lesión o infección, y luego se resuelve una vez que la lesión o infección ha sido eliminada (Regal et al., 2015).

La inflamación crónica se caracteriza por una respuesta prolongada y persistente del cuerpo a una lesión o una infección. Los síntomas incluyen los mismos que la inflamación aguda, pero son más leves y pueden ser continuos. La inflamación crónica es el resultado de una respuesta inflamatoria continua o desregulada. Se asocia con una variedad de enfermedades crónicas como enfermedades cardíacas, diabetes, obesidad, enfermedades autoinmunes, enfermedades neurodegenerativas, entre otras. La inflamación crónica se caracteriza por la presencia de citoquinas proinflamatorias y la activación de células inmunitarias, como los linfocitos T y los macrófagos, que causan daño a los tejidos y órganos del cuerpo. En caso

de inflamación crónica o excesiva puede causar daño a los tejidos y órganos del cuerpo, contribuyendo al desarrollo de enfermedades crónicas (Pedersen & Febbraio, 2012).

Otra clasificación utilizada es la basada en la localización de la respuesta inflamatoria, dividiéndola en inflamación sistémica y local. La inflamación sistémica es una respuesta inflamatoria que afecta a todo el organismo. Este tipo de inflamación se caracteriza por la activación de diferentes sistemas del cuerpo, como el sistema inmunológico, el sistema nervioso y el sistema endocrino, para combatir la lesión o la infección. Los signos y síntomas de la inflamación sistémica incluyen fiebre, dolor generalizado, debilidad y fatiga. Es importante mencionar que la inflamación sistémica también se puede presentar en enfermedades autoinmunes, donde el sistema inmunológico ataca a los tejidos del cuerpo propio (Wendie, 2004).

Por otro lado, la inflamación local es una respuesta inflamatoria limitada a un área específica del cuerpo. Este tipo de inflamación se caracteriza por la activación de células inflamatorias y la acumulación de líquido en el área afectada, lo que causa hinchazón, dolor y enrojecimiento en el lugar de la lesión o infección. A diferencia de la inflamación sistémica, la inflamación local solo afecta a un área específica del cuerpo y los síntomas son limitados a esa área (Mosser & Edwards, 2008).

2.3 Tratamientos para la inflamación

Existen diversos tratamientos para la inflamación, los cuales pueden ser utilizados de manera individual o en combinación. Los tratamientos más comunes incluyen el uso de medicamentos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), como el ibuprofeno y el naproxeno, y los corticoides, como la prednisona. También existen medicamentos específicos para tratar ciertas enfermedades inflamatorias crónicas, como los agentes biológicos utilizados en el tratamiento de la artritis reumatoide. Así mismo se recomienda una dieta antiinflamatoria rica en frutas, verduras, pescado y granos enteros. Además, el ejercicio regular y la reducción del estrés pueden ayudar a reducir la inflamación. La medicación biológica también se está utilizando cada vez más para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas como la artritis reumatoide y la enfermedad inflamatoria intestinal (Smolen et al., 2011).

El tratamiento con AINEs y corticosteroides es bastante común, sin embargo, poseen efectos secundarios (Pérez-Gutiérrez et al., 2012), como úlceras gástricas. Dentro del contexto de los

productos naturales antiinflamatorios, la medicina tradicional se ha utilizado para tratar y cuidar a pacientes con enfermedades que conllevan a procesos inflamatorios. En este sentido, la medicina tradicional en la actualidad, es ampliamente usada en el mundo (Estrada et al., 2011). La búsqueda de principios activos para la elaboración de medicamentos ocupa un lugar importante en la investigación ya que existe una gran diversidad de plantas que poseen propiedades terapéuticas, dentro de las que se encuentra *V. dentata*.

2.4 *Viguiera dentata* y sus características

V. dentata, conocida como “chimalacate” en varios estados de México, es una hierba perenne nativa de este país, y se encuentra desde el suroeste de los Estados Unidos hasta Honduras y tiene flores amarillas. Un estudio etnobotánico previo mostró que esta planta fue reconocida como una de las más importantes de entre las 46 especies más utilizadas en la medicina tradicional de los habitantes de San Rafael, Coxcatlán, Puebla, México (Canales et al., 2008).

Las hojas y ramas de esta planta han sido utilizadas tradicionalmente en medicina popular para tratar diferentes afecciones, incluyendo dolores de cabeza, dolores musculares y dolores de garganta. Además de sus propiedades analgésicas, *V. dentata* también ha demostrado tener propiedades antioxidantes y antimicrobianas. Sin embargo, es importante mencionar que aún se necesitan más investigaciones para comprender completamente sus efectos terapéuticos y para establecer la seguridad y eficacia de su uso en humanos (Rojas-López & García-Sánchez, 2015).

