

UNIVERSIDAD DE CUENCA



**FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

**Actividad Anti-inflamatoria de los extractos de plantas medicinales empleados en el
Austro Ecuatoriano en el modelo de *Danio rerio*.**

Tesis previa a la obtención del Título de Bioquímico Farmacéutico.

AUTORES:

ANDREA DEL ROCIO BUESTAN ORELLANA.

ANITA LUCIA GUARACA MERCHAN

DIRECTORA:

DRA. EUGENIA PEÑAHERRERA WILCHES.

ASESOR:

DR. FABIAN LEON TAMARIZ

CUENCA-ECUADOR

2013

RESUMEN

Las plantas medicinales se encuentran ampliamente distribuidas lo cual ha facilitado la utilización por la población del Austro ecuatoriano, sin necesidad de una prescripción médica y mucho menos de que demuestren seguridad y eficacia.

El presente proyecto de investigación se centró en determinar la actividad anti-inflamatoria de los extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos de *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguietia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum sp*, *Cestrum aff. peruvianum*, y *Uncaria tomentosa* usando el modelo de peces cebras (*Danio rerio*), debido a la homología genética, fisiológica y farmacológica con el ser humano, con la finalidad de dar un respaldo científico del uso de estos procedimientos ancestrales por la población. Resulta de singular relevancia señalar que las investigaciones del Dr. David Achig, respecto a la utilización terapéutica de distintos vegetales, según los conocimientos y criterios ancestrales de la medicina tradicional china, constituyeron una guía importante, en la selección de las plantas utilizadas para el desarrollo de esta investigación.

Se procedió a iniciar el estudio con la selección de 7 plantas medicinales que de acuerdo a la información bibliográfica poseen propiedades anti-inflamatorias. Las muestras vegetales fueron recolectadas, caracterizadas botánicamente, seleccionadas, lavadas, secadas, almacenadas y concentradas hasta obtener el extracto seco.

Luego se realizó el ensayo de toxicidad de los extractos para determinar la concentración máxima tolerable (CMT). Posteriormente se realizó el ensayo in vivo de migración leucocitaria para determinar la actividad anti-inflamatoria.

El análisis estadístico de los resultados experimentales se llevó a cabo con el software de libre distribución "R" versión 2.15.2 de 64 bits, empleándose un análisis ANOVA y el procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey, con lo que se concluyó que los extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos de *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguietia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum sp*,

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

Cestrum aff. peruvianum, *Uncaria tomentosa* (hojas) y solo el extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (tallos herbario), presentan una actividad anti-inflamatoria igual al control positivo Piroxicam (Feldene®) y el extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (mezcla: hojas y tallos herbario) y los extractos clorofórmicos de *Uncaria tomentosa* (mezcla: hojas y tallos herbario) y *Uncaria tomentosa* (tallos herbario) presentan una actividad anti-inflamatoria parcial comparada al control positivo Piroxicam (Feldene®).

Palabras claves: Austro ecuatoriano, Medicina Tradicional China, anti-inflamatorio, *Danio rerio*, plantas medicinales, Piroxicam.

ABSTRACT

Ecuador is a mega-diverse country where plants are widely distributed and used by Ecuadorian people with different purposes, being the medicinal one the most common in our country. This abundance has enabled the widespread use of plants unfortunately, most without a prescription, or studies which support its safety or efficacy.

The present research project was focus on the analysis of the pharmacological potential as anti-inflammatory products of the hydro-alcoholic and chloroform extracts from *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguietia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum sp*, *Cestrum aff. peruvianum*, and *Uncaria tomentosa* using the zebrafish as a model (*Danio rerio*). The use of zebrafish can be explained due to its genetic homology, physiological and pharmacological similarity on responds as humans.

It is of particular importance to mention the fact that this research was based on previous experience of Dr. David Achig, regarding to the therapeutic use of various plants, according to concepts present in the traditional Chinese medicine. One objective of this particular research is to give scientific support to this ancient knowledge.

For the present study, seven plants were selected according to Dr. Achig criteria and ethnomedical information. Plant samples were collected, botanically characterized, rinsed, dried, and stored until analysis. Hydro-alcoholic and chloroform extracts were obtained. The toxicity of obtained extracts was assayed on zebra fish larvae of 7 days post fertilization in order to determine the maximum tolerable concentration (MTC). Subsequently, *in vivo* assay was developed in order to evaluate the leukocyte migration and determine the extract anti-inflammatory activity.

Statistical analysis was performed with the free software "R" version 2.15.2 64-bit, using ANOVA analysis and multiple comparison procedure Tukey. Results allowed

AUTORES:

ANDREA BUESTAN O.

ANITA GUARACA M.

us to conclude that hydroalcoholic and chloroform extracts of *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguietia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum sp*, *Cestrum aff. peruvianum*, *Uncaria tomentosa* (leaves) and the hydroalcoholic extract of *Uncaria tomentosa* (stem herbal), exhibit anti-inflammatory activity like the positive control Piroxicam (Feldene ®). Hydroalcoholic extract of *Uncaria tomentosa* (mixture: herbal leaves and stem) and the chloroform extracts of *Uncaria tomentosa* (mixture: herbal leaves and stem), and *Uncaria tomentosa* (stem herbal) exhibit partial anti-inflammatory activity compared to the positive control Piroxicam (Feldene ®).

Keywords: Ecuadorian Austro; Traditional Chinese Medicine; anti-inflammatory; Danio rerio, medicinal plants, Piroxicam

INDICE

PORTADA	1
RESUMEN.....	2
INDICE	6
DEDICATORIA	19
DEDICATORIA	20
AGRADECIMIENTOS.....	21
INTRODUCCIÓN.....	22
CAPÍTULO 1	24
1 MARCO TEÓRICO.....	24
1.1 PLANTAS MEDICINALES	24
1.1.1 DEFINICIÓN.....	24
1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y FARMACOLÓGICA DE LAS ESPECIES UTILIZADAS.....	24
1.2.1 <i>Matricaria recutita</i> (Manzanilla)	24
1.2.1.1 Familia.....	25
1.2.1.2 Nombres comunes	25
1.2.1.3 Descripción Botánica	25
1.2.1.4 Fitoquímica	25
1.2.1.5 Usos Tradicionales.....	25
1.2.1.6 Partes usadas	26
1.2.2 <i>Rosmarinus officinalis</i> (Romero).....	26
1.2.2.1 Familia.....	26
1.2.2.2 Nombres comunes	26
1.2.2.3 Descripción botánica.....	26
1.2.2.4 Fitoquímica	26
1.2.2.5 Usos tradicionales	27
1.2.2.6 Partes Usadas.....	27
1.2.3 <i>Aristeguetia glutinosa</i> (Matico)	27
1.2.3.1 Familia.....	28

1.2.3.2	Nombres comunes	28
1.2.3.3	Descripción botánica.....	28
1.2.4	Fitoquímica	28
1.2.4.1	Usos tradicionales	28
1.2.4.2	Partes Utilizadas.....	29
1.2.5	<i>Urtica Urens</i> (Ortiga).....	29
1.2.5.1	Familia.....	29
1.2.5.2	Nombres comunes	29
1.2.5.3	Descripción botánica.....	29
1.2.5.4	Fitoquímica	29
1.2.5.5	Usos tradicionales	30
1.2.5.6	Partes usadas	30
1.2.6	<i>Cestrum</i>	30
1.2.6.1	Familia.....	31
1.2.6.2	Nombres comunes	31
1.2.6.3	Descripción botánica.....	31
1.2.6.4	Fitoquímica	31
1.2.6.5	Usos tradicionales	31
1.2.6.6	Partes usadas	31
1.2.7	<i>Uncaria tomentosa</i> (Uña de gato).....	32
1.2.7.1	Familia.....	32
1.2.7.2	Nombres comunes	32
1.2.7.3	Descripción botánica.....	32
1.2.7.4	Fitoquímica	33
1.2.7.5	Usos tradicionales	33
1.2.7.6	Partes usadas	33
1.3	INFLAMACIÓN	33
1.3.1	Fenómenos Vasculares.....	34
1.3.1.1	Cambios en el flujo sanguíneo y en el calibre de los vasos:.....	34
1.3.1.2	Aumento de la permeabilidad vascular:.....	34
1.3.2	Fenómenos Celulares.....	34

1.3.2.1	Leucocitos.....	35
1.3.2.2	Basófilo.....	35
1.3.2.3	Neutrófilo.....	35
1.3.2.4	Monocito/Macrófago.....	36
1.3.2.5	Linfocitos T y B	36
1.3.2.6	Eosinófilo	36
1.3.2.7	Mastocitos o células cebadas.....	36
1.3.2.8	Plaquetas	37
1.3.2.9	Neuronas	37
1.3.2.10	Células endoteliales vasculares.....	37
1.3.3	Mediadores de la Inflamación.....	37
1.3.3.1	Histamina	37
1.3.3.2	Cininas	38
1.3.3.3	Prostaglandinas	38
1.3.3.4	Leucotrienos.....	38
1.3.3.5	Factores del complemento.....	39
1.3.3.6	Óxido nítrico	39
1.3.3.7	Factor activador de las plaquetas (FAP)	39
1.4	MODELOS ANIMALES UTILIZADOS PARA ESTUDIO DEL PROCESO ANTI-INFLAMATORIO.....	40
1.4.1	MODELO DE PEZ CEBRA (<i>Danio rerio</i>).....	40
1.4.1.1	Familia.....	41
1.4.1.2	Genero	41
1.4.1.3	Especie.....	41
1.4.1.4	Nombre común	41
1.4.1.5	Dimorfismo sexual.....	41
1.4.1.6	Mantenimiento.....	41
1.4.1.7	Alimentación.....	42
1.4.1.8	Reproducción	42
1.4.1.9	Genoma	42
1.4.1.10	Desarrollo.....	42

1.4.1.10.1	Día 1	42
1.4.1.10.2	Día 2	43
1.4.1.10.3	Día 3	44
1.4.1.10.4	Período de Larva Temprana 3 - 7dpf (días post-fertilización)	44
1.4.1.11	Ventajas del Pez Cebra como Modelo Biológico	44
CAPITULO 2		46
2	MATERIALES Y METODOS	46
2.1	MATERIALES	46
2.2	METODOS	47
2.2.1	MUESTRAS VEGETALES.....	47
2.2.1.1	Selección	47
2.2.1.2	Lavado.....	47
2.2.1.3	Secado	47
2.2.1.4	Almacenamiento.....	48
2.2.2	OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES.....	48
2.2.3	CONCENTRACION DEL EXTRACTO VEGETAL	49
2.2.4	Liofilización	49
2.2.5	Concentración al vacío	50
2.3	TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI- INFLAMATORIA EN LARVAS DE PECES CEBRA.....	50
2.3.1	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	50
2.3.1.1	Pre-tratamiento	50
2.3.2	PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO DE TOXICIDAD 51	
2.3.2.1	Ensayo de toxicidad de los extractos.....	51
2.3.3	ENSAYO IN VIVO DE MIGRACIÓN LEUCOCITARIA	52
2.3.3.1	Animales de experimentación	52
2.3.3.2	Ensayo de migración leucocitaria	52
2.3.3.2.1	Pre-incubación (1hora).....	52
2.3.3.2.2	Corte de las colas e incubación final (7 horas)	53
2.3.3.2.3	Tinción de mieloperoxidasa y evaluación de los resultados.....	54

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
CAPÍTULO 3	57
3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	57
3.1 Evaluación de la Concentración Máxima Tolerable (CMT) in vivo	57
3.2 Ensayo in Vivo de Migración Leucocitaria.....	58
3.3 Discusión	68
4. CONCLUSIONES	73
5. RECOMENDACIONES	74
6. BIBLIOGRAFÍA	75
7. ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Urtica urens</i> 100 µg/ml	62
Gráfico 2: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Cestrum aff. peruvianum</i> (sauco negro) 100 µg/ml.	63
Gráfico 3: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de <i>Rosmarinus officinalis</i> 12.5 µg/ml.	66
Gráfico 4: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de <i>Aristeguietia glutinosa</i> 12.5 µg/ml.	67

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Concentración Máxima Tolerable (CMT) de los extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos.	57
Tabla 2: Clasificación de los extractos hidroalcohólicos según el ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido.	58
Tabla 3: Clasificación de los extractos clorofórmicos según el ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido.	59
Tabla 4: Ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido de los extractos hidroalcohólicos.	60
Tabla 5: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido de los extractos clorofórmicos.	64

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1: Horno de Secado	82
Anexo 2: Concentración de Extractos vegetales en Rotavapor.	82
Anexo 3: Eliminación del solvente con nitrógeno en baño ultrasónico.....	83
Anexo 4: Disposición de los extractos hidroalcohólicos en el liofilizador.	83
Anexo 5: Concentración al vacío de los extractos clorofórmicos.	83
Anexo 6: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Matricaria recutita</i> 150 µg/ml.....	84
Anexo 7: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Rosmarinus officinalis</i> 50 µg/ml.	85
Anexo 8: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Aristeguietia glutinosa</i> 12.5 µg/ml.	86
Anexo 9: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Cestrum sp.</i> (Sauco blanco) 12.5 µg/ml.....	87
Anexo 10: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Uncaria tomentosa</i> (hojas y tallo herbario) 12.5 µg/ml.....	88
Anexo 11: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Uncaria tomentosa</i> (tallo herbario) 25 µg/ml.	89
Anexo 12: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de <i>Uncaria tomentosa</i> (hojas) 50 µg/ml.90	

Anexo 13: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Matricaria recutita* 25 µg/ml..... 91

Anexo 14: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Urtica Urens* 200 µg/ml. 92

Anexo 15: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Cestrum sp* (sauco blanco) 100 µg/ml. 93

Anexo 16: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Cestrum aff. Peruvianum* (sauco negro) 200 µg/ml. 94

Anexo 17: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Uncaria tomentosa* (hojas y tallo herbario) 200 µg/ml..... 95

Anexo 18: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Uncaria tomentosa* (tallo herbario) 200 µg/ml. 96

Anexo 19: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Uncaria tomentosa* (hojas) 200 µg/ml. . 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: *Matricaria recutita*..... 24

Figura 2: *Rosmarinus officinalis*..... 26

Figura 3: *Aristeguietia glutinosa*..... 27

Figura 4: *Urtica urens*..... 29

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

Figura 5: <i>Cestrum sp.</i> (saúco blanco).....	30
Figura 6: <i>Cestrum aff. peruvianum</i> (saúco negro).....	30
Figura 7: <i>Uncaria tomentosa</i>	32
Figura 8: <i>Danio rerio</i>	41
Figura 9: Larva 5 dpf pre-tratada con PTU.....	51
Figura 10: Larva 5 dpf pre-tratada con PTU, después del corte.....	53
Figura 11: Tinción de la mieloperoxidasa de un control positivo y negativo.....	55
Figura 12: Ensayo de actividad anti-inflamatoria en peces cebra (A) Control Negativo (B) Control Positivo Piroxicam 50 μ M, Muestras Positivas (C) <i>Urtica urens</i> 100 μ g/ml (D) <i>Cestrum aff. peruvianum</i> 100 μ g/ml.....	61
Figura 13: Ensayo de actividad anti-inflamatoria en peces cebra (A) Control Negativo (B) Control Positivo Piroxicam 50 μ M, Muestras Positivas (C) <i>Rosmarinus officinalis</i> 12.5 μ g/ml (D) <i>Aristeguietia glutinosa</i> 12.5 μ g/ml.....	65



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Anita Lucia Guaraca Merchàn, autor de la tesis "Actividad Anti-inflamatoria de los extractos de plantas medicinales empleados en el Austro Ecuatoriano usando el modelo de *Danio rerio*", reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afección alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 17 de Mayo de 2013



Anita Lucia Guaraca Merchán
0104872973

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Anita Lucia Guaraca Merchán, autor de la tesis "Actividad Anti-inflamatoria de los extractos de plantas medicinales empleados en el Austro Ecuatoriano usando el modelo de *Danio rerio*.", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de Mayo de 2013



Anita Lucia Guaraca Merchán
0104872973

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador



UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Andrea del Rocío Buestán Orellana, autor de la tesis “Actividad Anti-inflamatoria de los extractos de plantas medicinales empleados en el Austro Ecuatoriano usando el modelo de *Danio rerio*”, reconozco y acepto el derecho de la Universidad de Cuenca, en base al Art. 5 literal c) de su Reglamento de Propiedad Intelectual, de publicar este trabajo por cualquier medio conocido o por conocer, al ser este requisito para la obtención de mi título de Bioquímico Farmacéutico. El uso que la Universidad de Cuenca hiciere de este trabajo, no implicará afeción alguna de mis derechos morales o patrimoniales como autor.

Cuenca, 17 de mayo del 2013



Andrea del Rocío Buestán Orellana

010443604-3

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

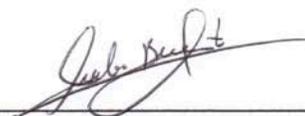


UNIVERSIDAD DE CUENCA

Fundada en 1867

Yo, Andrea del Rocío Buestán Orellana, autor de la tesis "Actividad Anti-inflamatoria de los extractos de plantas medicinales empleados en el Austro Ecuatoriano usando el modelo de *Danio rerio*", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autor/a.

Cuenca, 17 de mayo de 2013



Andrea del Rocío Buestán Orellana

010443604-3

Cuenca Patrimonio Cultural de la Humanidad. Resolución de la UNESCO del 1 de diciembre de 1999

Av. 12 de Abril, Ciudadela Universitaria, Teléfono: 405 1000, Ext.: 1311, 1312, 1316

e-mail cdjbv@ucuenca.edu.ec casilla No. 1103

Cuenca - Ecuador

DEDICATORIA

Dedico esta tesis y toda mi carrera universitaria a Dios por ser quien ha estado a mi lado en todo momento dándome las fuerzas necesarias para continuar día a día luchando y seguir adelante venciendo todas las barreras que se me presenten.

Les agradezco a mis papis Miguel y Lucinda, ya que gracias a ellos soy quien soy hoy en día, fueron los que me dieron ese amor incondicional y velaron por mi salud y mis estudios. Mi agradecimiento más profundo va hacia mi esposo Juan que siempre estuvo a mi lado apoyándome incondicionalmente en todo momento y circunstancias y a mis hijos Juan Andrés y Ana Gabriela quienes son lo más bello que la vida me ha dado.

A mis amigas y profesores que me brindaron su aliento y cariño.

Andrea

DEDICATORIA

A Dios por su amor y bondad infinitos, en los momentos más importantes de mi vida.

A mis padres por su amor y apoyo incondicional, los cuales se constituyeron en la piedra angular de mi motivación para esforzarme y ser mejor ser humano y profesional.

Anita

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta tesis de grado:

A nuestra directora de tesis, la Doctora Eugenia Peñaherrera Wilches, por su incansable dedicación, valioso apoyo, esfuerzo, ánimo, orientación y continua generosidad y ayuda para la realización de esta tesis.

Al PhD. Fabián León Tamariz, por su valioso e imprescindible asesoramiento para el procesamiento de las muestras escogidas.

Queremos expresar también nuestro más sincero agradecimiento al Dr. David Achig Balarezo, por su importante aporte en la selección de las plantas medicinales para el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Isabel Wilches directora del proyecto VLIR de plantas medicinales, por permitir la utilización de los laboratorios del proyecto y por la confianza depositada en nosotras al momento de apoyarnos con el tema de tesis.