2.5 El modelo de edema auricular de ratón

El modelo de edema auricular de ratón es un modelo experimental utilizado para estudiar la inflamación aguda. En este modelo, se administra una sustancia inflamatoria en la oreja de un ratón, lo que causa un aumento de volumen en la misma debido a la acumulación de líquido (edema). Este modelo se ha utilizado para evaluar el efecto de diferentes tratamientos antiinflamatorios en la reducción del edema. La ventaja de este modelo es que el edema auricular es una respuesta inflamatoria localizada y fácilmente medible, lo que permite una evaluación objetiva de la eficacia de los tratamientos antiinflamatorios. Además, el modelo de edema auricular de ratón es simple, económico y tiene una alta reproducibilidad, lo que lo hace una herramienta valiosa en la investigación de nuevos tratamientos antiinflamatorios.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que este modelo solo evalúa la respuesta inflamatoria aguda (Elsayed & De Silva, 2002).

2.6 Patología de las úlceras gástricas

Las úlceras gástricas son lesiones en la mucosa del estómago que pueden ser causadas por una variedad de factores, incluyendo la inflamación crónica y la infección por la bacteria *Helicobacter pylori*. Estas pueden ser causadas por un desequilibrio entre los factores que protegen y dañan la mucosa del estómago, incluyendo la acidez gástrica, los factores de crecimiento y los mecanismos de defensa. El tratamiento de las úlceras gástricas incluye el uso de medicamentos para reducir la acidez gástrica y la erradicación de la infección por *H. pylori*. Además, una dieta saludable rica en frutas, verduras, pescado y granos enteros, y baja en alimentos procesados y grasas puede ayudar a prevenir y tratar las úlceras gástricas (Rauws et al., 1999).

La patología de las úlceras gástricas también incluye el riesgo de complicaciones como la perforación del estómago y la hemorragia gástrica. Además, las úlceras gástricas pueden ser precursores del cáncer gástrico si no son tratadas adecuadamente. Es importante realizar un diagnóstico temprano y un tratamiento apropiado para prevenir las complicaciones y reducir el riesgo de cáncer gástrico (Kato et al., 2015).

Los AINEs son una clase de medicamentos que se utilizan para tratar el dolor y la inflamación. Estos medicamentos tienen un efecto antiinflamatorio por medio de la inhibición de la producción de ciertas sustancias proinflamatorias. Casi todos los AINEs utilizados en la actualidad, inhiben las actividades de las enzimas ciclooxigenasa 1 constitutiva y la ciclooxigenasa 2 inducida en el sitio de la inflamación y con ello, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Sin embargo, tienen un efecto secundario sobre la mucosa gástrica, pues inhiben la producción de moco lo que lleva a la aparición de gastritis, aumentando el riesgo de desarrollar úlceras gástricas (Lanas et al., 2010).

Diferentes estudios han encontrado que el uso prolongado de AINEs se asoció con un riesgo 2.5 veces mayor de desarrollar úlceras gástricas en comparación con aquellos que no utilizaban estos medicamentos. Además, el uso concomitante de AINEs y anticoagulantes o antiagregantes plaquetarios aumenta el riesgo de complicaciones gastrointestinales graves, como sangrado gastrointestinal (Silverstein et al., 2000).

La prevención de úlceras gástricas en pacientes que utilizan AINEs incluye el uso de dosis bajas y la duración más corta posible del tratamiento. También se recomienda el uso de antiácidos, como el omeprazol, para reducir el riesgo de úlceras gástricas en pacientes que utilizan AINEs de manera prolongada.

En caso de desarrollar una úlcera gástrica, es necesario interrumpir el uso de AINEs y seguir un tratamiento específico para curar la úlcera, como el tratamiento con antibióticos en el caso de úlceras causadas por *H. pylori* o el uso de medicamentos para reducir la producción de ácido estomacal (Wallace et al., 2002).

Es por esto que el descubrimiento de productos naturales o compuestos derivados con actividad antiinflamatoria, pueden ser una alternativa ante padecimientos inflamatorios, evitando el uso de AINEs y los efectos secundarios que ocasionan.

2.7 Compuestos antiinflamatorios derivados de plantas medicinales

Un estudio encontró que el compuesto denominado curcumina, presente en la planta *Curcuma longa*, tiene propiedades antiinflamatorias al inhibir la producción de sustancias proinflamatorias como las IL-2 e IL-6. (Shishodia, 2005). También se ha reportado que equinacósido, presente en *Echinacea purpurea*, tiene efectos antiinflamatorios al inhibir la actividad de enzimas inflamatorias como la histamina. (Bandyopadhyay, 2004). Así mismo, se encontró que la apigenina, presente en la planta *Matricaria chamomilla*, tiene propiedades antiinflamatorias al inhibir la producción de citocinas proinflamatorias. (García-Lafuente, 2012).

Es importante mencionar que estos estudios son solo un ejemplo de los muchos trabajos científicos realizados sobre los compuestos antiinflamatorios presentes en plantas medicinales y es necesaria más investigación para comprender completamente su mecanismo de acción y efectividad. De ahí la importancia de continuar evaluando nuevas plantas para obtener un compuesto activo y potencial antiinflamatorio.

3. Justificación

El estudio de los productos naturales es un área de investigación que busca generar conocimiento acerca del contenido químico de fuentes naturales como las plantas usadas en la medicina tradicional. La obtención de dichas moléculas se puede llevar a través de un aislamiento biodirigido. El estudio de los principios activos de una planta permiten obtener información acerca de su actividad biológica y su potencial uso como alternativa farmacoterapéutica, segura y eficaz para el tratamiento de enfermedades o padecimientos de la población, como lo son los procesos inflamatorios de diversos orígenes que requieren nuevos medicamentos, es así que el presente proyecto contribuye a la generación de conocimiento relacionado a la búsqueda de metabolitos secundarios con actividad antiinflamatoria de la planta *Viguiera dentata*.

4. Objetivo general

Aislar el o los principios activos antiinflamatorios de *Viguiera dentata* a través de un estudio biodirigido y evaluación de su mecanismo de acción como inhibidores de fosfodiesterasas.

4.1 Objetivos específicos

- Obtener los extractos hexánico, de diclorometano y metanólico de las partes aéreas de *Viguiera dentata*.
- Identificar el extracto con mayor actividad antiinflamatoria.
- Fraccionar el extracto con mayor actividad por cromatografía en columna y evaluar la actividad antiinflamatoria de las fracciones obtenidas.
- Aislar el compuesto activo.
- Caracterizar los principios activos determinando sus propiedades físicas y espectroscópicas y espectrométricas.
- Evaluar los metabolitos bioactivos como inhibidores de fosfodiesterasas en un modelo *in vitro*.
- Comparar el efecto a nivel enzimático con el grado de interacción metabolito – enzima a través de un estudio de acoplamiento molecular “docking”.

5. Hipótesis

Los extractos orgánicos de *Viguiera dentata* poseen actividad antiinflamatoria.

6. Metodología

6.1 Recolección de la planta y preparación de los extractos orgánicos.

Las partes aéreas de *Viguiera dentata* fueron colectadas en el estado de San Luis Potosí en el año 2018. La planta fue autenticada por el taxónomo José Pérez y un espécimen se depositó en el Herbario Isidro Palacios de la UASLP con número de espécimen SPLM 37980. La planta se dejó secar a temperatura ambiente (27°C), a la sombra, y posteriormente fue molida. La extracción del material vegetal se realizó mediante maceración en tres disolventes distintos; metanol, diclorometano y *n*-hexano, utilizando 400 g de la planta molida y 2 L del respectivo disolvente para cada caso, dejándola reposar durante 72 horas. Posterior al tiempo de reposo, las mezclas se filtraron al vacío y enseguida los disolventes se eliminaron en un evaporador rotatorio a presión reducida para obtener los extractos.

6.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones machos cepa CD1 con peso promedio de 20-25g, proporcionados por la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco. Los animales se mantuvieron con dieta comercial y agua *ad libitum*, se colocaron en un ambiente climatizado de 22 ± 1 °C y se mantuvieron con ciclos de 12 h de luz y oscuridad. Las cepas de ratones utilizados para este desarrollo experimental fueron aprobados por el Consejo Divisional (número de proyecto 140).

6.3 Evaluación antiinflamatoria en modelo de edema auricular inducido por TPA.

La actividad antiinflamatoria se evaluó en el modelo de edema auricular en ratón inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoil-forbol (TPA). Se utilizaron grupos de 8 animales cada uno. La oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 2,5 µg de TPA disueltos en 20 µL de acetona, 10 µl en cada lado de la oreja tratada. La oreja izquierda fue utilizada como control de comparación, no se le administró nada. Media hora después de la aplicación de TPA, se administraron 10 µl del respectivo extracto en cada lado de la oreja derecha. Se utilizó indometacina (20 mg/200 µl de acetona) como control positivo y se dejó un grupo sin tratamiento como control negativo. Después de 6 h de la administración de TPA, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron de cada oreja discos de 5 mm de diámetro para determinar su peso. La diferencia de peso entre la oreja derecha e izquierda se

tomó como expresión del edema y se calculó el porcentaje de inhibición del edema en los animales tratados con respecto al grupo control, mediante la fórmula 1, que se muestra a continuación (Williams & Topham 2007):

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

Fórmula 1. Para determinar el % de inhibición de la inflamación en el modelo de edema auricular en ratón Donde Ct=Peso del tejido horadado oreja tratada (derecha), C0=Peso del tejido horadado la oreja sin tratamiento (izquierda), control= control negativo (administrado únicamente con TPA) y tratado= grupo tratado con indometacina o con el extracto.

6.4 Separación y evaluación de las fracciones del extracto.

Una vez identificado el extracto con mayor actividad antiinflamatoria, se llevó a cabo su fraccionamiento por cromatografía en columna abierta utilizando como fase móvil hexano y aumentando la polaridad con acetato de etilo. Las fracciones resultantes de esta separación, se evaluaron en el modelo de edema auricular en ratón, utilizando la misma metodología anteriormente descrita, pero esta vez utilizando aceite de croton (2.5 µg) en lugar de TPA. Con los datos obtenidos, se determinó la fracción con mayor actividad antiinflamatoria mediante un análisis estadístico en Excel.