A la Dra. Raffaella Ansaloni, por su contribución en la identificación de las especies vegetales utilizadas en este proyecto de tesis.

A la Dra. Nancy Cuzco por su ayuda en cada uno de los laboratorios del proyecto, así como al Ing. Vladimiro Tobar por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de nuestra tesis.

A nuestros padres por su apoyo, cariño y comprensión durante todo el proceso de elaboración de esta tesis, sin su apoyo y paciencia no hubiera sido posible.

INTRODUCCIÓN

Desde hace algunos años, tanto países altamente desarrollados como aquellos en vías de desarrollo, han retomado el uso de plantas medicinales con fines terapéuticos, lo que se conoce como la “Revolución Verde de la Medicina” (1). A partir de 1976 la Organización Mundial de la Salud (O.M.S) promueve el uso de procedimientos ancestrales que demuestren seguridad y eficacia. La medicina tradicional se basa precisamente en el uso de plantas, estando esta presente en la mayoría de los países junto con sus saberes y prácticas. En función de lo expuesto, la OMS ha adoptado resoluciones que ponen de manifiesto la necesidad de racionalizar el empleo de los productos derivados de las plantas medicinales, con el objetivo de limitar la prescripción de aquellos productos de fitoterapia que carezcan de estudios previos para avalar el uso de los mismos, o de plantas de las que no se conocen suficientemente los riesgos de su utilización. (2)

Uno de los componentes de ciertas patologías que despierta gran interés en las investigaciones actuales es la inflamación a pesar de la gran variedad de anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) y esteroideos disponibles en el mercado farmacéutico para tratarla, debido a factores culturales y socioeconómicos, entre los que destacan el conocimiento empírico del potencial terapéutico anti-inflamatorio de diferentes vegetales y su bajo costo, determinan en muchos casos la predilección de su uso por la sociedad. (3) (4) (5).

Las investigaciones por parte del Dr. David Achig, respecto a la utilización terapéutica de distintas plantas, según los conocimientos y criterios ancestrales de la Medicina Tradicional China con homología a la medicina Andina constituyó una guía de importante utilidad, pues tomando en consideración esta similitud, y la bibliografía disponible, en este estudio se han escogido plantas medicinales utilizadas por grupos poblacionales de la zona Austral Ecuatoriana para diferentes dolencias, siendo la inflamación una de las principales sintomatologías en las que se emplea preparaciones tópicas o infusiones con fines medicinales (anti-inflamatorio).

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar la actividad anti-inflamatoria de los extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos de *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguetia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum aff. peruvianum*, *Cestrum sp.* y *Uncaria tomentosa* usando el modelo de peces cebras (*Danio rerio*), con el fin de dar un respaldo científico de su uso por la población.

CAPÍTULO 1

1 MARCO TEÓRICO

1.1 PLANTAS MEDICINALES

1.1.1 DEFINICIÓN

Se denomina planta medicinal a todo vegetal que contiene en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser utilizados con fines terapéuticos o preventivos o como prototipo para nuevos fármacos por síntesis o hemisíntesis farmacéutica. (6)

La parte de la planta que contiene el principio activo y que se utiliza con fin terapéutico se conoce como droga vegetal y puede ser suministrada a través de diferentes alternativas: cápsulas, comprimidos, emplastos, cremas, elixires, decocciones, infusiones, jarabes, pomadas, tinturas, entre otras. (5)

1.2 DESCRIPCIÓN BOTÁNICA Y FARMACOLÓGICA DE LAS ESPECIES UTILIZADAS

1.2.1 *Matricaria recutita* (Manzanilla)



Figura 1: *Matricaria recutita*

1.2.1.1 Familia

Asteraceae.

1.2.1.2 Nombres comunes

Manzanilla, manzanilla de Castilla, manzanilla oficial. (7)

1.2.1.3 Descripción Botánica

La manzanilla es una planta anual, de 50 cm de alto. El tallo es muy ramificado es algo erecto, redondo y hueco. Las hojas son alternas y finamente divididas. Las flores son hermafroditas, asociados en capítulos con largos pedúnculos puestos sobre un receptáculo vacío y las flores externas tienen la lígula blanca mientras las flores interiores son tubulosas con corola amarilla. (8)

1.2.1.4 Fitoquímica

Contiene aceite esencial (camazuelo, matricina y azuelo o azuléina), sesquiterpenos cíclicos (óxidos de alfa-bisabolol y de alfa-bisabolona), cumarinas (umbeliferona, herniarina y camilina), glucósidos derivados del apigenol (cosmosiósido), del luteolol (luteolósido), y del quercetol (quercetomeritrósido) y flavonoides (derivados de la apigenina, del quercetol, de la luteolina), fitosteroles, principios amargos (ácido anthémico), mucílagos, taninos (tanatos), malatos y alcaloides (anthemidina). (9)

1.2.1.5 Usos Tradicionales

Se usa toda la planta en infusión, para dolores estomacales, cólicos intestinales, indigestión, irritación de la vista y para el lavado de úlceras y heridas, en las provincias de Imbabura, Pichincha y Tungurahua. Tiene propiedades antibacterianas, cicatrizantes, anti-inflamatorias y anti-fúngicas. (7) (10)

1.2.1.6 Partes usadas

Capítulos florales y toda la planta. (11)

1.2.2 Rosmarinus officinalis (Romero)



Figura 2: *Rosmarinus officinalis*

1.2.2.1 Familia

Lamiaceae.

1.2.2.2 Nombres comunes

Romero, romero de cerro. (7)

1.2.2.3 Descripción botánica

El romero es una especie arbustiva de pequeño porte, muy ramificado, de hojas perennes, que puede alcanzar hasta 1 m. de altura. Posee hojas lanceoladas, espesas, coriáceas, verde oscuro, de pequeños tamaños y muy abundantes. Las flores son pequeñas, de color azul vivo o violeta claro, de 5 mm de largo. La planta desprende un fuerte olor alcanforado. (12)

1.2.2.4 Fitoquímica

Las hojas y los frutos contienen un aceite esencial, representando 1.9% del peso de la planta desecada. Se han identificado en este aceite al menos veinte

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

sustancias, que representan el 99.93% del volumen total. Las hojas de romero contienen principios amargos, constituidos por diterpenos (picrosalvina, carnosol, isorosmanol, rosmadial, rosmaridifenol, rosmariquinona) y triterpenos (ácidos oleanólico y ursólico, y sus 3-acetil-ésteres). Asimismo, en su composición se encuentran flavonoides (cirsimarina, diosmina, hesperidina, homoplantiginina, fegopolina, nepetina y nepitrina) y polifenoles (ácido rosmarínico, ácido clorogénico, ácido cafeico y ácidos fenólicos derivados del ácido cinámico). (13)

1.2.2.5 Usos tradicionales

La infusión de hojas o de la planta entera de romero se usa para la irritación de la vista, lavados vaginales, problemas estomacales y de los nervios, infecciones de la piel, afecciones del abdomen y del hígado, en las provincias de Bolívar, Chimborazo y Pichincha, para la menstruación retrasada, y el cólico menstrual, en la provincia de Loja. (7) (10)

1.2.2.6 Partes Usadas

Se puede usar las flores, hojas y toda la planta en diferentes preparaciones. (12)

1.2.3 Aristeguietia glutinosa (Matico)



Figura 3: *Aristeguietia glutinosa*

1.2.3.1 Familia

Asteraceae.

1.2.3.2 Nombres comunes

Matico, hierba del soldado, matico silvestre, melga, migla. (7)

1.2.3.3 Descripción botánica

Se trata de un arbusto perenne que alcanza una altura de 2 a 3 metros. Presenta ramas grises, hojas aromáticas opuestas de color verde brillante, de 7 a 10 cm de largo por 2.5 -3.5 de ancho con bordes dentados y envés claro. Las flores son tubulares, en espigas solitarias, de tonalidad morada. El fruto es de color negro y contiene una semilla pequeña oscura en su interior. Esta planta es nativa de la sierra del Ecuador, crece al borde de caminos, entre los matorrales y plantaciones de piretro en la región interandina del Ecuador, entre 3000 a 3700 m sobre el nivel del mar. (14)

1.2.4 Fitoquímica

El componente activo más importante del matico es el tanino que se encuentra en una concentración del 5.7%, al cual se le atribuye las propiedades cicatrizantes. También contiene cumarinas, flavonoides, esteroides, alcaloides, triterpenos, saponinas y fenoles. (15)

1.2.4.1 Usos tradicionales

Las hojas en infusión se usan para tratar inflamaciones, infecciones, heridas, desordenes del sistema digestivo, contra venenos, desordenes de la piel, del sistema respiratorio, del sistema urogenital, del sistema musculo esquelético, gestación, parto, postparto, del sistema nervioso y del sistema circulatorio, en las Provincias de Tungurahua, Azuay y Cañar (7)

1.2.4.2 Partes Utilizadas

Se puede utilizar las hojas, las flores, los tallos de la planta.

1.2.5 *Urtica Urens* (Ortiga)



Figura 4: *Urtica urens*

1.2.5.1 Familia

Urticaceae.

1.2.5.2 Nombres comunes

Ortiga, ortiga blanca. (7)

1.2.5.3 Descripción botánica

Hierba anual puede llegar a medir hasta un metro. El tallo es erecto y leñoso cubierto de pelos urticantes. Posee hojas pequeñas, ovales, dentadas, cubiertas de pelos. Flores de color verde en inflorescencia. (16) (17)

1.2.5.4 Fitoquímica

Contiene aceite esencial (cetonas, esteroides y alcoholes libres), carotenoides (betacaroteno, xantófilos, xantofila epóxido, licopeno, violaxantina), vitaminas (ácido pantoténico, vitamina B12, vitamina K1 y ácido fólico), sitosterol, mucílago, taninos, enzimas, glucocininas (secretina), nitratos y sales de hierro. Los pelos

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

urticantes contienen acetilcolina, histamina, colina, ácido acético y ácido fórmico el cual es responsable de la irritación cutánea. La raíz contiene una considerable cantidad de taninos y es astringente. (9)

1.2.5.5 Usos tradicionales

La infusión de las hojas se usa para lavar el tracto urinario, para aumentar la producción de leche y para tratar el asma, hemorroide y diarrea. Se usa para tratar dolores fuertes, desordenes digestivos, afecciones del hígado, renales y piel, en las provincias de Imbabura y Loja. (7)

1.2.5.6 Partes usadas

Se puede utilizar toda la planta o solo las raíces, hojas.

1.2.6 *Cestrum*



Figura 5: *Cestrum sp* (saúco blanco)



Figura 6: *Cestrum aff. peruvianum* (saúco negro)

1.2.6.1 Familia

Solanaceae.

1.2.6.2 Nombres comunes

Saúco, saúco blanco, saúco negro. (7) (10)

1.2.6.3 Descripción botánica

Arbusto de dos metro de alto, hojas alternadas enteras, lanceoladas, frutos en bayas negros a maduración. (10)

1.2.6.4 Fitoquímica

Las hojas contienen saponinas, triterpenos, además contienen pequeñas cantidades de un glucoalcoloide llamado salanina. (10)

1.2.6.5 Usos tradicionales

La infusión de las hojas se usa para tratar afecciones de riñones y la tos, en la provincia de Chimborazo, se usa para tratar el dolor de muela, en la provincia de Azuay. Las hojas y las flores se usan para tratar la fiebre y la inflamación, en las provincias de Azuay, Cañar y Loja. (7)

1.2.6.6 Partes usadas

Se puede usar las hojas, las flores.

1.2.7 *Uncaria tomentosa* (Uña de gato)



Figura 7: *Uncaria tomentosa*

1.2.7.1 Familia

Rubiaceae.

1.2.7.2 Nombres comunes

Uña de gato, Eygawe (wao tededo), kenkuk (shuar chicham). (7)

1.2.7.3 Descripción botánica

Es un arbusto trepador o enredadera de hasta 20 m de longitud con ramas cuadrangulares y tallos con espinas leñosas de unos 20 cm de largo hacia abajo, las hojas son oblongo-ovadas, de hasta 15 cm de longitud y la mitad de ancho, pecioladas y de color verde amarillento, más pálido en el envés, que es tomentoso en la especie *Uncaria tomentosa*. Las flores son sésiles, amarillentas, con una corola infundibuliforme pentalobulada, y se agrupan en inflorescencias axilares racimas, con 4 o 5 cabezuelas de flores de unos 2 cm.

El fruto es oblongo o discretamente aovado, con dos valvas. La *Uncaria tomentosa* tiene el líber rojizo, y se denomina “garabato colorado”. (9)

1.2.7.4 Fitoquímica

Alcaloides oxidólicos (pteropodina, rinchofilina, isorinchofilina, isomitrafalina, dihidrocorinanteína y uncarinas), glucósidos del ácido quinóico, esteroides vegetales (beta-sitosterol, estigmasterol y campesterol), polifenoles y triterpenoides. (9)

1.2.7.5 Usos tradicionales

La infusión de la corteza se usa para tratar el dolor de cabeza, fortalecer el sistema inmune, gastritis, úlcera y cáncer de próstata, en la provincia de Zamora Chinchipe. La corteza se usa para tratar la diabetes y afecciones de los riñones, en la provincia de Orellana. (7)

1.2.7.6 Partes usadas

Se puede utilizar las hojas, la corteza. (7)

1.3 INFLAMACIÓN

La inflamación es una respuesta defensiva, inespecífica del organismo ante una lesión tisular. Entre las causas tenemos: gérmenes patógenos, abrasiones, irritación química, trastornos celulares, entre otros. (18)

Es una respuesta rápida y ampliada, controlada humoral y celularmente (cininas, coagulación, leucotrienos y complemento) y desencadenada por la activación conjunta de fagocitos y células endoteliales. En ella se activan una secuencia de procesos bioquímicos que producen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación/adhesión celular e hipercoagulabilidad. (18)

Históricamente la inflamación ha sido identificada mediante la observación de los signos y síntomas que la caracterizan: rubor, dolor, calor, tumefacción y pérdida

de la función, signos y síntomas debidos a la vasodilatación y al el incremento de la permeabilidad microvascular en el lugar de la inflamación. (19)

Los cambios que tienen lugar en los tejidos durante la respuesta inflamatoria se dividen en fenómenos vasculares y celulares. (20)

1.3.1 Fenómenos Vasculares

1.3.1.1 Cambios en el flujo sanguíneo y en el calibre de los vasos:

- Vasoconstricción transitoria que suele durar pocos segundos.
- Vasodilatación que inicia posteriormente y afecta inicialmente las arteriolas y que da lugar a la apertura de nuevos lechos capilares en la zona de la lesión.
- Aumento del flujo sanguíneo, lo cual produce el aumento del calor en la zona y el eritema de la misma.
- Lentificación o retraso de la circulación, esta se debe al aumento de la permeabilidad de la microvasculatura con salida de líquido rico en proteínas desde la circulación hasta los tejidos extravasculares. (20)

1.3.1.2 Aumento de la permeabilidad vascular:

Ocasiona la salida de un flujo rico en proteínas (exudado) y mediadores del plasma hacia el intersticio es la característica principal y de mayor especificidad de la inflamación aguda. La pérdida de las proteínas del plasma reduce la presión osmótica intravascular e incrementa la presión osmótica del líquido intersticial. Junto al aumento de la presión hidrostática secundaria a la vasodilatación, este mecanismo conduce a una importante salida y acumulación de líquido en el tejido intersticial constituyendo el edema. (20)

1.3.2 Fenómenos Celulares

De las células que participan en el proceso inflamatorio tenemos unas que se encuentran en el mismo tejido (células endoteliales vasculares, mastocitos y

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

macrófagos tisulares) y otras procedentes de la sangre que acuden a la zona de la inflamación (plaquetas y leucocitos). (20)

1.3.2.1 Leucocitos

La extravasación de los leucocitos está orquestada por la acción conjunta de receptores de adhesión celular y factores quimiotácticos, e implica cambios morfológicos drásticos tanto en leucocitos como en células endoteliales. De este modo, constituye un proceso activo para ambos tipos celulares que promueve la rápida y eficiente llegada de los leucocitos a los focos inflamatorios sin comprometer la integridad de la barrera endotelial. (20)

1.3.2.2 Basófilo

Contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores. Al estimularse se degranula y excreta el contenido de sus gránulos al entorno, por ejemplo histamina, que provoca una reacción inmediata: vasoconstricción, y promueve la permeabilidad vascular, por lo que más neutrófilos y eosinófilos podrán llegar allí al sitio de la inflamación. (21)

1.3.2.3 Neutrófilo

Son los primeros leucocitos en llegar a la zona de inflamación, este proceso se controla mediante la activación sucesiva de moléculas de adhesión.

Elimina al germen mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos y produciéndole, así, una muerte extracelular. Muchos de los neutrófilos mueren en los lugares de inflamación liberando las enzimas que pueden desestabilizar las células o las proteínas de la matriz extracelular. (22) (23)

1.3.2.4 Monocito/Macrófago

Células que llegan varias horas después a las zonas inflamadas. El monocito, presenta idénticas funciones a las señaladas para el neutrófilo. Actúa además, como célula presentadora del antígeno a las células específicas T y B, iniciando, de esta forma, la respuesta específica. (24)

El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la interleucina 1 (IL-1) y determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de Prostaglandina E en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo, también activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación. (20)

1.3.2.5 Linfocitos T y B

Potenciados por el macrófago inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan IgE, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas, sustancias que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada. (25)

1.3.2.6 Eosinófilo

Son células fagocitarias que demuestran especial afinidad por los complejos antígeno-anticuerpo, por lo que la mayoría de los eosinófilos son atraídos por quimiotaxis. Ayudan a la defensa del huésped frente a microorganismos no fagocitables, poseen una función citotóxica (por sus proteínas granulares), inmunoreguladora (por las citocinas que libera) y son capaces de participar en la reparación y remodelación tisular. (20)

1.3.2.7 Mastocitos o células cebadas

Son células productoras y almacenadoras de histamina, heparina, leucotrienos y Factor Activador de Plaquetas, presentando receptores para una clase especial de

anticuerpos, inmunoglobulina E y para los componentes del complemento C3a y C5a. (20)

1.3.2.8 Plaquetas

Son unas de las primeras células que se acumulan en los sitios de daño tisular, liberando factores que inician una cascada inflamatoria que atrae a leucocitos, activa células blanco y estimula el crecimiento y reparación del vaso dañado. (26)

1.3.2.9 Neuronas

Las neuronas ante un estímulo adecuado liberan neuropéptidos en concreto las taquicininas (Neurocinina A y sustancia P) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). (20)

1.3.2.10 Células endoteliales vasculares

Las células endoteliales de las arteriolas pequeñas secretan óxido nítrico, el cual causa relajación del musculo liso adyacente, aumentando la permeabilidad vascular. Intervienen en la angiogénesis la cual determina la posterior conclusión de la inflamación. (20)

1.3.3 Mediadores de la Inflamación

Entre las sustancias que participan en el proceso inflamatorio se destacan:

1.3.3.1 Histamina

Es liberada por los mastocitos, basófilos, neuronas histaminérgicas u otras células, que unido a cierto receptor de histamina: H1, H2, H3 o H4, presentarán los efectos en los diferentes tejidos, entre ellos producen vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular, los fármacos que aumentan la síntesis de AMPc inhiben la secreción de histamina. (27)

1.3.3.2 Cininas

Son originadas en el plasma a partir de los cininógenos, al final el metabolito principal en cual se transforman es la bradisinina cuyos efectos principales son la contracción de diferentes tipos de musculo liso, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, activación de la fosfolipasa A2 y la posterior activación del ácido araquidónico formador de prostaglandinas y sirven de agentes quimiotácticos para los fagocitos (28), también estimula receptores del dolor en la piel, para que el individuo proteja el área dañada. (20)

1.3.3.3 Prostaglandinas

Hormonas de origen lipídico, derivadas del ácido graso esencial linoleico, el cual se convertirá por reacción en prostanoico y de allí a prostaglandina.

Potencializan los efectos de las cininas y de la histamina, debido a su efecto vasodilatador e hipotensor, al mismo tiempo participan de esta manera en la migración fagocítica a través de las paredes capilares. Estas pueden ser de distinto tipo:

- PGE1: efecto antiagregante plaquetario y vasodilatadora coronaria.
- PGE2, D2 e I2: potentes vasodilatadores, moduladores en la hemodinamia renal. (20)

1.3.3.4 Leucotrienos

Originados a nivel de mastocitos y basófilos, los cisteinil leucotrienos regulan la contracción del músculo liso, vasodilatación consecuente, aumento de permeabilidad vascular y quimiotaxis de neutrófilos. Los leucotrienos estimulan el movimiento de todos los subgrupos de leucocitos hacia los diferentes tejidos del organismo y la respuesta inflamatoria mediada por células Th2, participando en la adhesión de los fagocitos a los patógenos. (29)

1.3.3.5 Factores del complemento

Cuando el complemento, siguiendo una u otra vía, alcanza la vía común produce la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C3a y C5a, actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáxico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis (21)

1.3.3.6 Óxido nítrico

Se genera mediante la acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), enzima de la que existen tres formas. Dos de ellas, son formas constitutivas (cNOS) que se expresan normalmente en las células endoteliales y en las células nerviosas, y una de ellas, el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), se induce en los tejidos en respuesta a los estímulos inflamatorios. La inducción de la iNOS en los tejidos puede conducir a la producción sostenida de altas concentraciones de NO, que puede ejercer efectos proinflamatorios como vasodilatación, edema y citotoxicidad, así como mediar en procesos dependientes de citoquinas. (20)

1.3.3.7 Factor activador de las plaquetas (FAP)

Es un mediador derivado de fosfolípidos, que puede producir efectos a dosis extremadamente bajas. Se encuentra en plaquetas, mastocitos, basófilos, PMN, monocitos, macrófagos y células endoteliales, se sintetiza a partir de su precursor, acil - PAF. Sus acciones principales son:

- Participa en la agregación plaquetaria.
- Vasodilatación local y aumento de la permeabilidad
- Activación de la síntesis de eicosanoides. (20)

1.4 MODELOS ANIMALES UTILIZADOS PARA ESTUDIO DEL PROCESO ANTI-INFLAMATORIO

El empleo etnofarmacológico de plantas en el manejo de procesos inflamatorios, promueven la evaluación de actividad anti-inflamatoria de sustancias en modelos in vivo. (30)

Entre los modelos más utilizados para evaluar esta actividad farmacológica in vivo se reportan los siguientes:

- Edema subplantar inducido por carragenina en ratas Wistar para procesos agudos. (31)
- Edema auricular inducido por acetato de tetradecanoilforbol (TPA) en ratón albino ICR. (30) (32)
- Granuloma inducido por algodón en ratas Wistar para procesos crónicos. (31)
- Determinación IL-10, iNOS o Apc COX-2 que permiten estudiar el comportamiento de ciertas proteínas en el proceso inflamatorio o tumoral. (33)
- Agregación Plaquetaria. (34)
- Migración Leucocitaria en el modelo biológico de pez cebra (*Danio rerio*). (35)

1.4.1 MODELO DE PEZ CEBRA (*Danio rerio*)

El pez cebra (*Danio rerio*) es un pez pequeño y activo nativo de la India que suele habitar los ríos de Asia central, que hace poco más de 30 años fue introducido como especie modelo para la investigación en el campo de la biología del desarrollo y genética. Genéticamente, el pez cebra es más similar a la especie humana que la mosca del vinagre o el gusano y es más fácil de manipular, mantener y criar que el ratón. (36)



Figura 8: *Danio rerio*

1.4.1.1 Familia

Cyprinidae (37)

1.4.1.2 Genero

Danio

1.4.1.3 Especie

Rerio

1.4.1.4 Nombre común

Cebra, Danio cebra, Cebritita

1.4.1.5 Dimorfismo sexual

Macho con forma alargada, hembra más redondeada. (37)

1.4.1.6 Mantenimiento

Entre las condiciones ideales para el mantenimiento de los peces cebra tenemos: temperatura del agua de 26-28°C y del aire entre 27-29°C para evitar la

condensación; pH alrededor de 6.8-7.5; iluminación ciclo luz/oscuridad: 14/10 horas. (38)

1.4.1.7 Alimentación

Son omnívoros, los adultos deben alimentarse de 1-2 veces al día con toda clase de alimentos, como comida comercial para peces tropicales, para peces carnívoros y herbívoros, comida viva como artemia. (37)

1.4.1.8 Reproducción

Es uno de los ovíparos más sencillos de reproducir, dos hembras por cada macho. Las hembras depositan los huevos entre las plantas del acuario, generalmente al inicio de la mañana, e inmediatamente los machos depositan el esperma para fecundarlos (37)

1.4.1.9 Genoma

El genoma del pez cebra tiene un tamaño de 1.7 gigabases de ADN, que es aproximadamente la mitad del tamaño de los tetrápodos, como los humanos y los ratones. Tiene 25 cromosomas haploides (1n), no se conoce todavía el número de genes totales del pez cebra (39) (38)

1.4.1.10 Desarrollo

1.4.1.10.1 Día 1

Período de Cigoto 0 - 3/4 horas post-fertilización (hpf)

Inicia con la fertilización del ovocito y termina con la primera división celular. (38)

Período de División (3/4 - 2 ¼ hpf)

Empieza con la primera división celular hasta la etapa embrionaria de 64 células. Los blastómeros se dividen sincrónicamente. (38)

Período de Blástula (2 ¼ - 5 ¼ hpf)

Inicia con la etapa embrionaria de 128 células y termina al iniciar la gastrulación, incluye la transición Midblástula (MBT) en torno a la etapa embrionaria de 512 células. (38)

Epibolia

Inicia tras el período de blástula, aquí las células internas del blastodermo migran para cubrir las células superficiales completamente. La CSV (Capa Sincitial Vitelina) y la capa de la envoltura provocan este movimiento al expandirse. Un lado del blastodermo se engrosa, marcando el sitio de la futura superficie dorsal del embrión. (38)

Período de Gástrula

Caracterizada por movimientos morfogenéticos de la célula en involución, convergencia y extensión, generando tres capas germinales primarias y los ejes embrionarios. Comienza la formación de la placa neural en el lado dorsal del embrión, lo que originará el cerebro. (38)

Período de Segmentación

Se forman los somites y se visualizan los primeros rudimentos de órganos internos y un esbozo de cola. Al final de este período las primeras células terminan de diferenciarse y aparecen los movimientos corporales, el cerebro aún no está adecuadamente estructurado. (38)

1.4.1.10.2 Día 2

Período Faríngeo (24 – 48 hpf)

El período debe su nombre a los siete arcos faríngeos, los dos primeros dan lugar a la mandíbula, y los cinco posteriores forman las branquias. El embrión tiene bien desarrollado el SNC (sistema nervioso central), el cerebro muestra todas las

subdivisiones principales (cinco lóbulos) y se ha completado la somitogénesis, la cola del embrión se endereza y crece rápidamente, la cabeza se acorta y el ángulo entre la cabeza y el cuerpo es de sólo aproximadamente 50°. Las características adicionales incluyen: células pigmentadas melanóforos (negro), xantóforos (amarillo), y iridióforos (pececillo de plata iridiscente), aletas, el sistema cardiovascular (se detectan los primeros latidos y se puede ver circular la sangre por las arterias y venas), así como los primeros rasgos de comportamiento, como movimientos de natación. (38)

1.4.1.10.3 Día 3

Período de Eclosión (48 – 72 hpf)

La mayoría de órganos rudimentarios casi han terminado la morfogénesis y su desarrollo se ralentiza considerablemente. Se desarrolla la mandíbula, los arcos branquiales y las aletas pectorales. (38)

1.4.1.10.4 Período de Larva Temprana 3 - 7dpf (días post-fertilización)

La mayor parte de la morfogénesis en el pez cebra en desarrollo está completa, y comienza a aumentar de tamaño. Al cuarto día se infla la vejiga natatoria; la boca, sigue creciendo más dorsal y anterior. La pigmentación iridiófora aumenta en la superficie. El intestino se traslada más ventralmente. Las larvas comienzan a nadar activamente, mostrando sus primeros movimientos activos de las aletas pectorales, la mandíbula, aletas operculares y los ojos. Además se observan respuestas de escape, movimientos de respiración, y comienzan a buscar y comer su alimento (38)

1.4.1.11 Ventajas del Pez Cebra como Modelo Biológico

Entre las ventajas de usar este modelo biológico tenemos:

- Homología genética, fisiológica y farmacológica entre pez cebra y humanos.

- Tamaño pequeño y transparencia, lo cual facilita tanto el mantenimiento como la visualización de los ensayos.
- Alta tasa de reproductibilidad.
- Bajo costo (35)

Las ventajas de usar el pez cebra en inflamación son:

- Poseer un sistema inmune parecido al de los mamíferos, incluido la presencia de macrófagos, eosinófilos y neutrófilos. (40)
- Presencia temprana de varios tipos de células hematopoyéticas (linfocitos, monocitos/macrófagos y neutrófilos) en el desarrollo embrionario de peces cebra. (41) Los neutrófilos (heterófilos) en el pez cebra son identificables a partir de aproximadamente 48 horas después de la fertilización y el sistema inmune innato existe en forma aislada de cualquier sistema adaptativo, cosa que no se plantea hasta aproximadamente 4 semanas después de la fecundación. (42)
- La fácil identificación de los neutrófilos en peces cebra mediante la enzima mieloperoxidasa (MPO). (41)

CAPITULO 2

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 MATERIALES

Solventes: Los solventes utilizados fueron etanol al 70% y cloroformo.

Reactivos:

- Danieau's 0.3X
- PTU 10X (feniltiourea)
- DMSO (dimetilsulfóxido)
- Piroxicam 50 μ M
- LPS 1mg/ml (lipopolisacárido)
- Tricaína 50X
- PFA 4% (paraformaldehído)
- PBST 1X (buffer fosfato salino + Tween 20)
- Kit Leucognost® Pox (Merck)

Equipos:

- Horno de secado Pro 3
- Rotavapor Laborota 4000 Eficient HB digit
- Baño ultrasónico Cole-Palmer 8893-21
- Biofreezer Dairei Freezeer
- Concentrador al vacío RapidVap LABCONCO
- Estufa
- Estereomicroscopio

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

2.2 METODOS

2.2.1 MUESTRAS VEGETALES

Algunas muestras fueron compradas en puestos específicos de plantas medicinales del Mercado 10 de Agosto de la ciudad de Cuenca (*Matricaria recutita*, *Urtica urens*); otras, fueron colectadas en las Parroquias de Molleturo (Latitud:-2.70Longitud: 79.43) (*Aristeguietia glutinosa*) y Miraflores (*Rosmarinus officinalis*, *Cestrum aff. peruvianum*, *Cestrum sp*) y en la ciudad de Macas (*Uncaria tomentosa*). El material vegetal fue enviado al Herbario Azuay (HA) para su caracterización botánica, cuyos vouchers reposan en el mismo.

2.2.1.1 Selección

Para iniciar el procesamiento del material vegetal se procedió a la selección del mismo de acuerdo a las Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección de plantas medicinales. (43)

2.2.1.2 Lavado

Una vez seleccionadas las estructuras vegetales a ser utilizadas, se procedió al lavado con agua potable para remover cualquier residuo de tierra, polvo o sustancia extraña presente en la superficie de las mismas, se colocó en un recipiente con agua destilada cubriéndolas por completo por 10 minutos y finalmente se escurrió cada una de las plantas en cernidores plásticos.

2.2.1.3 Secado

El secado se llevó a cabo combinando dos métodos: al aire libre y con la utilización de un horno de secado. Se colocó la droga vegetal en capas delgadas sobre una malla metálica cubierta con papel periódico, previamente sanitizada con alcohol al 70%. Se secó por 24 horas a temperatura ambiente. Para el segundo método el material vegetal se colocó en el interior del horno de secado Pro 3 en

bandejas semejantes a las anteriormente descritas a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ hasta obtener peso constante, tiempo variable de acuerdo a la estructura vegetal.

2.2.1.4 Almacenamiento

La droga vegetal seca se guardó en fundas de papel periódico con su respectiva etiqueta: nombre científico, nombre común, fecha, peso y código.

2.2.2 OBTENCIÓN DE EXTRACTOS VEGETALES

Se pesó exactamente entre 10 y 15g de droga vegetal seca, se trituró (triturador Oster409) hasta obtener un tamaño homogéneo en toda la muestra. Se colocó en un vaso de vidrio sanitizado y seco, se humectó con el solvente de extracción (etanol y cloroformo), se dejó reposar por un período de 24 horas y se transfirió al percolador para obtener los extractos hidroalcohólicos y al embudo de decantación para el caso de los extractos clorofórmicos.

Extractos hidroalcohólicos: una vez colocada la muestra vegetal en el percolador se colocó el papel filtro, esferas de cristal y el solvente (etanol/agua 70/30 V/V) sobre la muestra. La cantidad de solvente utilizada fue variable hasta observar que cubra la misma entre 2 a 3 cm. Se tapó con papel aluminio y se procedió a la maceración por 24 horas. Transcurrido el período de tiempo establecido se procedió a la percolación con una velocidad de salida de XX por minuto, se adicionó nuevamente pequeñas alícuotas del disolvente empleado hasta obtener un volumen total de 250 ml y se colocó directamente en el balón de fondo redondo para su posterior concentración. (44)

Extractos clorofórmicos: una vez colocada la muestra vegetal en el embudo de decantación se colocó el papel filtro, esferas de cristal y el solvente (cloroformo) sobre la muestra. La cantidad de solvente utilizada fue variable hasta observar que cubra la misma entre 2 a 3 cm. Se tapó con papel aluminio y se procedió a la maceración por 24 horas. Transcurrido el período de tiempo establecido se procedió a la decantación con una velocidad de salida de XX por minuto, se

adicionó nuevamente pequeñas alícuotas del disolvente empleado hasta obtener un volumen total de 250 ml y se colocó directamente en el balón de fondo redondo para su posterior concentración.

2.2.3 CONCENTRACION DEL EXTRACTO VEGETAL

Los extractos vegetales hidroalcohólicos y clorofórmicos se transfirieron a balones de fondo redondo, los cuales se adaptaron al Rotavapor Laborota 4000 Efficient HB digit (Alemania), se esperó hasta que el solvente se haya eliminado completamente. Posteriormente se redisolvió el residuo seco adherido en la pared con la menor cantidad de solvente. Se transfirió a un tubo tapa rosca debidamente etiquetado.

El solvente restante se eliminó con una corriente continua de N₂ en un baño ultrasónico Cole-Palmer 8893-21 (Vernon Hills, Illinois), a 40°C, hasta obtener un volumen de 4 - 5ml.

2.2.4 Liofilización

Los extractos hidroalcohólicos secos obtenidos se re-disolvieron en aproximadamente 20 ml de agua destilada, se transfirieron a tubos de liofilización previamente pesados y rotulados, se llevaron a congelación (-80°C) en el biofreezer Dairei Freezeer, girando los tubos constantemente para permitir la formación de una película uniforme alrededor del tubo por aproximadamente 15-20 minutos.

Se procedió a cargar las muestras en el Liofilizador Labconco 7670520 (Labconco, Kansas, Missouri) a una presión de 0.080 milibar y a una temperatura de -48°C y se dejó por 22-24 horas hasta obtener el extracto seco, transcurrido este tiempo se retiraron los tubos. El extracto seco obtenido se pesó y transfirió a un tubo tapa rosca debidamente etiquetado. Los pesos obtenidos se relacionaron con el peso de droga seca (15 g) para el posterior cálculo del rendimiento de los extractos secos.

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

2.2.5 Concentración al vacío

Los extractos clorofórmicos obtenidos se transfirieron a tubos de tapa rosca previamente sanitizados, secos y debidamente etiquetados, se colocaron en el concentrador al vacío RapidVap LABCONCO (velocidad de 58%, temperatura de $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ y presión de vacío de 684 milibar) de forma paralela y de par en par, durante 5-6 horas; luego de este tiempo se retiraron los extractos secos, se taparon y almacenaron en el biofreezer a -80°C hasta su utilización.

2.3 TOXICIDAD DE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS CON ACTIVIDAD ANTI-INFLAMATORIA EN LARVAS DE PECES CEBRA

2.3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

2.3.1.1 Pre-tratamiento

Se colectaron los embriones de peces cebra y bajo luz del estereo-microscopio se seleccionaron aquellos fértiles, colocándolos en una caja de petri con un volumen adecuado de 0.3X Danieau's (caja 90mm: máximo 150 embriones con 30 ml de medio: caja 150mm: máximo 250 embriones con 50 ml de medio) y se incubaron por 24 horas a 28°C . Al día siguiente (larvas 1dpf) se revisaron, se retiraron aquellas larvas no viables y se procedió al cambio de medio de mantenimiento (Danieau's 0.3X), esta vez con adición de feniltiourea 10X (concentración de PTU en el medio $100\mu\text{M}$). Desde el día 2 al día 4 se repitió el proceso realizado el día 1. Una larva tratada de esta manera se muestra en la figura 15 .El día 5 (larvas 5dpf) se llevó a cabo el ensayo de toxicidad.

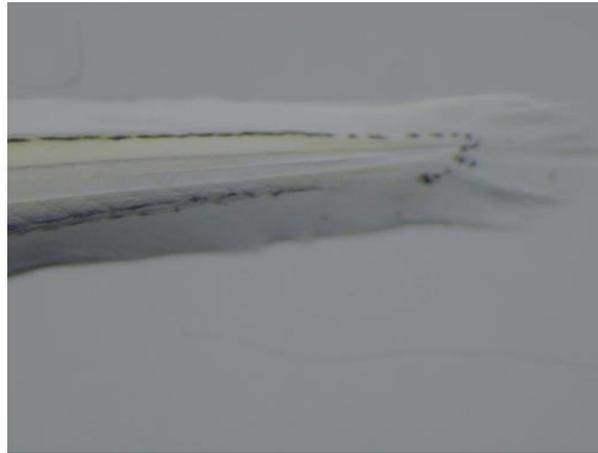


Figura 9: Larva 5 dpf pre-tratada con PTU

2.3.2 PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA EL ENSAYO DE TOXICIDAD

Se prepararon soluciones stock de cada uno de los extractos a analizar partiendo de una concentración madre de 20 mg/ml (100% DMSO). Se prepararon soluciones de prueba desde 200 ug/ml diluyéndolas a la mitad sucesivamente hasta 6.25 ug/ml (1% DMSO).