6.5 Evaluación de toxicidad aguda

Se utilizaron 25 animales; 5 animales para el grupo control (solución salina) y 5 para cada grupo experimental (extracto de *V. dentata*), de acuerdo a la dosis. Las dosis administradas fueron de 5000, 2500, 1250 o 625 mg/kg de peso corporal. La administración fue una vez por vía oral utilizando una cánula curva metálica. El volumen de extracto administrado no excedió de 0.5 ml/100 g de peso corporal.

Los animales de todos los grupos estudiados se observaron de forma individual a partir de los quince minutos posteriores a la administración del extracto, teniendo especial atención los primeros 30 minutos y periódicamente durante las primeras 24 horas, continuando con las observaciones hasta las 48 y 72 horas. Se registraron diariamente los parámetros clínicos (signos de toxicidad), tales como: reacción de alarma, erección de la cola, pilo erección, defecación, convulsión e irritabilidad.

Posterior a las 72 horas, los animales se sacrificaron por dislocación cervical. A continuación, se realizó una necropsia completa donde se examinó la superficie corporal, cavidades y órganos como: estómago, hígado, riñones, intestinos y bazo. Los órganos se seccionaron y dispusieron en cajas Petri con buffer de fosfato salino (PBS) y se observaron cambios en su coloración y morfología respecto al control, para poder identificar a qué dosis presentaron daños.

6.6 Evaluación antiinflamatoria crónica

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiinflamatoria crónica en el modelo de edema auricular de ratón inducido con TPA y se evaluó el extracto activo de *V. dentata*, pero en este caso los tratamientos fueron administrados vía oral. En este ensayo se utilizaron 30 ratones (6 ratones por grupo), con un control positivo (indometacina), control negativo (sin tratamiento) y las dosis del extracto de 100, 50 y 25 mg/kg. Se administraron 0.1 mL del tratamiento a cada ratón vía oral mediante una cánula esofágica. Una vez terminada la administración, se dejaron pasar 30 minutos y la oreja derecha de cada ratón recibió una aplicación tópica de 2,5 µg de TPA disueltos en 20 µL en acetona, 10 µl en cada lado de la oreja. El procedimiento anterior se realizó durante 9 días, administrando un día sí y un día no, sumando un total de 5 administraciones. El último día, posterior a la administración se dejaron pasar 6 horas después de la administración de TPA, para sacrificar por dislocación cervical a los animales y extraer de cada oreja discos de 5 mm de diámetro para determinar su peso. La diferencia de peso entre la oreja derecha e izquierda se tomó como expresión del edema y se calculó el porcentaje de inhibición del edema en los animales tratados con respecto al grupo control.

6.7 Evaluación de actividad antiulcerogástrica

Para este ensayo se utilizaron un total de 32 animales (8 por grupo), mismos que se mantuvieron 24 horas en ayunas previo al ensayo y que fueron clasificados de acuerdo a su grupo de tratamiento; control positivo (pantoprazol + etanol), control negativo (solución salina + etanol), la dosis de 200 mg/kg + etanol y un grupo control al que no se le administró etanol ni tratamiento. Primeramente, se administró 0.1 mL vía oral del respectivo tratamiento a cada grupo con ayuda de una cánula esofágica. Después de 40 minutos, se administró por la misma vía 0.1 mL de etanol al 96%. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical

40 minutos después de haber administrado etanol, para enseguida extraer sus estómagos y observar la presencia de úlceras. Los daños observados se organizaron en un gráfico estadístico en Excel.

7. Resultados

7.1 Evaluación antiinflamatoria de los extractos

La actividad antiinflamatoria de los extractos de diclorometano, metanólico y hexánico se determinó en el modelo de edema auricular en ratón inducida con TPA, los porcentajes de inhibición de los tres extractos se muestran en la tabla 1. Estos valores fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) para identificar cuáles mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) a la indometacina.

| Tabla 1. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de los extractos de <i>Viguiera dentata</i> en el modelo de edema auricular de ratón inducido por TPA. | |
|--|--|
| Tratamiento | % de inhibición de la inflamación \pm EE |
| Indometacina | 51.90 \pm 4.9 |
| Extracto de diclorometano | 50.57 \pm 4.7 |
| Extracto metanólico | 32.80 \pm 4.8* |
| Extracto hexánico | 27.53 \pm 5.2* |

Media \pm EE de un experimento, $n=8$. *Existen diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control ($p > 0.05$), Resultados de ANOVA.

Como se observa en la tabla 1, el extracto de diclorometano, es el que mostró mayor porcentaje de inhibición del edema auricular y no se observó una diferencia significativa con la indometacina, por lo que el trabajo se continuó con este extracto, mientras que los extractos metanólico y hexánico fueron descartados ya que presentaron un efecto inhibitorio de la inflamación muy bajo.

7.2 Separación y evaluación de las fracciones del extracto.

Una vez obtenidas y concentradas las fracciones resultantes de la cromatografía en columna, se procedió a realizarles cromatografía en capa fina con el objetivo de juntar las que presentaban el mismo patrón. Al hacer lo anterior, se obtuvo un total de 8 fracciones que fueron nombradas de la A a la H como se muestra en la tabla 2, con su respectiva polaridad.

| Tabla 2. Fracciones resultantes de la cromatografía en columna abierta con hexano/acetato de etilo. | |
|--|-------------------------------|
| Fracción | Polaridad |
| A | 85:15 Hexano/Acetato de etilo |
| B | 70:30 Hexano/Acetato de etilo |
| C | 60:40 Hexano/Acetato de etilo |
| D | 50:50 Hexano/Acetato de etilo |
| E | 95:5 Acetato de etilo/Metanol |

| | |
|---|--------------------------------|
| F | 70:30 Acetato de etilo/Metanol |
| G | 50:50 Acetato de etilo/Metanol |
| H | 100% Metanol |

No obstante, de estas fracciones sólo se evaluó la B, C, D y E, ya que la fracción A obtenida usando como fase móvil hexano, prácticamente sólo contenía grasas, por lo que no era relevante hacer su evaluación. Por otro lado, la fracción F resultó insuficiente, la fracción G simulaba ser un sólido, sin embargo, al intentar determinar su punto de fusión, este no fundía, por lo que se dedujo que se trataba de un compuesto inorgánico y por último la fracción H no se evaluó porque correspondía al barrido final con metanol y la cantidad era insuficiente.

En las tablas 3 y 4 se muestran los resultados obtenidos de la evaluación antiinflamatoria de las fracciones anteriormente mencionadas, mismos a los que se les realizó el ANOVA correspondiente.

Tabla 3. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones del extracto de diclorometano en columna Hexano/Acetato de etilo.

| Tratamiento | % de inhibición de la inflamación ± EE |
|--------------|--|
| Indometacina | 92.39 ± 2.81 |
| Fracción B | 92.02 ± 1.66 |
| Fracción C | 94.97 ± 0.83 |

Media ±EE de un experimento, n=8. *Existen diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control ($p>0.05$), Resultados de ANOVA.

Tabla 4. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las fracciones del extracto de diclorometano en columna Hexano/Acetato de etilo.

| Tratamiento | % de inhibición de la inflamación ± EE |
|--------------|--|
| Indometacina | 92.84 ± 1.28 |
| Fracción D | 83.85 ± 2.66 |
| Fracción E | 86.79 ± 2.28 |

Media ±EE de un experimento, n=8. *Existen diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control ($p>0.05$), Resultados de ANOVA.

Como se observa, en ambos experimentos independientes todas las fracciones evaluadas presentaron actividad antiinflamatoria y no hay diferencia significativa respecto al control. Estos resultados permiten suponer que el compuesto responsable de la actividad se encontraba presente en las fracciones A, B, C y D, lo que indica que la columna

cromatográfica no separó adecuadamente, razón por la que se decidió cambiar la relación de disolventes a diclorometano/acetato de etilo, como se muestra a continuación.

Una vez obtenidas y concentradas las fracciones de la cromatografía en columna con el cambio de disolventes diclorometano/acetato de etilo, se procedió a realizarles cromatografía en capa fina y las que presentaron el mismo patrón se juntaron obteniendo un total de 7 fracciones que fueron nombradas de la A a la G como se muestra en la tabla 5, con su respectiva polaridad.

| Tabla 5. Fracciones resultantes de la cromatografía en columna abierta con diclorometano/acetato de etilo. | |
|---|--------------------------------------|
| Fracción | Polaridad |
| A | 95:5 Diclorometano/Acetato de etilo |
| B | 90:10 Diclorometano/Acetato de etilo |
| C | 80:20 Diclorometano/Acetato de etilo |
| D | 70:30 Diclorometano/Acetato de etilo |
| E | 85:15 Diclorometano/Acetato de etilo |
| F | 70:30 Acetato de etilo/Metanol |
| G | 100% Metanol |

Las fracciones B y C se juntaron ya que, al comparar su cromatografía en capa fina, estas presentaron un patrón similar, formando así la fracción BC misma que fue evaluada para identificar su actividad antiinflamatoria (tabla 6). El resto de las fracciones no se evaluaron ya que la cantidad era insuficiente para probar en el modelo de edema auricular en ratones.

| Tabla 6. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de la fracción BC del extracto de diclorometano en columna Diclorometano/Acetato de etilo. | |
|--|---|
| Tratamiento | % de inhibición de la inflamación ± EE |
| Indometacina | 51.26 ± 7.06 |
| Fracción BC | 47.35 ± 8.72 |

*Media ±EE de un experimento, n=8. *Existen diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control (p>0.05), Resultados de ANOVA.*

Al hacer el ANOVA, la fracción BC no presentó diferencias significativas respecto al control. Sin embargo, esta fracción mostraba en cromatografía en capa fina que era una mezcla de compuestos que no se lograron separar, así que se procedió a realizar una recromatografía para purificar la fracción activa. Esta recromatografía se realizó con una relación de disolventes hexano/acetato de etilo y una vez obtenidas y concentradas las subfracciones se

procedió a realizarles cromatografía en capa fina para juntar las que presentaron un patrón similar, obteniendo las fracciones BC-1 y BC-2 (tabla 7).