2.3.2.1 Ensayo de toxicidad de los extractos

El presente ensayo se realizó con el fin de determinar la concentración máxima tolerable (CMT), definiéndola como la concentración de extracto a la cual no se observaron signos de toxicidad en las 6 de las 6 larvas de cada pocillo, tras incubación de 24 horas.

Se colocaron en cada uno de los pocillos de la placa de cultivo (24 pocillos) 6 larvas de peces cebrá 5 dpf pre-tratadas, se retiró todo el líquido (0.3X Danieau's) presente en cada pocillo evitando maltratar a las larvas, y se colocó 1 ml de las

concentraciones del extracto a probar. También se colocó un control negativo o referencia, para ello se utilizaron también 6 larvas 5dpf pre-tratadas pero se adicionó 1ml de 0.3X de Danieau's con 1% DMSO. Se incubó la placa por 24 horas a 28°C, revisándola cada hora durante las primeras 8 horas para observar señales de toxicidad:

- Deformación de cola y/o eje antero-posterior
- Aumento/disminución del latido cardíaco
- Aumento/disminución del movimiento normal
- Edema pericárdico
- Muerte

2.3.3 ENSAYO IN VIVO DE MIGRACIÓN LEUCOCITARIA

2.3.3.1 Animales de experimentación

Para realizar este ensayo se prepararon las larvas de igual forma que para el ensayo de toxicidad.

2.3.3.2 Ensayo de migración leucocitaria

Dicho ensayo se divide en 3 etapas descritas a continuación:

2.3.3.2.1 Pre-incubación (1hora)

Una vez determinada la concentración máxima tolerable de cada uno de los extractos se procedió a probar su actividad anti-inflamatoria a través del ensayo de migración leucocitaria inducido por lipopolisacárido de *Salmonella typhosa*.

Se transfirieron 10 larvas 5dpf a cada uno de los pocillos de la caja de cultivo de 24 pocillos. Se retiró todo el líquido del primer pocillo de la caja de cultivo y se adicionó 1 ml de la solución Control Negativo (0.3X Danieau's, 1% DMSO). Se anotó la hora de incubación. Transcurridos 10 minutos se retiró todo el líquido del segundo pocillo y se adicionó 1 ml de solución de Control Positivo (Piroxicam 50

μ M preparado en 0.3X Danieau's). Nuevamente, luego de 10 minutos se retiró el líquido del tercer pocillo y se adicionó 1 ml de extracto hidroalcohólico o clorofórmico (según el caso) de la concentración máxima tolerable determinada anteriormente. Se repitió el proceso hasta completar con todos los extractos disponibles para el día.

2.3.3.2 Corte de las colas e incubación final (7 horas)

Completada la pre-incubación en el primer pocillo, se retiraron todas las larvas y el líquido colocándolas en una tapa de caja petri. Se adicionó 1 a 2 gotas de Tricaína 50X, se agitó ligeramente con movimientos circulares y se esperó un minuto. Se colocó la caja en la platina del estero-microscopio y con ayuda del bisturí se realizó el corte de cola en la zona terminal del cordón de circulación interno cada una de las 10 larvas como se indica en la Figura 10.

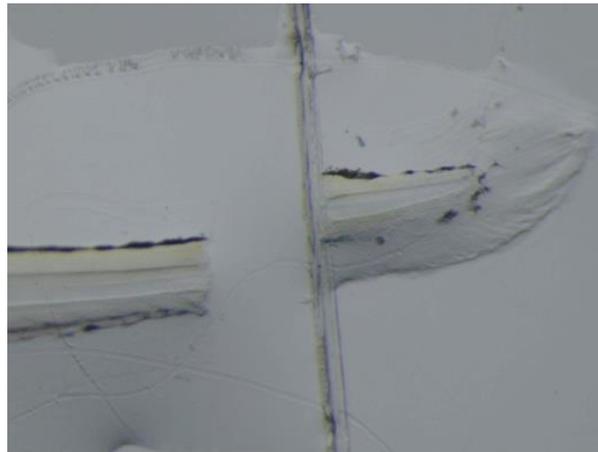


Figura 10: Larva 5 dpf pre-tratada con PTU, después del corte

Terminado el corte se colocaron todas las larvas nuevamente en el primer pocillo y se retiró todo el líquido remanente (con tricaína). Se adicionó 1 ml de 0.3X Danieau's para lavar el exceso de tricaína, agitando levemente la placa con movimientos circulares y al cabo de unos minutos se retiró el volumen de 0.3X Danieau's y se lavó nuevamente (este paso se repite tres veces).

Se adicionó 1 ml de las concentraciones de los controles negativo, positivo y de los extractos usados anteriormente pero esta vez tanto los controles como los extractos contenían 10 µl de LPS 1mg/ml. Se procedió a incubar por 7 horas. Se repitió nuevamente el proceso hasta concluir con todas las muestra a probar ese día.

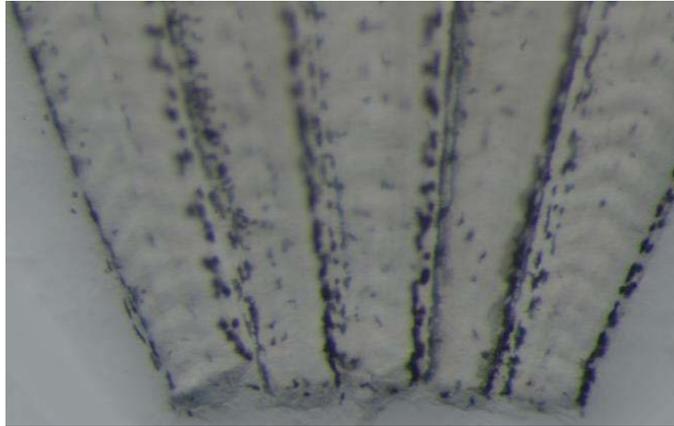
2.3.3.2.3 Tinción de mieloperoxidasa y evaluación de los resultados

Completadas las 7 horas de incubación en cada pocillo, se transfirieron las larvas desde los pocillos de la placa a viales eppendorf. Se retiró todo el líquido y se adicionó 500 µL de una solución de para-formaldehido (PFA) al 4% para fijar las larvas durante 15 minutos. Se retiró todo el PFA y se procedió a tres lavados usando 1 ml de una solución 1X de buffer fosfo-salino adicionada tween 20 (0.1% PBST) en cada uno. Se retiró todo el PBST de cada vial y se adicionó cuidadosamente por los bordes del vial 1 ml de la solución de tinción. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente sin agitar. Al cabo de 15 minutos, se pasaron las 10 larvas de cada vial a una tapa de una caja Petri, se las organizó y realizó el conteo de los leucocitos migrantes en la zona del corte de cola de cada larva como se presenta en la Figura 11. Finalmente se registraron los resultados para proceder a la evaluación estadística.

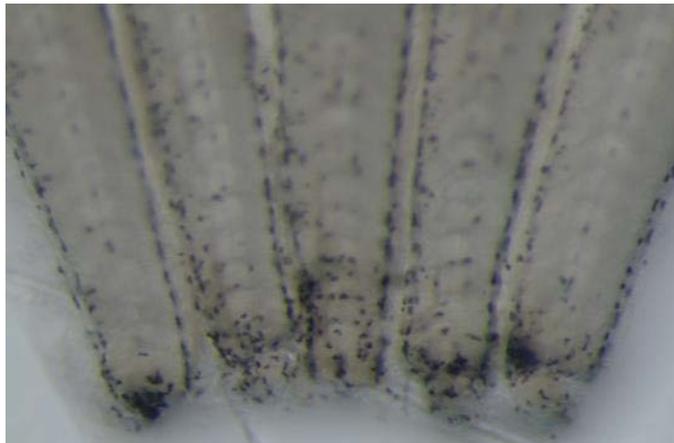
Preparación de la Solución de Tinción

Disolver el contenido de un frasco del reactivo 1 (4-cloro-1-naftol) en 15 ml de etanol y añadirlo a la cubeta de tinción redisolviendo, añadir 45 ml de agua destilada, 10 gotas del reactivo 2 (tampón tris (hidroximetil-aminometano)-HCl) y

dos gotas del reactivo 3 (solución de peróxido de hidrógeno); y homogenizar. La solución reactiva es incolora y es estable durante 3 horas.



Control Positivo



Control Negativo

Figura 11: Tinción de la mieloperoxidasa de un control positivo y negativo.

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico estuvo orientado a determinar la existencia de inhibición de migración leucocitaria con los extractos vegetales seleccionados. En el diseño experimental se consideró como unidad experimental al grupo de diez larvas de 5 dpf sometido a los diferentes tratamientos (control positivo Piroxicam 50 μ M, control negativo DMSO 1% y extracto vegetal a una determinada concentración). Como variables independientes se consideraron: día del experimento, muestra del extracto vegetal y concentración máxima tolerable expresada en μ g/ml; la variable dependiente fue la migración leucocitaria, medida en número de neutrófilos migrados a la zona de inflamación. En cada día de análisis fue necesaria la inclusión de 1 control negativo y 1 control positivo a fin de eliminar variaciones en el proceso y operador, así como las relacionadas con la temperatura del agua, temperatura del ambiente, tratamiento, tiempo de proceso que podrían influenciar en la variación de las larvas de día a día.

El análisis estadístico de los resultados experimentales se llevó a cabo con el software de libre distribución “R” versión 2.15.2 de 64 bits.

Como primer punto de análisis se consideró la validación de la técnica de medición de migración leucocitaria para la cual se consideraron las posibles diferencias entre las repeticiones del ensayo, empleándose un análisis de ANOVA. La determinación de la actividad de los extractos vegetales fue evaluada mediante el procedimiento de comparaciones múltiples de Tukey entre las muestras y los controles positivo y negativo para cada día del análisis; para lo cual se empleó el test HSD (Honestly Significant Difference) implementado en la librería de R “agricolae” con el nivel de confianza de 95% y que como resultado agrupa los tratamientos similares.

CAPÍTULO 3

3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Evaluación de la Concentración Máxima Tolerable (CMT) in vivo

Seis larvas 5 dpf fueron incubadas a 28°C (± 0.5), con varias concentraciones de los extractos vegetales a analizar (rangos desde 200 $\mu\text{g/ml}$ a 6.25 $\mu\text{g/ml}$), en este ensayo también se incluyó un control negativo (DMSO 1%).

Las larvas fueron observadas en el estereomicroscopio durante las primeras 8 y 24 horas de incubación, para observar cambios en la morfología y fisiología normal de las larvas.

Los resultados obtenidos se observan en la siguiente tabla:

Tabla 1: Concentración Máxima Tolerable (CMT) de los extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos.

Plantas	Extractos Hidroalcohólicos Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Extractos Clorofórmicos Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
<i>Matricaria recutita</i>	150	25
<i>Rosmarinus officinalis</i>	50	12.5
<i>Aristeguietia glutinosa</i>	12.5	12.5
<i>Urtica urens</i>	100	200
<i>Cestrum sp.</i>	12.5	100
<i>Cestrum aff. Peruvianum</i>	100	200
<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas y tallo herbario)	12.5	200
<i>Uncaria tomentosa</i> (tallo herbario)	25	200
<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas)	50	200

3.2 Ensayo in Vivo de Migración Leucocitaria

El ensayo de migración leucocitaria, se realizó en días diferentes empleando para cada día un control positivo, un control negativo y el extracto vegetal por triplicado.

Este estudio permitió clasificar las muestras de los extractos vegetales hidroalcohólicos y clorofórmicos en tres grupos según su actividad (migración leucocitaria): Grupo (a) no diferente al control negativo: sin actividad anti-inflamatoria; Grupo (b) no diferente al control positivo: activo; Grupo (c) diferente a los controles positivo y negativo: con actividad parcial. En este estudio no se clasificó ningún extracto hidroalcohólico ni clorofórmico en el grupo a.

Tabla 2: Clasificación de los extractos hidroalcohólicos según el ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido.

Grupo a	Grupo b	Grupo c
No se clasificó ningún extracto hidroalcohólico en este grupo.	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas y tallo herbario)
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	
	<i>Aristeguietia glutinosa</i>	
	<i>Urtica urens</i>	
	<i>Cestrum sp.</i>	
	<i>Cestrum aff. peruvianum</i>	
	<i>Uncaria tomentosa</i> (tallo herbario)	
	<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas)	

Grupo (a) no diferente al control negativo: sin actividad anti-inflamatoria; Grupo (b) no diferente al control positivo: activo; Grupo (c) diferente a los controles positivo y negativo: con actividad parcial.

Tabla 3: Clasificación de los extractos clorofórmicos según el ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido.

Grupo a	Grupo b	Grupo c
No se clasificó ningún extracto clorofórmico en este grupo.	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas y tallo herbario)
	<i>Rosmarinus officinalis</i>	<i>Uncaria tomentosa</i> (tallo herbario)
	<i>Aristeguietia glutinosa</i>	
	<i>Urtica urens</i>	
	<i>Cestrum sp.</i>	
	<i>Cestrum aff. peruvianum</i>	
	<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas)	

Grupo (a) no diferente al control negativo: sin actividad anti-inflamatoria; Grupo (b) no diferente al control positivo: activo; Grupo (c) diferente a los controles positivo y negativo: con actividad parcial.

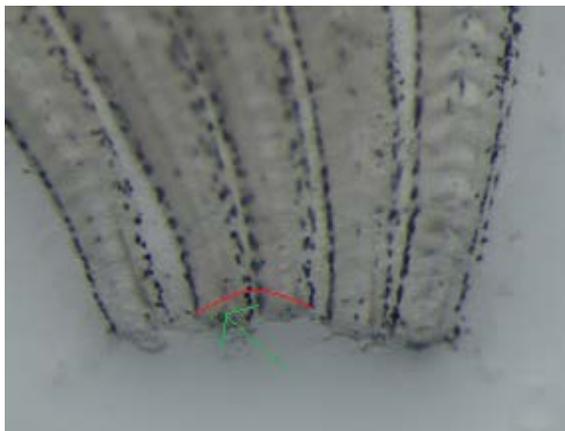
Tabla 4: Ensayo de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido de los extractos hidroalcohólicos.

Plantas	Control negativo		Control positivo		Extracto	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
<i>Urtica urens</i>	18.2	2.2010	3.7	2.7908	5.36	3.7553
<i>Cestrum aff. Peruvianum</i>	17.2	2.4855	5.8	1.7511	7.03	1.7904
<i>Aristeguietia glutinosa</i>	17.9	4.5570	3.6	2.3664	7.26	3.3418
<i>Matricaria recutita</i>	14.7	2.5407	5	1.1547	7.53	2.7634
<i>Cestrum sp.</i>	19.5	4.5521	8.3	2.3593	7.7	2.3915
<i>Rosmarinus Officinalis</i>	14.7	2.5407	5	1.1547	8.26	2.6643
<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas)	18.3	3.9171	4.7	1.6363	8.26	2.2273
<i>Uncaria tomentosa</i> (tallo herbario)	18.3	3.5916	4.3	2.5407	8.5	3.7393
<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas y tallo herbario)	15.4	3.7178	5.3	2.4060	10.43	2.4869

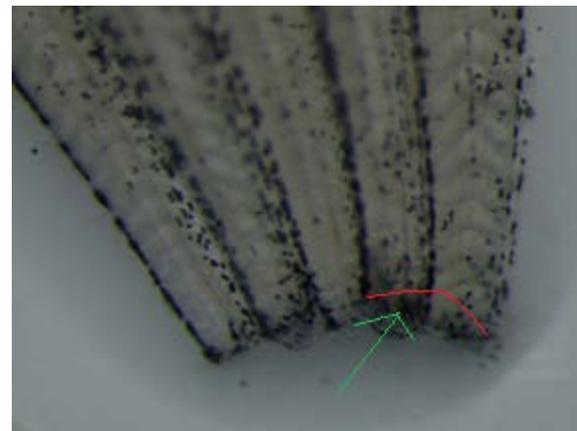
(\bar{X}) media aritmética de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido; (σ) desviación estándar de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido.

De acuerdo con el análisis realizado, los resultados más relevantes corresponden a los extractos hidroalcohólicos de *Urtica urens* y *Cestrum aff. peruvianum* en concentraciones de 100 $\mu\text{g/ml}$, los mismos que presentaron un potencial anti-inflamatorio comparable a la actividad farmacológica probada del Piroxicam (Feldene®) en concentración de 50 μM , como se indican a continuación en la figura 12:

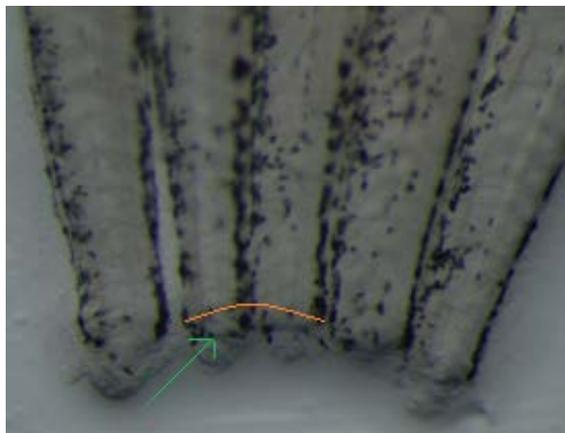
AUTORES:
 ANDREA BUESTAN O.
 ANITA GUARACA M.



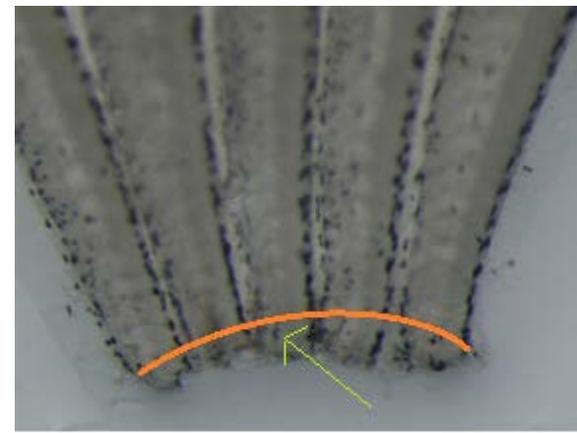
(A)Control Positivo



(B)Control Negativo



(C)*Urtica urens*



(D)*Cestrum aff. peruvianum*

Figura 12: Ensayo de actividad anti-inflamatoria en peces cebra. (A) Control Positivo (Piroxicam 50) μM (B) Control Negativo, Muestras Positivas (C) *Urtica urens* 100 $\mu\text{g/ml}$ (D) *Cestrum aff. peruvianum* .100 $\mu\text{g/ml}$.

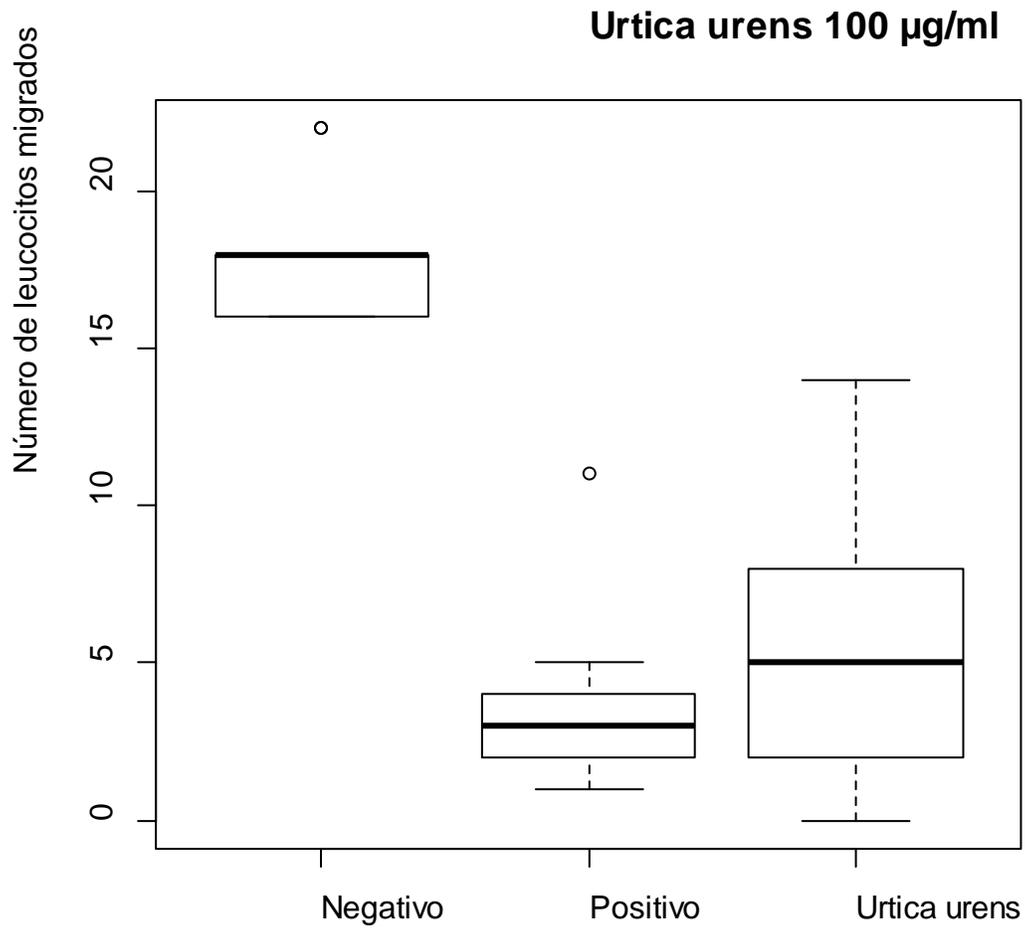


Gráfico 1: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de *Urtica urens* 100 µg/ml

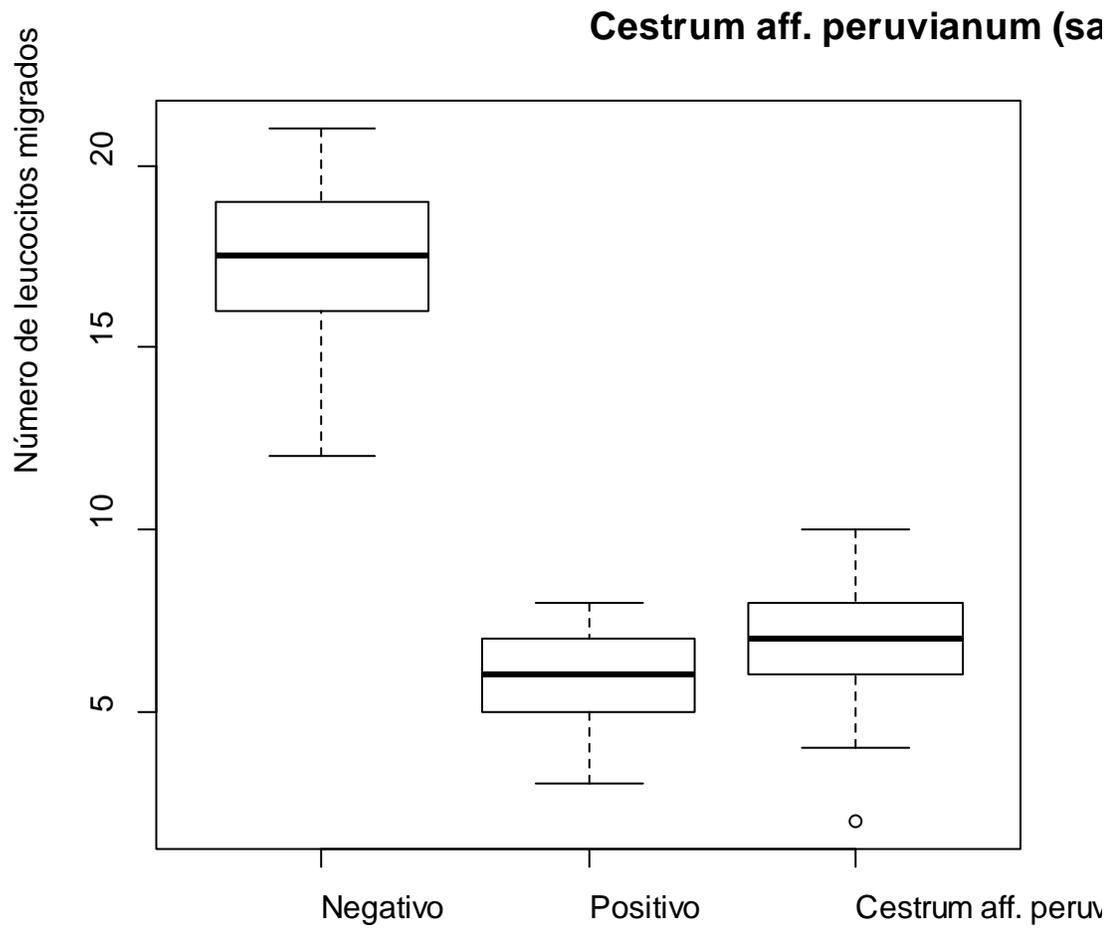


Gráfico 2: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de *Cestrum aff. peruvianum* (sauco negro) 100 µg/ml.

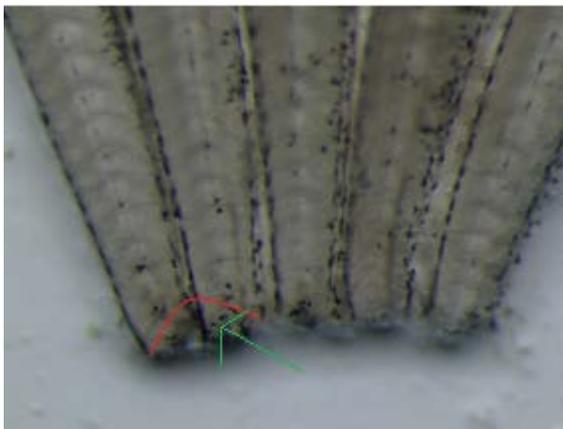
Tabla 5: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido de los extractos clorofórmicos.

Plantas	Control negativo		Control positivo		Extracto	
	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ	\bar{X}	σ
<i>Rosmarinus Officinalis</i>	18.3	3.5916	4.3	2.5407	6.63	1.2726
<i>Aristeguietia glutinosa</i>	16	2.2110	4.4	1.6465	7	1.7419
<i>Matricaria recutita</i>	18.3	3.5916	4.3	2.5407	7.4	1.8519
<i>Cestrum aff. Peruvianum</i>	16	6.6164	4.7	1.8885	7.53	1.7759
<i>Urtica urens</i>	16.4	3.6878	4.6	1.0749	7.73	1.5521
<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas y tallo herbario)	14.6	1.6465	3.9	1.5238	7.73	1.4367
<i>Uncaria tomentosa</i> (hojas)	17.8	3.7653	4.7	1.0593	7.83	1.8210
<i>Cestrum sp.</i>	17.3	4.8085	4.7	1.8885	7.96	1.7515
<i>Uncaria tomentosa</i> (tallo herbario)	14.6	1.6465	3.9	1.5238	8.1	1.3733

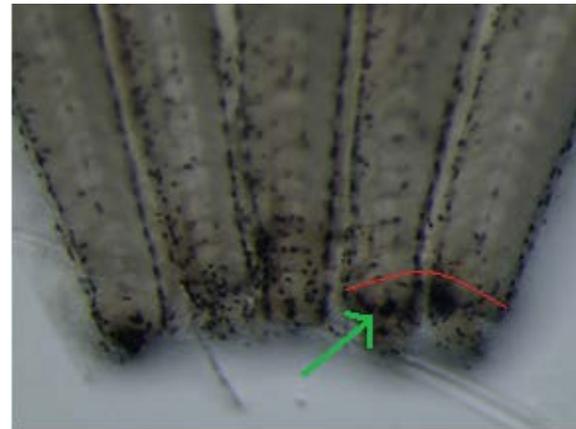
(\bar{X}) media aritmética de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido; (σ) desviación estándar de migración leucocitaria inducida por lipopolisacárido.

Según el estudio realizado, los resultados más relevantes corresponden a los extractos clorofórmicos de *Rosmarinus officinalis* y *Aristeguietia glutinosa* en concentraciones de 12.5 $\mu\text{g/ml}$, los mismos que presentaron un potencial anti-inflamatorio comparable a la actividad farmacológica probada del Piroxicam (Feldene®) en concentración de 50 μM , como se indican a continuación en la figura 13:

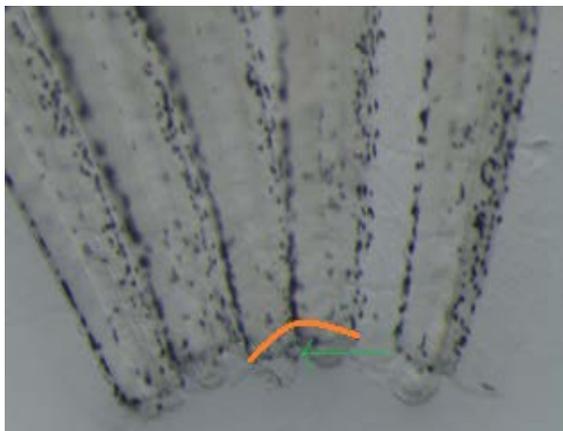
AUTORES:
 ANDREA BUESTAN O.
 ANITA GUARACA M.



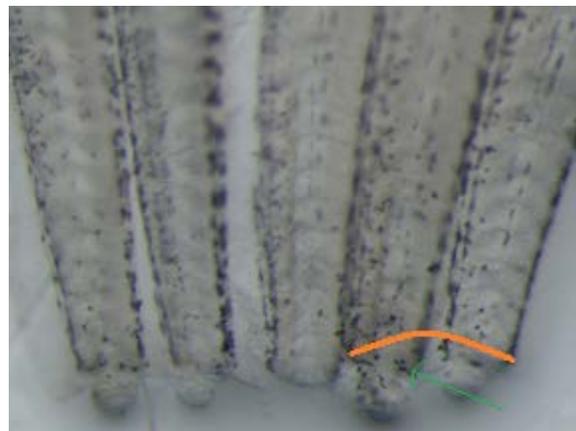
(A)Control Positivo



(B)Control Negativo



(C)*Rosmarinus officinalis*



(D)*Aristeguetia glutinosa*

Figura 13: Ensayo de actividad anti-inflamatoria en peces cebra. (A)Control Positivo (Piroxicam 50 μ M) (B) Control Negativo, Muestras Positivas (C) *Rosmarinus officinalis* 12.5 μ g/ml (D) *Aristeguetia glutinosa* 12.5 μ g/ml.

Rosmarinus officinalis 12.5 μg

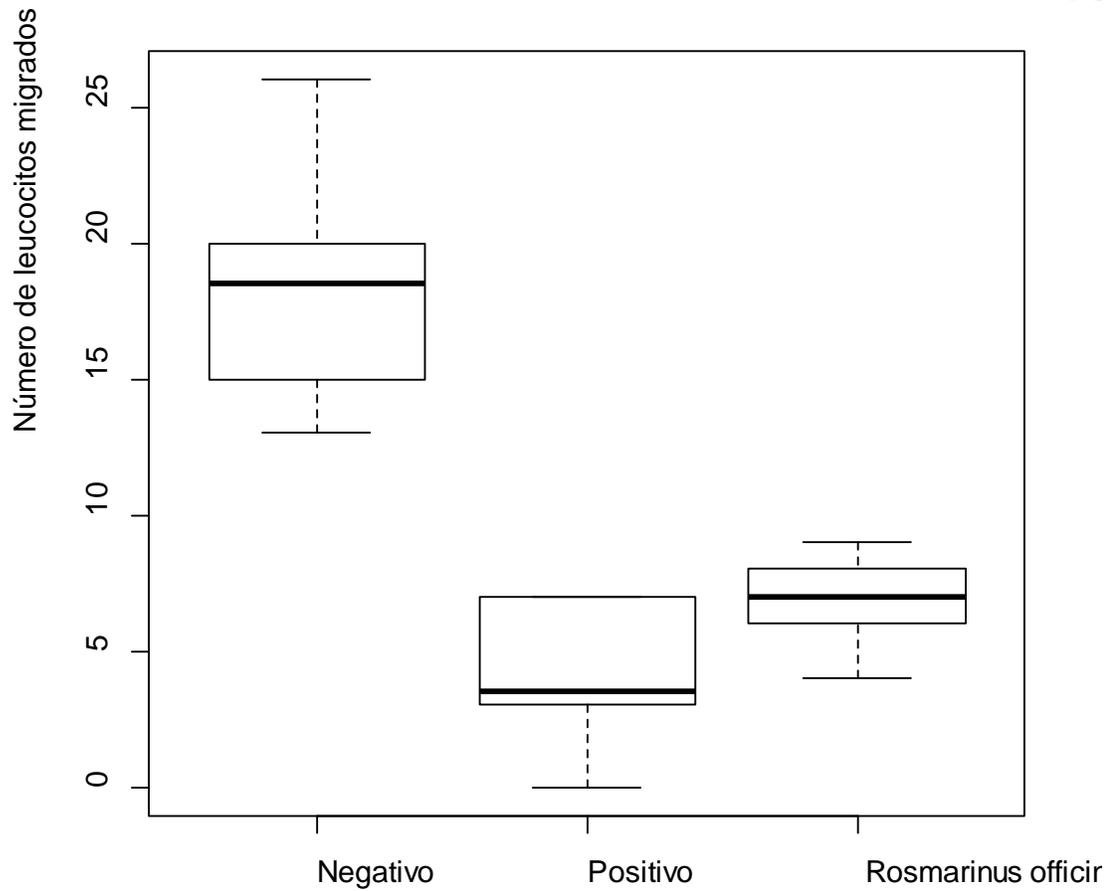


Gráfico 3: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebrá del extracto clorofórmico de *Rosmarinus officinalis* 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Aristeguietia glutinosa 12.5 μg

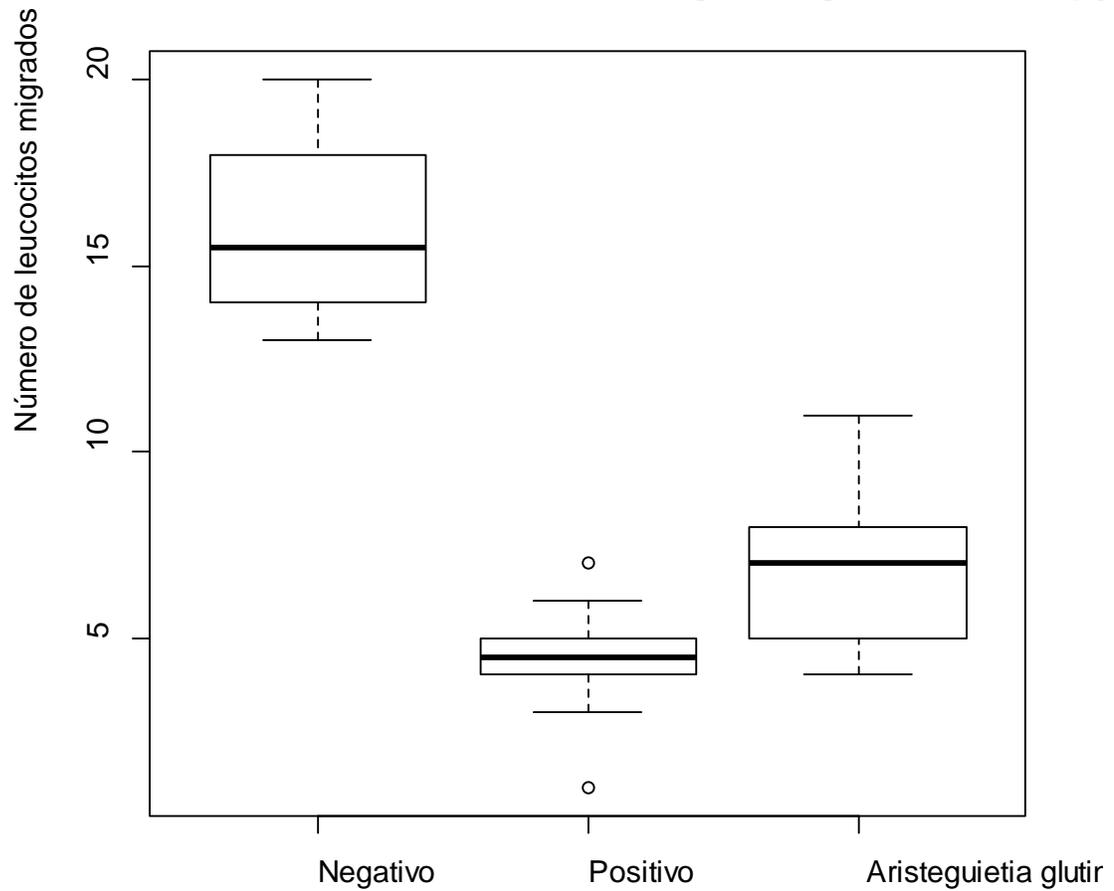


Gráfico 4: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Aristeguietia glutinosa* 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

3.3 Discusión

Al estar la medicina tradicional presente en todo el mundo, despierta gran interés por sus aplicaciones y posibilidades de investigación debido a la enorme demanda de obtener información etnobotánica y etnomédica para el posterior análisis y aislamiento de productos químicos activos.

El uso de plantas medicinales por la población del Austro ecuatoriano con fines terapéuticos es cada día mayor, lo que ha llevado al estudio de diferentes especies vegetales para el tratamiento de diversas patologías, entre ellas la inflamación. (45)

Debido a la similitud entre la medicina tradicional china y la medicina andina, en este estudio se seleccionaron 7 plantas que se reportan como anti-inflamatorias por la población austral ecuatoriana, entre las que tenemos *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguetia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum sp*, *Cestrum aff. peruvianum*, y *Uncaria tomentosa* y de las cuales se obtuvo extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos a fin de evaluar su efecto en el modelo de peces cebra.