| Tabla 7. Fracciones resultantes de la recromatografía de la fracción BC en columna abierta con hexano/acetato de etilo. | |
|--|-------------------------------|
| Fracción | Polaridad |
| BC-1 | 80:20 Hexano/Acetato de etilo |
| BC-2 | 70:30 Hexano/Acetato de etilo |

Ahora bien, continuando con el estudio biodirigido, se realizó la evaluación antiinflamatoria de ambas fracciones (tabla 8) y la subfracción BC-2 mostró actividad antiinflamatoria similar a la indometacina, sin embargo, la subfracción BC-1 presentó una actividad muy baja. De la subfracción BC-2 se obtuvieron 171 mg.

| Tabla 8. Evaluación de la actividad antiinflamatoria de las subfracciones BC del extracto de diclorometano en columna Hexano/Acetato de etilo. | |
|---|---|
| Tratamiento | % de inhibición de la inflamación ± EE |
| Indometacina | 67.5 ± 6.47 |
| Subfracción BC-1 | 33.75 ± 8.43* |
| Subfracción BC-2 | 73.75 ± 7.78 |

Media ±EE de un experimento, n=8. *Existen diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control ($p>0.05$), Resultados de ANOVA.

Dado que el rendimiento de la subfracción activa fue insuficiente, el resto de las evaluaciones se realizó con el extracto de diclorometano de *Viguiera dentata*.

7.3 Evaluación de toxicidad aguda

Los resultados de la evaluación de toxicidad aguda se presentan en la tabla 9. Como se observa, la dosis de 5000 causó daño en el hígado y estómago de algunos animales y a la dosis 2500 mg/kg persistió el daño en hígado. También se observó que a ambas dosis los animales sentían dolor (chillaban) al palpar la zona de su estómago. En cambio, a las dos dosis más bajas (1250 y 625 mg/kg) no presentaron ningún daño en órganos ni se observó comportamiento anormal. Por lo que se puede inferir que, la dosis segura para trabajar con los animales es ≤ 1250 mg/kg de extracto, ya que la evaluación demuestra que dosis mayores a 2500 mg/kg son tóxicas y pueden causar daño en órganos, lo cual afectaría los resultados de pruebas posteriores.

Tabla 9. Relación de órganos dañados en el ensayo de toxicidad aguda *in vivo*.

| Dosis (mg/kg) | 5000 | 2500 | 1250 | 625 | Control |
|-----------------|-------------------|-------------|------|-----|---------|
| Ratones muertos | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Órganos | Presencia de daño | | | | |
| Hígado | D 4 de 5 | D 2 de 5 | SD | SD | SD |
| Estómago | D 1 de 5 | SD | SD | SD | SD |
| Intestino | SD | SD | SD | SD | SD |
| Bazo | SD | SD | SD | SD | SD |
| Riñones | SD | SD | SD | SD | SD |

SD=Sin daño, D=Presencia de daño.

7.4 Evaluación antiinflamatoria crónica

En la tabla 10 se muestran los resultados obtenidos en el edema auricular en ratón inducido con múltiples aplicaciones de TPA, tratados con el extracto de diclorometano de *V. dentata*. Al hacer el ANOVA correspondiente, resultó que todas las dosis probadas presentaron diferencias estadísticamente significativas respecto a la indometacina. No se observa una actividad dosis dependiente.

Tabla 10. Evaluación de la inflamación crónica con el extracto de diclorometano de *Viguiera dentata*.

| Tratamiento | % de inhibición de la inflamación ± EE |
|-----------------|--|
| Indometacina | 49.32 ± 2.9 |
| Dosis 100 mg/kg | 33.99 ± 2.3* |
| Dosis 50 mg/kg | 31.64 ± 5.3* |
| Dosis 25 mg/kg | 30.90 ± 3.99* |

Media ±EE de un experimento, n=6. *Existen diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo control ($p>0.05$), Resultados de ANOVA.

7.5 Evaluación de actividad antiulcerogástrica

En la figura 1 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación antiulcerogástrica del extracto de diclorometano de *V. dentata*. En el grupo tratado con pantoprazol + etanol se encontró un porcentaje de daño en el estómago del 11.86%, el grupo tratado únicamente con etanol reflejó un 21.86% y el grupo administrado con 200 mg/kg del extracto + etanol un

5.29%. Analizando los datos anteriores, se puede destacar que el extracto mostró un efecto gastroprotector incluso mayor que el control positivo de pantoprazol.