La inflamación es una respuesta defensiva, inespecífica del organismo ante una lesión tisular, que se produce por la presencia de gérmenes patógenos, abrasiones, irritaciones químicas y trastornos celulares. El organismo desencadena una respuesta inflamatoria que consiste en vasodilatación o incremento de la permeabilidad, migración de los fagocitos y reparación tisular. La migración de los fagocitos al sitio de la lesión, entre ellos los neutrófilos es lo que ha permitido determinar la actividad anti-inflamatoria de los extractos vegetales usando el modelo biológico de peces cebra (*Danio rerio*). (20)

Se observó que ocho extractos hidroalcohólicos y siete extractos clorofórmicos expresaron una actividad equivalente al control positivo para el que se utilizó un medicamento de probada eficacia, disponible en el mercado como es el Piroxicam (FELDENE®), el cual inhibe la síntesis de las prostaglandinas, al

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

causar la inhibición de la Ciclooxygenasa. (46). Un extracto hidroalcohólico y dos extractos clorofórmicos utilizados, presentan una actividad parcial, comparada al control positivo seleccionado.

La *Matricaria recutita* o Manzanilla, usada comúnmente en enfermedades estomacales, irritación de la conjuntiva ocular y como anti-inflamatorio mostró una importante actividad en el modelo de peces cebra, como extracto hidroalcohólico a una concentración de 150 µg/ml presentó una migración leucocitaria con una media de 7.53 y como extracto clorofórmico a una concentración de 25 µg/ml evidenció una migración leucocitaria representada por una media de 7.4, presentando estos extractos actividad semejante al control positivo (Piroxicam 50µM). Diversos estudios han demostrado que los flavonoides-7-glucosidos constituyentes principales de las flores de manzanilla y el azuleno son los principales responsables de la acción anti-inflamatoria (47) (12) (48), otros estudios han probado que la matricina, el alfabisabolol, guaiazuleno y óxido alfabisabolol tienen actividad anti-inflamatoria y analgésica (49).

Rosmarinus officinalis o Romero es una especie utilizada por habitantes del Austro ecuatoriano para el tratamiento de infecciones de la vista, infecciones estomacales, problemas de la piel y cólicos menstruales. (10). Al referirse a su acción anti-inflamatoria, los resultados mostraron que a una concentración de 50 µg/ml el extracto hidroalcohólico demostró una migración leucocitaria con una media de 8.26 y de 6.63 como extracto clorofórmico a una concentración de 12.5 µg/ml lo cual pone de manifiesto que los extractos de esta planta tienen actividad semejante al control positivo en el modelo de *Danio rerio*. Diversos estudios experimentales parecen demostrar las propiedades anti-inflamatorias de derivados o partes de *Rosmarinus officinalis*. En estudios realizados en la Universidad Federal de Santa María se demostró la acción protectora y anti-inflamatoria del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* contra la úlcera gástrica inducida por etanol al 70% en ratas Wistar. (50) Tales autores Chae Ig, Yu Mh y otros probaron los efectos de los componentes de romero, ácido carnósico (CA), y el carnosol

(CAR), sobre la migración celular que se evaluó mediante un ensayo de migración de Matrigel en células vasculares del musculo liso (51).

En el caso de la *Aristeguietia glutinosa* o Matico, esta planta es nativa de la Sierra del Ecuador, la medicina tradicional le atribuye propiedades variadas puesto que las hojas en infusión se utilizan para aliviar o curar enfermedades del tracto respiratorio (anti-inflamatorio, expectorante, antitusígeno), para inflamaciones, reumas o artritis. (7). Los estudios aquí presentados nos permitieron mostrar que a una concentración baja de 12.5 µg/ml tanto el extracto hidroalcohólico y clorofórmico mostraron una inhibición en la migración de neutrófilos hacia la zona de la lesión, registrando resultados con una media de 7.26 y de 7 para el extracto hidroalcohólico y clorofórmico respectivamente, presentando actividad semejante al control positivo. No se han registrado estudios científicos que corroboren su propiedad anti-inflamatoria, por lo que sería necesario realizar más estudios sobre esta planta.

Urtica urens u Ortiga, es de distribución universal aunque su origen sería de Euroasia, se usa para tratar dolores fuertes, afecciones del hígado y sistema digestivo y en afecciones inflamatorias del intestino. (7) . Al realizar el estudio de esta planta se evidenció que posee actividad anti-inflamatoria representada por una media de 5.36 a una concentración de 100 µg/ml para el extracto hidroalcohólico y una media de 7.73 a una concentración de 200 µg/ml para el extracto clorofórmico. Un estudio del extracto etanólico de la parte aérea de *Urtica urens* en edema inducido por carragenina en la pata trasera de la rata (41,5% de inhibición a una dosis de 300 mg / kg ip), ha demostrado su actividad anti-inflamatoria, determinándose además el ácido clorogénico (670 mg/1000 g de peso seco) como responsable de esta actividad. (52)

Los *Cestrum sp* y *Cestrum aff. peruvianun*, conocidos comúnmente como sauco blanco y negro, son utilizados en infusión por comunidades nativas de Sudamérica para inflamación, fiebre, tos y afecciones de riñones. (7). En el presente estudio tanto el extracto hidroalcohólico y clorofórmico de *Cestrum sp*. a

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

una concentración de 12.5 µg/ml y 100 µg/ml respectivamente, presentaron una actividad semejante al control positivo (Piroxicam 50 µM), que se evidencia por la migración leucocitaria de 7.7 y de 7.96 para el extracto hidroalcohólico y clorofórmico respectivamente. *Cestrum aff. peruvianum* mostró una importante actividad en el modelo de peces cebra, como extracto hidroalcohólico y clorofórmico a una concentración de 100 µg/ml y 200 µg/ml respectivamente, presentando un migración leucocitaria con una media de 7.03 para el extracto hidroalcohólico y 7.53 para el clorofórmico, presentando estos extractos actividad semejante al control positivo (Piroxicam 50µM). Estudios en especies del género *Cestrum* como *Cestrum parqui* en metanol: agua (1:1) mostró inhibición de edema inducido por carragenina en la pata de rata, así como inhibición de la agregación de plaquetas sanguíneas humanas inducidas por difosfato de adenosina y del factor activador de plaquetas. (34)

En cuanto a la *Uncaria tomentosa* o uña de gato, se usa habitualmente para el dolor de cabeza, fortalecer el sistema inmune y en afecciones de riñones. (7). En el presente trabajo se demostró que los extractos hidroalcohólicos del tallo herbario y hojas a concentraciones de 25 µg/ml y 50 µg/ml respectivamente, presentaron una migración leucocitaria de 8.5 y 8.26 para los extractos hidroalcohólicos del tallo herbario y hojas respectivamente, lo que evidencia que estos extractos tienen actividad semejante al control positivo; el extracto hidroalcohólico de la mezcla (hojas y tallo herbario) a una concentración de 12.5 µg/ml presentó una actividad parcial, diferente al control positivo y negativo con una migración leucocitaria de 10.43. En cuanto a los extractos clorofórmicos, el extracto de las hojas a una concentración de 200 µg/ml presentó una actividad anti-inflamatoria semejante al control positivo, con una migración leucocitaria representada por una media de 7.83; los extractos clorofórmicos del tallo herbario y mezcla (hojas y tallo herbario) a una concentración de 200 µg/ml para ambos casos, presentaron una migración leucocitaria de 8.1 y 7.73 respectivamente, lo cual pone de manifiesto que los extractos de esta planta tienen actividad parcial diferente al control positivo y negativo en el modelo de peces cebra. Estudios

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

realizados por investigadores estadounidenses valoraron la propiedad anti-inflamatoria de *Uncaria tomentosa*, in vivo, al inducirse inflamación intestinal crónica en ratas inyectando indometacina (7.5 mg/kg) vía subcutánea y administrándose en el agua de beber uña de gato (5 mg/ml), la cual atenúo notoriamente la enteritis inducida por indometacina. (53). Estudios realizados en Canadá mostraron que un tratamiento con extractos de *Uncaria tomentosa*, inhibió la producción de la citoquina pro-inflamatoria (TNF-alfa), que es un mediador crítico de la respuesta inmune. (54)

4. CONCLUSIONES

La tesis desarrollada se basó en las investigaciones realizadas por parte del Dr. Achig, respecto a la utilización terapéutica de distintas plantas medicinales según los conocimientos y criterios ancestrales de la Medicina Tradicional China con homología a la Medicina Andina, valorando la actividad anti-inflamatoria de extractos vegetales hidroalcohólicos y clorofórmicos de: *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguietia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum sp*, *Cestrum aff. peruvianun*, y *Uncaria tomentosa*, usando el modelo biológico de peces cebrá (*Danio rerio*), concluyéndose lo siguiente:

- Se pudo corroborar que el conocimiento ancestral andino con bases en la medicina tradicional china sobre el uso de *Matricaria recutita*, *Rosmarinus officinalis*, *Aristeguietia glutinosa*, *Urtica urens*, *Cestrum (sp. y aff peruvianun)*, y *Uncaria tomentosa* en procesos anti-inflamatorios es correcto, ya que 8 extractos hidroalcohólicos y 7 clorofórmicos de estas plantas medicinales, presentaron una actividad anti-inflamatoria semejante al control positivo y el resto de extractos tanto hidroalcohólicos como clorofórmicos presentaron una actividad anti-inflamatoria parcial, en el modelo biológico *Danio rerio*.
- Además se determinó las concentraciones máximas tolerables (CMT) para cada uno de los extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos, sin que estos causen signos de toxicidad en los peces cebrá.

5. RECOMENDACIONES

- Se debe tomar en consideración, la realización de más estudios farmacológicos que contribuyan a una valoración general del uso de las especies vegetales utilizadas en este proyecto, contribuyendo a obtener drogas adecuadas para el tratamiento de patologías relacionadas con procesos inflamatorios.
- Realizar procesos que permitan identificar y aislar los principios activos de estas especies vegetales para determinar qué compuestos son los responsables de la actividad anti-inflamatoria.
- Probar el efecto anti-inflamatorio de los extractos hidroalcohólicos y clorofórmicos realizando combinaciones (fórmulas herbolarias) para determinar si presentan o no mejores resultados.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. García Bacallao L, Rojo Domínguez DM, García Gómez LV, Maureen. Plantas con Propiedades Antiinflamatorias. Revista Cubana Investigaciones Biomédicas. 2002;: p. 1.
2. Musgrove P, Frenk J. Informe sobre la salud en el mundo. Ginebra; 2000.
3. Cascales M. Bioquímica y Fisiología del Sistema Inmune Madrid-España: Realigraf S.A; 2007.
4. Vicet Muro L. Contribución a la Farmacología Antiinflamatoria de la especie *Capraria biflora*. Tesis presentada en opción al grado Científico de Doctor en Ciencias de la Salud. Habana: Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas, Instituto Superior de Ciencias Médicas "Victoria de Girón"; 2009 Junio 30.
5. Muñoz F. Plantas medicinales y aromáticas: estudio, cultivo y procesado. Primera ed. Madrid: Mundi-Prensa Libros s.a.; 2002.
6. Organización Mundial de la Salud. Medicina tradicional, Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM). Ginebra; 2003.
7. De la Torre L, Navarrete H, Muriel MP, Macía MJ, Balslev H. Enciclopedia de las Plantas Útiles del Ecuador Quito: Herbario QCA& Herbario AAU; 2008.
8. Ríos YK, Otero AC, Muñoz DL, Echeverry M, Robledo SM, Yepes MA. Actividad citotóxica y leishmanicida in vitro del aceite esencial de manzanilla. Revista Colombiana Cienciai Química Farmacéutica. 2008 Noviembre; 37-2(200-211).
9. Berdonces JL. Gran enciclopedia de las plantas medicinales. 2nd ed. Barcelona-España: Océano; 2004.
10. Ríos M, Kozio JM, Peterson BH, Granda G. Plantas Útiles del Ecuador. Aplicaciones, retos y perspectivas. Quito: Ediciones Abya-Yala; 2007.
11. Muñoz O, Montes M, Wilkomirsky T. Plantas medicinales de uso en Chile: Química y Farmacología. Segunda ed. Santiago de Chile: Editorial Universitaria; 2004.

12. Fonnegra Gomez RdJ, Jiménez SL. Plantas Medicinales Aprobadas En Colombia. Segunda ed. Cárdenas E, editor. Colombia: Universidad de Antioquia; 2007.
13. Luengo M, López T. El romero, Planta aromática con efectos antioxidantes. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*. 2008 Agosto; 27(7).
14. Cerón Martínez CE. Plantas medicinales de los Andes ecuatorianos. *Botánica Económica de los Andes Centrales*. 2006;: p. 285-291.
15. Cruz Ati P. Elaboracion y control de calidad del gel antimicótico de manzanilla (*Matricaria chamomilla*), Matico(*Aristeguietia glutinosa*), Marco (*Ambrosia arborescens*), para neo- farmacos. Tesis de grado. Chimborazo: Escuela Superior politecnica de Chimborazo, Escuela deBioquimica y Farmacia; 2009.
16. Porcuna JL. Servicio de Sanidad Vegetal. Valencia. [Online].; 2010 [cited 2012 Noviembre 21. Available from: http://agroecologia.net/recursos/Revista_Ae/Ae_a_la_Practica/fichas/N2/Revisita_AE_N%C2%BA2_ficha_planta.pdf.
17. Marzocca A, Marsico OJ, Del Puerto O. Guia SATA. [Online].; 2009 [cited 2012 Noviembre 22. Available from: http://laguiasata.com/joomla/index.php?option=com_content&view=article&id=511:urtica-urens&catid=69:nombres-cientifico&Itemid=71.
18. Tortora GJ, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología: Editorial Medica Panamericana Sa; 2006.
19. Barreno García P. IX Programa de Promoción de la Cultura Científica y Tecnológica; Inflamación. Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales (Esp). 2008 Nviembre; 102(1).
20. Rang.P.H , Dale M, Ritter M, Flower R. Farmacología Barcelona: Elsiver España.S.L.; 2008.
21. Bordés González R, Martínez Beltrán M, García Olivares E, Guisado Barrilao R. Universidad de Granada. [Online]. [cited 2013 enero 7. Available from: <http://www.uclm.es/ab/enfermeria/revista/numero%204/pinflamatorio4.htm>.
22. Muñoz A. Cepvi. [Online]. [cited 2013 enero 7. Available from:

<http://www.cepvi.com/medicina/fisiologia/infeccion4.shtml>.

23. Martínez Peña J. Inmunología en línea del Hospital Universitario Reina Sofía. [Online]. [cited 2013 enero 7. Available from: <http://inmunologiaenlinea.es/>.
24. Marinovic MA. Revista Biomedica revisada por pares. Inflammation, damage and repair in rheumatic diseases. 2008.
25. Barreiro O, Sánchez Madrid F. Bases moleculares de las interacciones leucocito-endotelio durante la respuesta inflamatoria. Revista española de cardiología. 2009 Mayo 05; LXII(5).
26. Guzmán Grenfell , Noriega , Mendoza Atencio , Hicks Gómez JJ. La función plaquetaria más allá de la hemostasis: participación en las enfermedades respiratorias. Scielo. 2005.
27. Montes MJ, Flores Flores J, Alfonso B. Histamina, receptores y antagonistas. Revista Medica Del Hospital General De Mexico. 2005 Septiembre; 68(3).
28. Tristam P. Inflamación. Inmunología Básica y Clínica. 2002 Febrere; X(10).
29. Hazouri SA. Antagonistas de leucotrienos en el tratamiento de la rinitis alérgica y enfermedades concomitantes. Revista Alergia México. 2008 Julio, Agosto; LIV(4).
30. González Guevara MC, Ospina Giraldo LF, Rincón Velandia J. Actividad Antiinflamatoria de Extractos y Fracciones de Myrcianthes leucoxila, Calea prunifolia, Curatella americana y Physalis peruviana en los modelos edema auricular por TPA, edema plantar por carragenina y Artritis inducida por colágeno. Biosalud. 2011;; p. 9-18.
31. Rosales Clares VdP, Gross Fernández MdC, Rosales Clares RA, García Díaz RdC, León Sarabia JE, Vidal M. Evaluación farmacológica de Pluchea carolinensis Jacq. (salvia de playa) en animales de experimentación. Revista Cubana Plant Med. 1999.
32. Ouviaña A, Gorzalczany S, Acevedo MCD, Ferraro GE. Actividad antiinflamatoria tópica de extractos de Hydrocotyle bonariensis Lam. (Apiaceae). Latin American Journal of Pharmacy. 2010;; p. 941-944.
33. Amero JM. Modelos experimentales in vivo de enfermedad inflamatoria

AUTORES:
ANDREA BUESTAN O.
ANITA GUARACA M.

intestinal y cáncer colorrectal. *Nutrición Hospitalaria*. 2007;; p. 178-189.

34. Shehnaz D FH,FB,UAV. Efecto del extracto crudo de *Cestrum parqui* en edema inducido por carragenina pata de la rata y la agregación de plaquetas de sangre humana. 1999.
35. Crawford AD, Esguerra CV, de Witte PAM. Fishing for Drugs from Nature: Zebrafish as a Technology Platform for Natural Product Discovery. .
36. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Seres modélicos entre la naturaleza y el laboratorio. [Online]. [cited 2012 Diciembre 29. Available from: <http://www.seresmodelicos.csic.es/peix.html>.
37. Siebers P. Mundo Acuariofilo. [Online]. [cited 2012 Diciembre 29. Available from: <http://mundoacuafilo.org/peces/fichapez.php?id=52>.
38. Nüsslein-Volhard C, Dahm R. Zebrafish as a system to study development and organogenesis. In *Zebrafish*. New York: Oxford University Press Inc.; 2002. p. 3-4.
39. Postlethwait J, Amores A, Force A, Yan YL. The Zebrafish Genome. In *Methods in Cell Biology*. Oregon: Elsevier; 1998. p. 149-163.
40. Loynes CA, Martin JS, Robertson A, Trushell DMI, Ingham PW, Whyte MKB, et al. Pharmacological manipulation of inflammation resolution during spontaneously resolving tissue neutrophilia in the zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*. 2010 Febrero; 87.
41. Mathias JR, Perrin BJ, Liu TX, Kanki J, Look AT, Huttenlocher A. Resolution of inflammation by retrograde chemotaxis of neutrophils in transgenic zebrafish. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006 December; 80.
42. Renshaw SA, Loynes CA, Trushell DMI, Elworthy S, Ingham PW, Whyte MKB. A transgenic zebrafish model of neutrophilic inflammation. *Blood*. 2006 Diciembre; 108(13).
43. Organización Mundial de la Salud. Directrices de la OMS sobre buenas prácticas agrícolas y de recolección (BPAR) de plantas medicinales. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, Departamento de Medicamentos Esenciales y Política Farmacéutica (EDM) ; 2003 Julio 7.

44. Martin W. Eric CEFLEEOATLF,VMCT. Farmacia Práctica de Remington. Segunda Edición ed. México: Hispano America; 1965.
45. Achig Balarezo D. Integración entre la Medicina Tradicional China y la Medicina Ecuatoriana Andina en el estudio de Plantas Medicinales Cuenca; 2005.
46. PLM. Diccionario de Especialidades Farmacéuticas. Quito: Ediciones PLM del Ecuador S.A.; 2010.
47. Bulgari M, Sangiovanni E, Colombo E, Maschi O, Caruso D, Bosisio E, et al. Inhibition of neutrophil elastase and metalloprotease-9 of human adenocarcinoma gastric cells by chamomile (*Matricaria recutita* L.) infusion. Milán; 2012.
48. Herrera Gomez FV. Medición del efecto anti-inflamatorio del gel de manzanilla en niños con inflamación de encía en la zona de erupción de la dentición primaria, comprendidos entre las edades de 6 meses a dos años de la casa No1 de la sociedad protectora del niño. Tesis de Grado. Guatemala: Universidad de San Carlos, Facultad de Odontología; 2001 Septiembre.
49. Rocha N, Ríos E, Carvalho A, Cerqueira G, Lopes AA, Leal L, et al. Actividades anti-nociceptivos y anti-inflamatorios de (-)- α -bisabolol en roedores. Brasil; 2011.
50. Amaral GP dCN,BR,DF,PRL,dSM,TL,GD,dLS,AB,MA,MV,ASF,FR. Acción protectora del extracto etanólico de *Rosmarinus officinalis* L. en la prevención de úlcera gástrica inducida por etanol en ratas. 2012.
51. Chae I, Yu M, Im N, Junq Y, Lee J, Chun K, et al. Effect of *Rosmarinus officinalis* L. on MMP-9, MCP-1 levels, and cell migration in RAW 264.7 and smooth muscle cells. Daegu; 2012.
52. Marrassini C, Acevedo C, Miño J, Ferraro G, Gorzalczy S. Evaluation of antinociceptive, antiinflammatory activities and phytochemical analysis of aerial parts of *Urtica urens* L. Resumen. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Farmacognosia; 2010 Diciembre 24.
53. Guthrie O, Gearhart C, Fulton S, Fechter L. PubMed. [Online].; 2011. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762882>.

54. Allen-Hall L, Canon P, Arnason J, Rojas R, Lock O, Lafrenie R. PubMed. [Online].; 2007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16959454>.
55. González BR, Beltrán M, García Olivares E, Guisado Barrilao R. EL PROCESO INFLAMATORIO. Universidad de Granada. .

7. ANEXOS

ABREVIATURAS

- CMT: Concentración Máxima Tolerable
- DMSO: Dimetil sulfóxido
- dpf: días post fertilización
- g: gramos
- LPS: lipopolisacárido
- HA: Herbario Azuay
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- PAF: para formaldehído
- PBS: buffer fosfo-salino
- PBST: buffer fosfo salino más tween 20
- PGe: Prostaglantina E
- PTU: Feniltiourea
- POX: Leucognost® pox
- μM : micro molar
- $\mu\text{g/ml}$: microgramos/mililitro
- FAP: factor activador de plaquetas
- NOS: óxido nítrico sintasa
- iNOS: óxido nítrico sintasa

EQUIPOS



Anexo 1: Horno de Secado



Anexo 2: Concentración de Extractos vegetales en Rotavapor.



Anexo 3: Eliminación del solvente con nitrógeno en baño ultrasónico



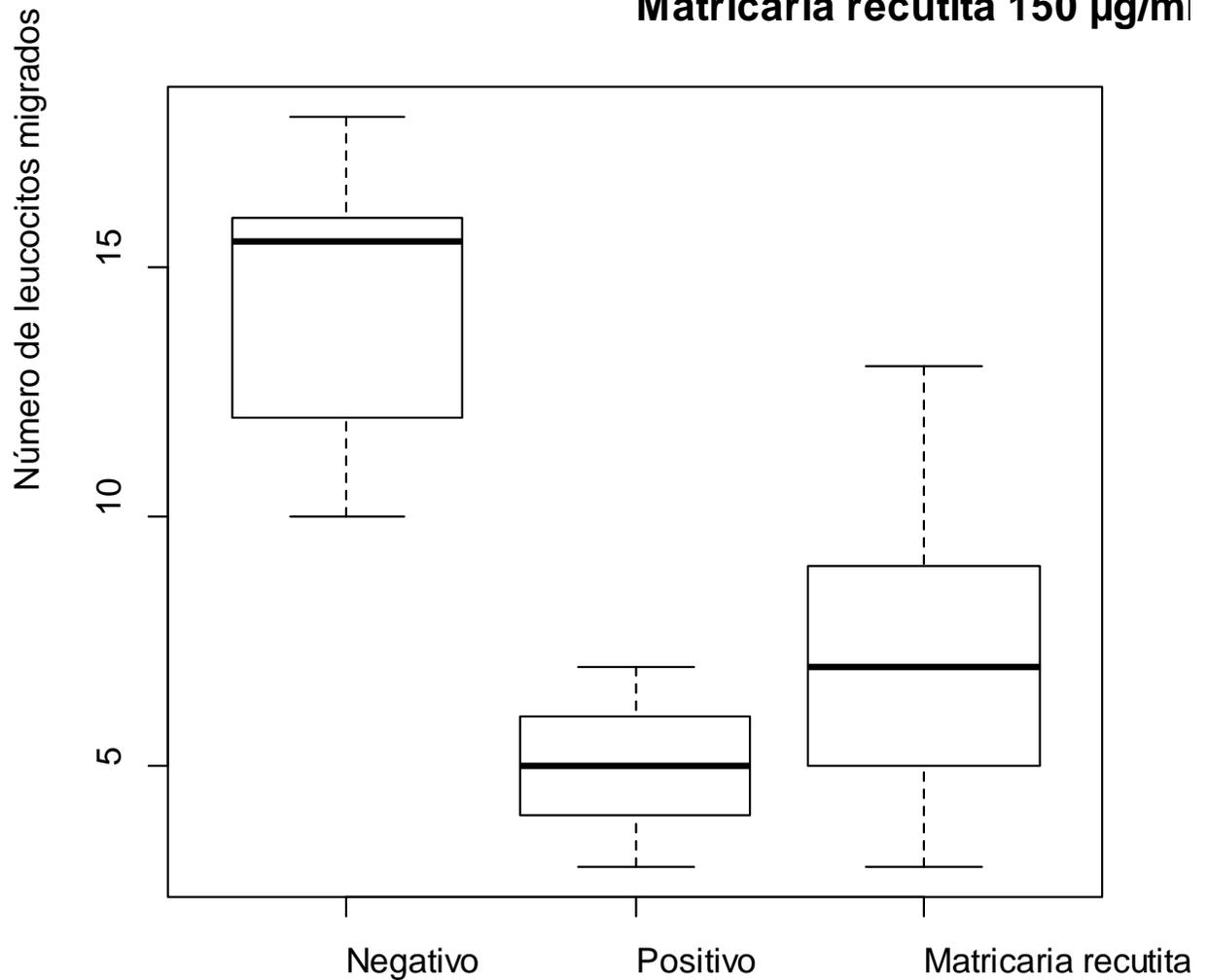
Anexo 4: Disposición de los extractos hidroalcohólicos en el liofilizador.



Anexo 5: Concentración al vacío de los extractos clorofórmicos.

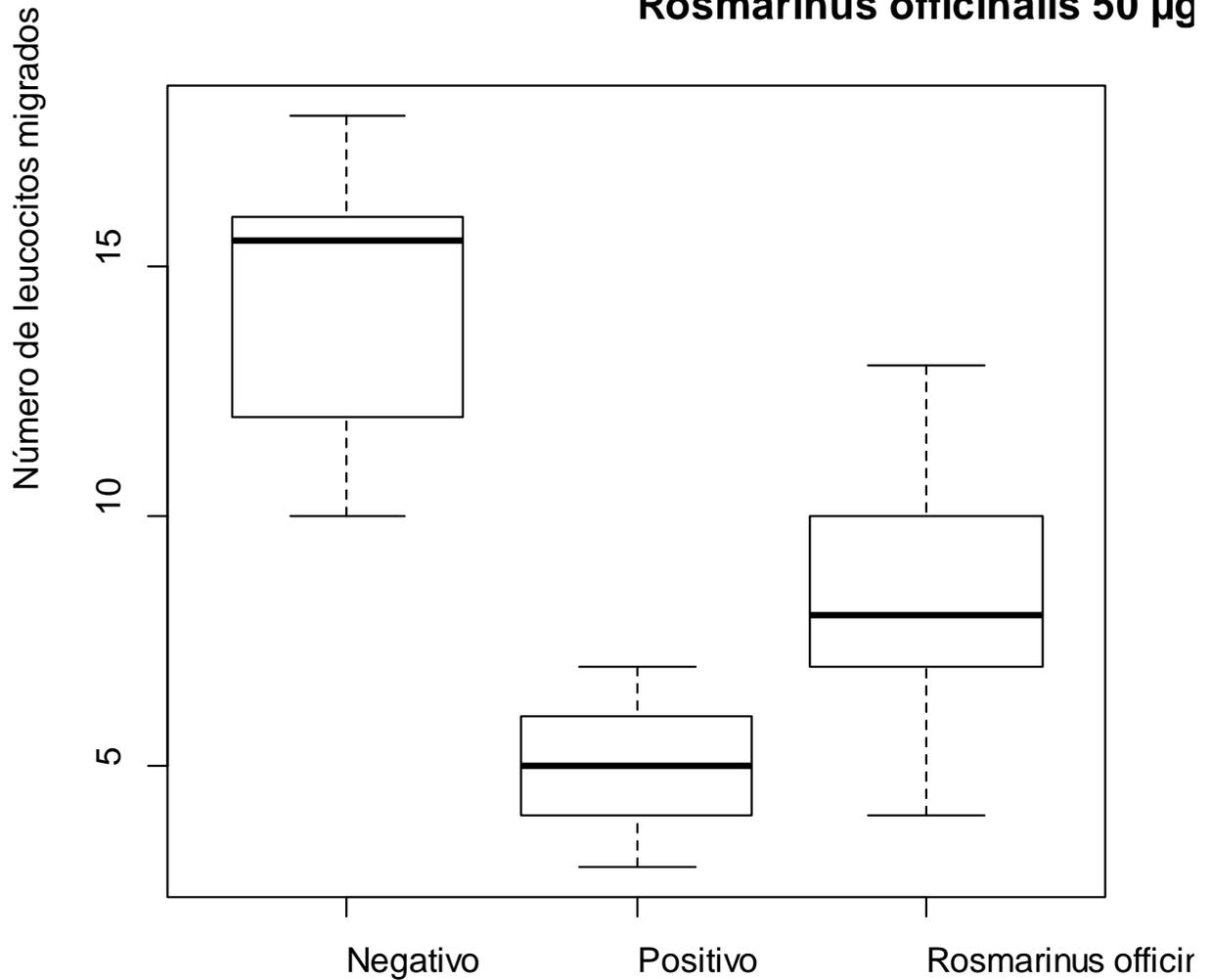
MIGRACIÓN LEUCOCITARIA

Matricaria recutita 150 µg/ml



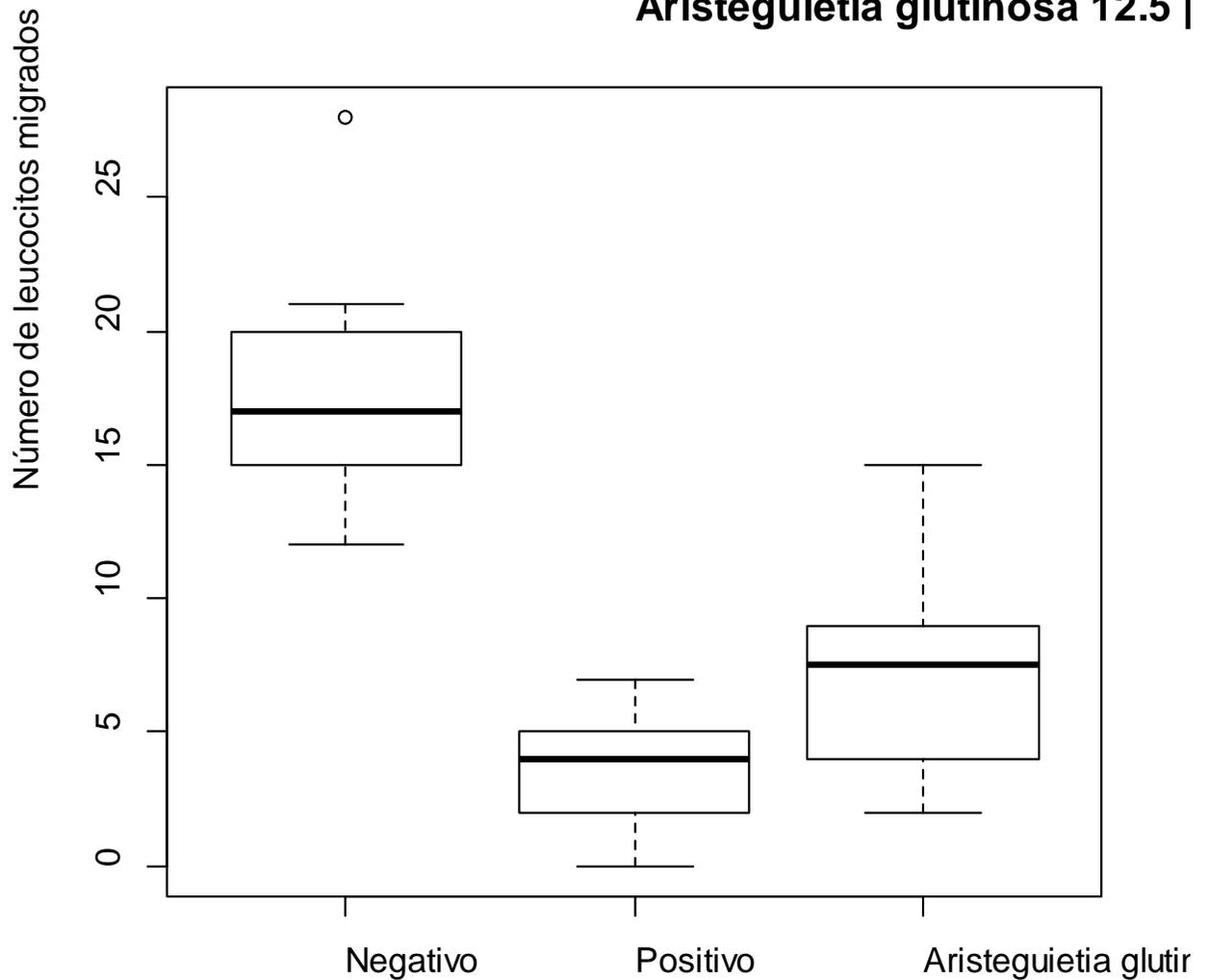
Anexo 6: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebrá del extracto hidroalcohólico de *Matricaria recutita* 150 µg/ml.

Rosmarinus officinalis 50 µg



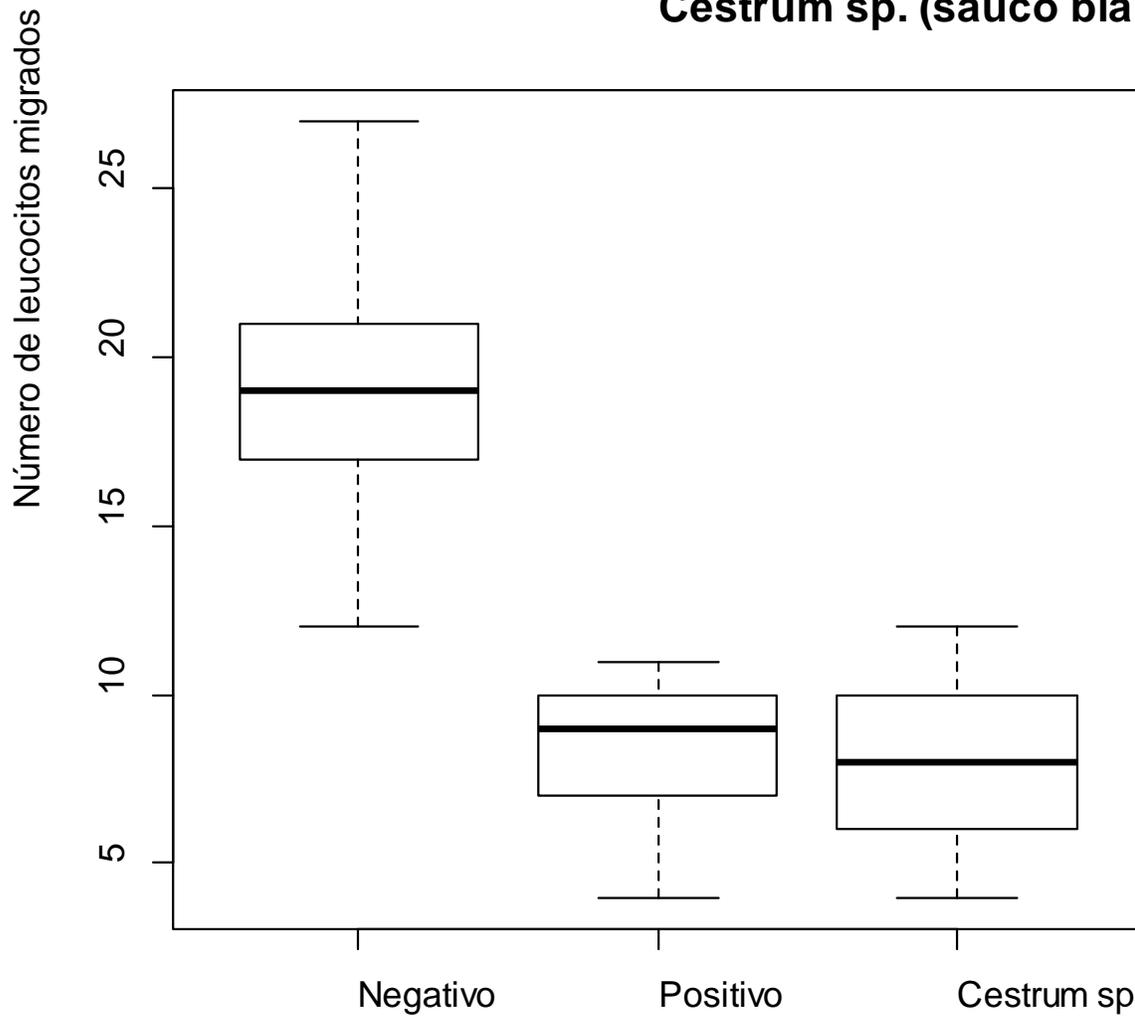
Anexo 7: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de *Rosmarinus officinalis* 50 µg/ml.