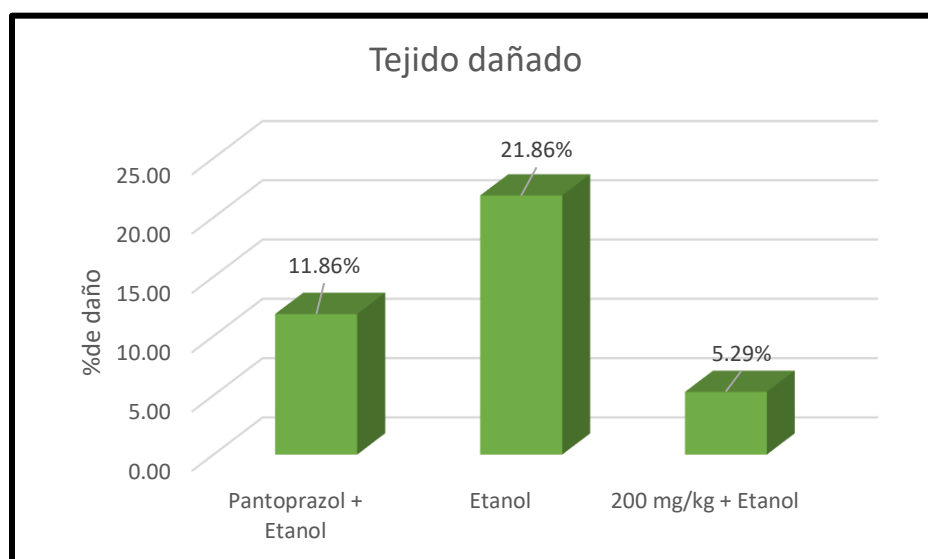


Figura 1. Porcentaje de daño en los estómagos de los ratones sometidos a la evaluación antiulcerogástrica.

La evaluación de la actividad como inhibidores de fosofodiesterasas requiere metabolitos puros por lo que no fue posible realizar dichas evaluaciones previstas en el proyecto.

8. Discusión

En la presente investigación, el modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA mostró una evidencia clara de la actividad antiinflamatoria de *V. dentata*. El TPA promueve la liberación y metabolismo del ácido araquidónico, así como la interacción de dicho agente con la proteínquinasa C30 (Matiz, et al., 2011), por lo tanto, el efecto inhibitorio de la subfracción BC-2 evaluada, sugiere la presencia de compuestos activos que bloquean alguna de estas rutas inflamatorias, inhibiendo tales mediadores, provocando así la disminución de la inflamación.

El consumo excesivo de alcohol puede causar daño a la mucosa gastrointestinal, resultando en erosiones y úlceras. Además, el etanol induce la liberación de mediadores proinflamatorios, tales como la interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (Liu et al., 2023), lo que propicia el daño tisular y la formación de úlceras gástricas. Los tratamientos antiulcerogástricos incluyen mantener el equilibrio de la mucosa gástrica y reducir o neutralizar la secreción de ácido, uno de los más utilizados es el pantoprazol, inhibidor de la bomba de protones. El pantoprazol es un benzimidazol permeable a la membrana que disminuye la secreción ácida gástrica por inhibición irreversible de la bomba de protones, H⁺/K⁺ ATPasa, en las células parietales gástricas (Figueira, 2015). En este caso alguno de los compuestos presentes en el extracto de *V. dentata*, podría inhibir la secreción de ácido clorhídrico, al igual que pantoprazol.

Los resultados encontrados son relevantes ya que muestran evidencia científica acerca de la actividad antiinflamatoria y antiulcerogástrica de la especie *V. dentata*, por lo que es importante dar continuidad a este estudio para lograr aislar el compuesto responsable de la actividad, así como determinar su mecanismo de acción.

9. Perspectivas futuras

Se recomienda realizar más pruebas *in vivo* e *in vitro* con la subfracción BC-2, ya que se ha confirmado que tiene actividad antiinflamatoria. Así mismo sería pertinente experimentar con dosis mayores ahora que se conoce la dosis a la que no es tóxico el extracto y para complementar la investigación sería importante realizar un perfil de composición de la fracción activa mediante espectrometría de masas.

10. Conclusión

Se logró determinar la fracción activa (BC-2) de la especie *Viguera dentata*. Así mismo, el extracto de diclorometano de esta planta posee actividad antiinflamatoria y antiulcerogástrica.

Bibliografía

1. Buse, J. B., & Bakris, G. L. (2008). Inflammation and Allostasis in Obesity and Metabolic Syndrome. *Physiology and pathophysiology of the endocrine pancreas*, 51-58.
2. Canales, M., Hernández, T., Caballero, J., De Vivar, AR, Avila, G., Duran, A., & Lira, R. (2005). Factor de consenso informante y actividad antibacteriana de las plantas medicinales utilizadas por la población de San Rafael Coxcatlán, Puebla, México. *Diario de Etnofarmacología*, 97 (3), 429-439.
3. Canales, M., Hernández, T., Rodríguez-Monroy, MA, Jiménez-Estrada, M., Flores, CM, Hernández, LB, ... & Avila, G. (2008). Actividad antimicrobiana de los extractos y aceite esencial de *Viguiera dentata*. *Biología Farmacéutica*, 46 (10-11), 719-723.
4. Elsayed, N. M., & De Silva, N. (2002). Ear edema as a model of inflammation. *Journal of immunological methods*, 264(1-2), 1-14.
5. Estrada, H. A. G., Ruiz, K. N. G., & Medina, J. D. (2011). Actividad antiinflamatoria de productos naturales. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 10(3), 182-217.
6. Figueira, L. (2015). El pantoprazol. Efecto en la úlcera péptica hemorrágica. *Informe Médico*, 17(3).
7. García-Lafuente, A., Guillamón, E., Villarroya, M., Martínez-Losa, M., & Guillamón, E. (2012). Apigenin: a versatile bioflavonoid. *Phytotherapy Research*, 26(11), 1609-1622.
8. Hernández-Guerrero, V. G., Meléndez-Camargo, M. E., Márquez-Flores, Y. K., & Arreguín-Sánchez, M. (2018). Estudio etnobotánico y evaluación de la actividad antiinflamatoria de *Geranium seemannii* Peyr. (municipio de Ozumba, Estado de México). *Polibotánica*, (46), 287-303.

9. Kato, I., Tominaga, S., & Suzuki, R. (2015). Diet and gastric cancer: a review. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 26(4), 363-373.
10. Lanas, A., Chan, F. K., Scheiman, J., & Kaplan, G. G. (2010). Antiinflammatory therapy and upper gastrointestinal bleeding. *The Lancet*, 376(9739), 603-613.
11. Liu, L., Lu, K., Xie, J., Che, H., Li, H., & Wancui, X. (2023). Melanin from *Sepia pharaonis* ink alleviates mucosal damage and reduces inflammation to prevent alcohol-induced gastric ulcers. *Food Bioscience*, 51, 102266.
12. Matiz, G. E., Franco, L. A., & Rincón, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L.(Swartz). *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(3), 281-287.
13. Matiz, G. E., Franco, L. A., & Rincón, J. (2011). Actividad antiinflamatoria de flores y hojas de *Caesalpinia pulcherrima* L.(Swartz). *Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud*, 43(3), 281-287.
14. Mosser, D. M., & Edwards, J. P. (2008). Acute and chronic inflammation. *The Journal of pathology*, 214(1), 1-6.
15. Pedersen, B. K., & Febbraio, M. A. (2012). Muscle as an endocrine organ: focus on muscle-derived interleukin-6. *Physiology & behavior*, 106(1), 1-9.
16. Pérez-Gutiérrez, S., Sánchez-Mendoza, E., Martínez-González, D., Zavala-Sánchez, M. A., & Pérez-González, C. (2012). Kramecyne — A New Anti-inflammatory Compound Isolated from *Krameria cytisoides*. *Molecules*, 17(2), 2049–2057, 2049–2057.
17. Rauws, E. A., Tytgat, G. N., & Tijssen, J. G. (1999). Pathogenesis of gastric ulcers. *The American Journal of Pathology*, 154(1), 1-7.
18. Regal, M. L. L., Borges, A. A., de Armas García, J. O., Alvarado, L. M., Cedeño, J. A. V., & del Sol, J. Á. C. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay*, 5(1), 47-62.
19. Rojas-López, M., & García-Sánchez, F. (2015). *Viguiera dentata* (Asteraceae) exhibits anti-inflammatory and analgesic activities. *Journal of ethnopharmacology*, 171, 190-197.

20. Shishodia, S., Sethi, G., Aggarwal, B. B., & Srimal, R. C. (2005). Curcumin: the Indian solid gold. *Phytotherapy Research*, 19(2), 141-145.
21. Silverstein, F. E., Faich, G., Goldstein, J. L., Simon, L. S., Pincus, T., Whelton, A., & Stenson, W. F. (2000). Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *The New England Journal of Medicine*, 343(21), 1520-1528.
22. Smolen, J. S., Landewe, R., Breedveld, F. C., Buch, M., Burmester, G. R., Dougados, M., & Kvien, T. K. (2011). EULAR recommendations for the management of rheumatoid arthritis with synthetic and biological disease-modifying antirheumatic drugs: 2013 update. *Annals of the rheumatic diseases*, 72(7), 1125-1135.
23. Waizel-Bucay, J., & Martinez-Rico, I. (2011). Algunas plantas usadas en México en padecimientos periodontales. *Revista aDM*, 58(2), 73-88.
24. Wallace, J. L., Sylvester, F. A., & Daugherty, J. R. (2002). Nonsteroidal antiinflammatory drugs and gastric ulcer healing: a meta-analysis. *Gastroenterology*, 123(2), 474-484.
25. Wendie, V. H. E. (2004). Inflamación I. *Revista de actualización clínica*, 43(1), 2261-2264.
26. Williams & R. S. Topham (2007). Methods for Measuring Inflammation in Animal Models of Human Disease. *Journal of Leukocyte Biology*, vol.82(1), pp. 1-15.



Vo. Bo.

Dr. Fernando Rodríguez Ramos
Nombre y firma de asesor interno
Cargo: Asociado Nivel D
No. Económico: 35133



Vo. Bo.

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez
Nombre y firma de asesor interno
Cargo: Titular C
No. Económico: 2212