Aristeguietia glutinosa 12.5 μ g/ml



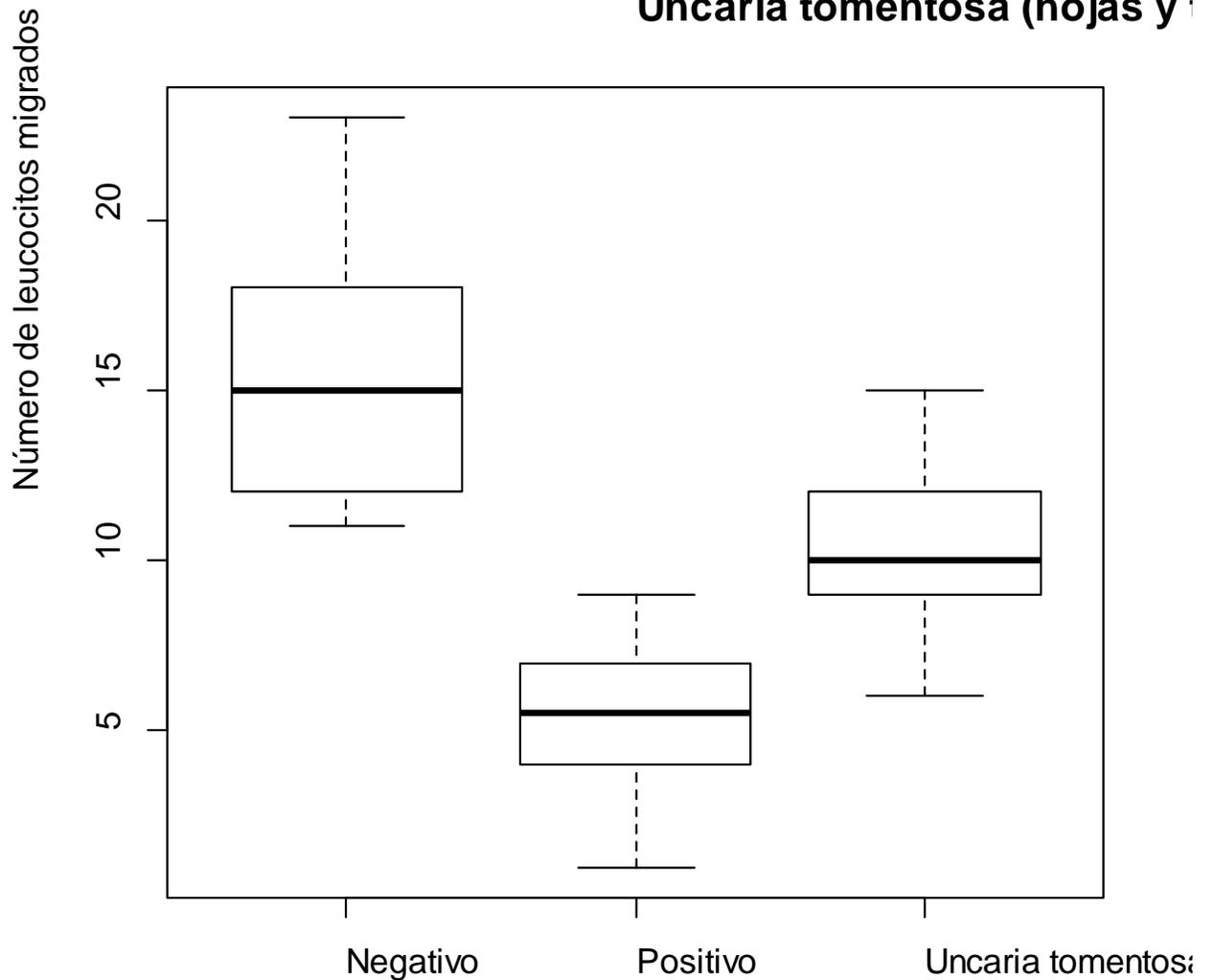
Anexo 8: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de *Aristeguietia glutinosa* 12.5 μ g/ml.

Cestrum sp. (sauco blanco)



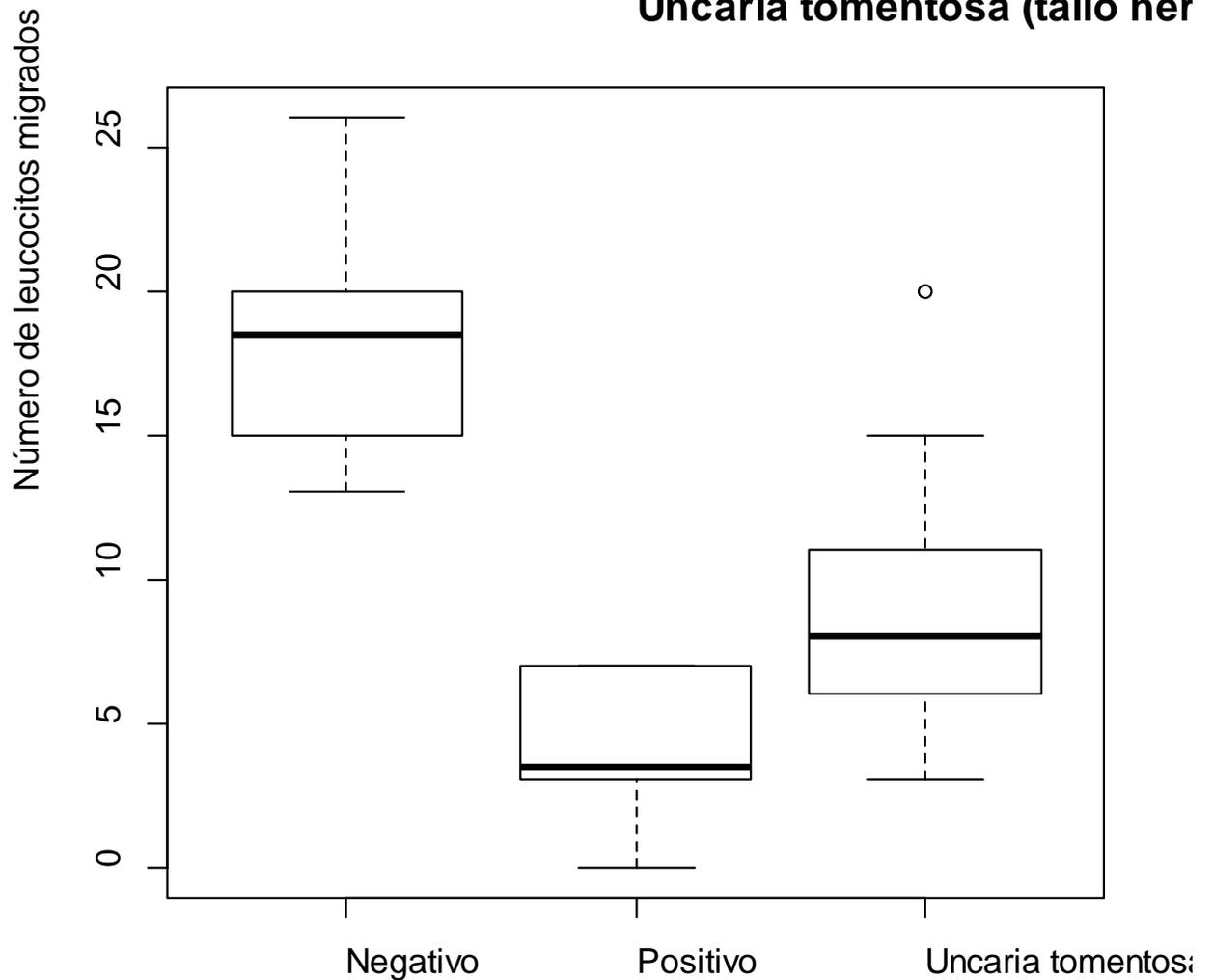
Anexo 9: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de *Cestrum sp.* (Sauco blanco) 12.5 µg/ml.

Uncaria tomentosa (hojas y tallo)



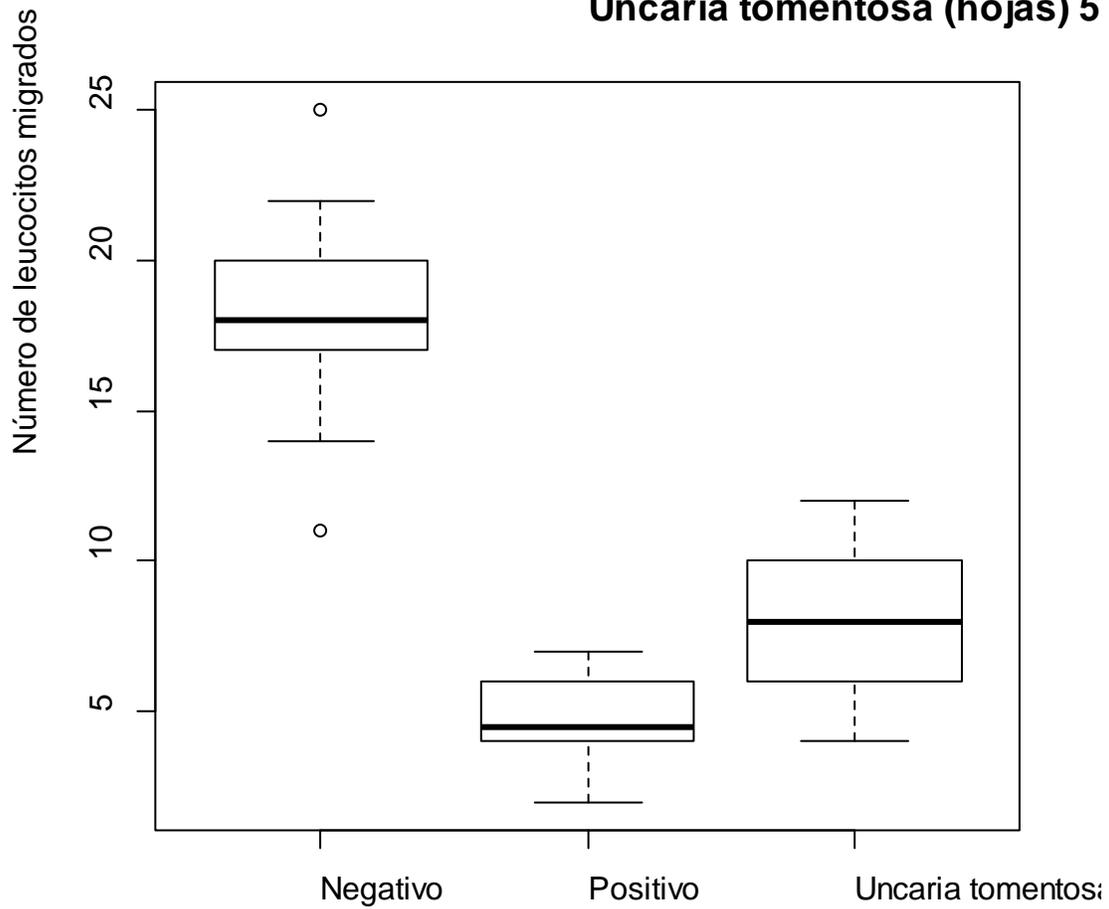
Anexo 10: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebras del extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (hojas y tallo herbario) 12.5 µg/ml.

Uncaria tomentosa (tallo her



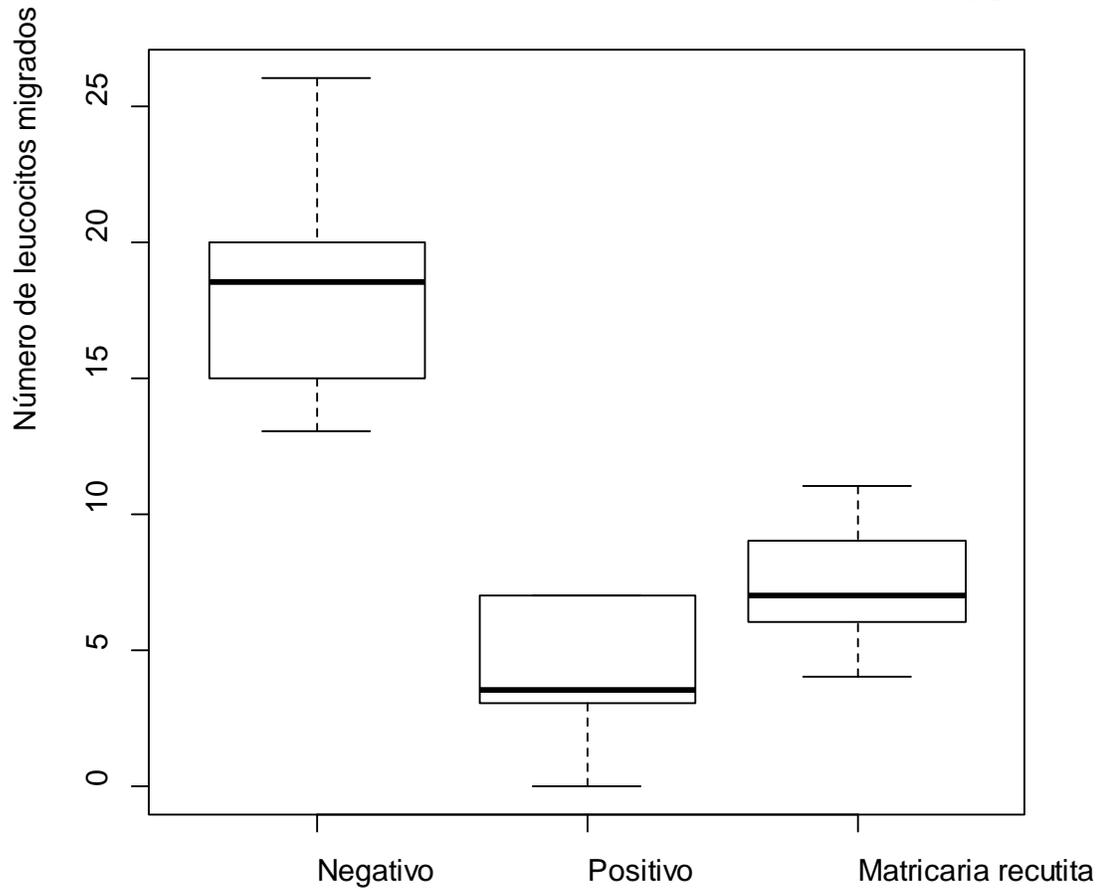
Anexo 11: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (tallo herbario) 25 µg/ml.

Uncaria tomentosa (hojas) 5



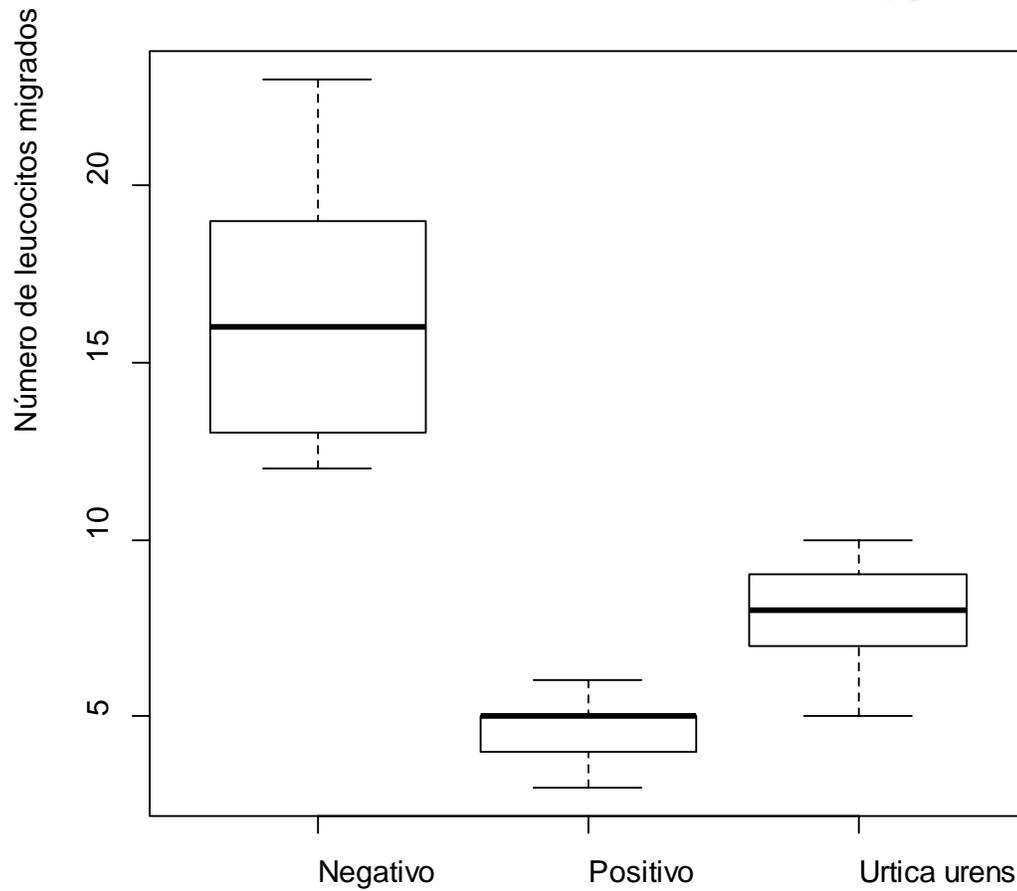
Anexo 12: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto hidroalcohólico de *Uncaria tomentosa* (hojas) 50 µg/ml.

Matricaria recutita 25 µg/ml



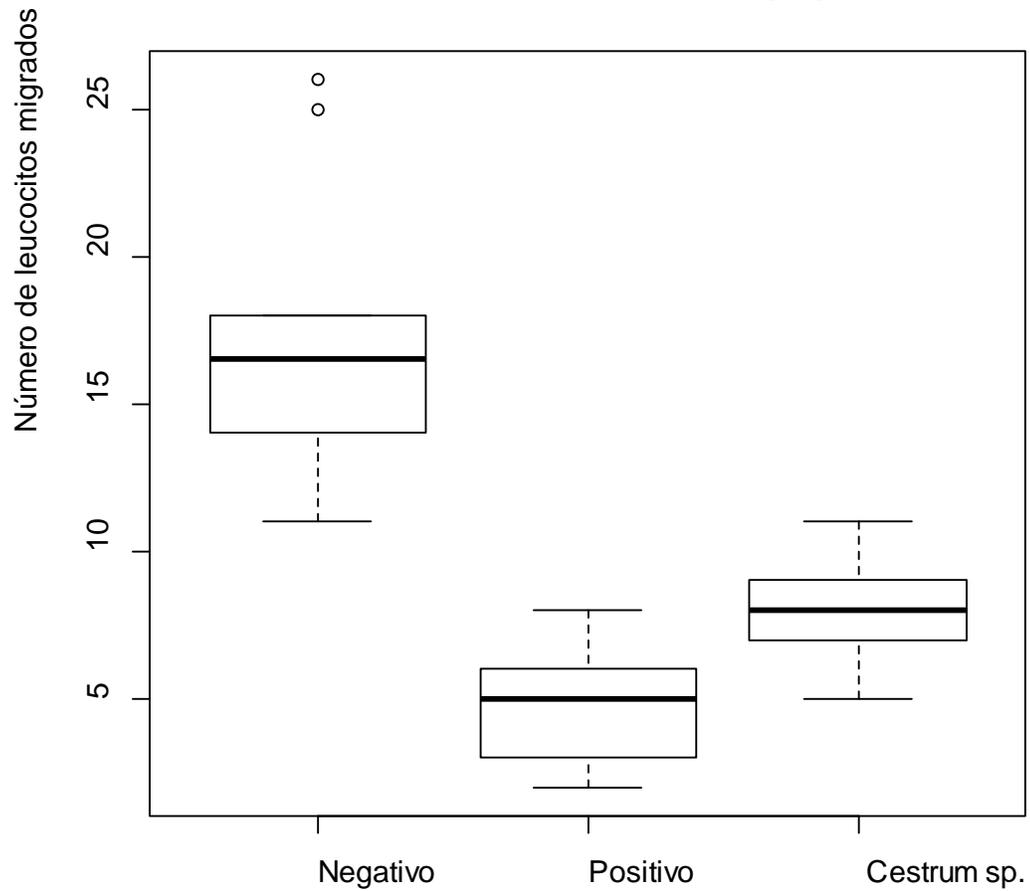
Anexo 13: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Matricaria recutita* 25 µg/ml.

Urtica urens 200 µg/ml



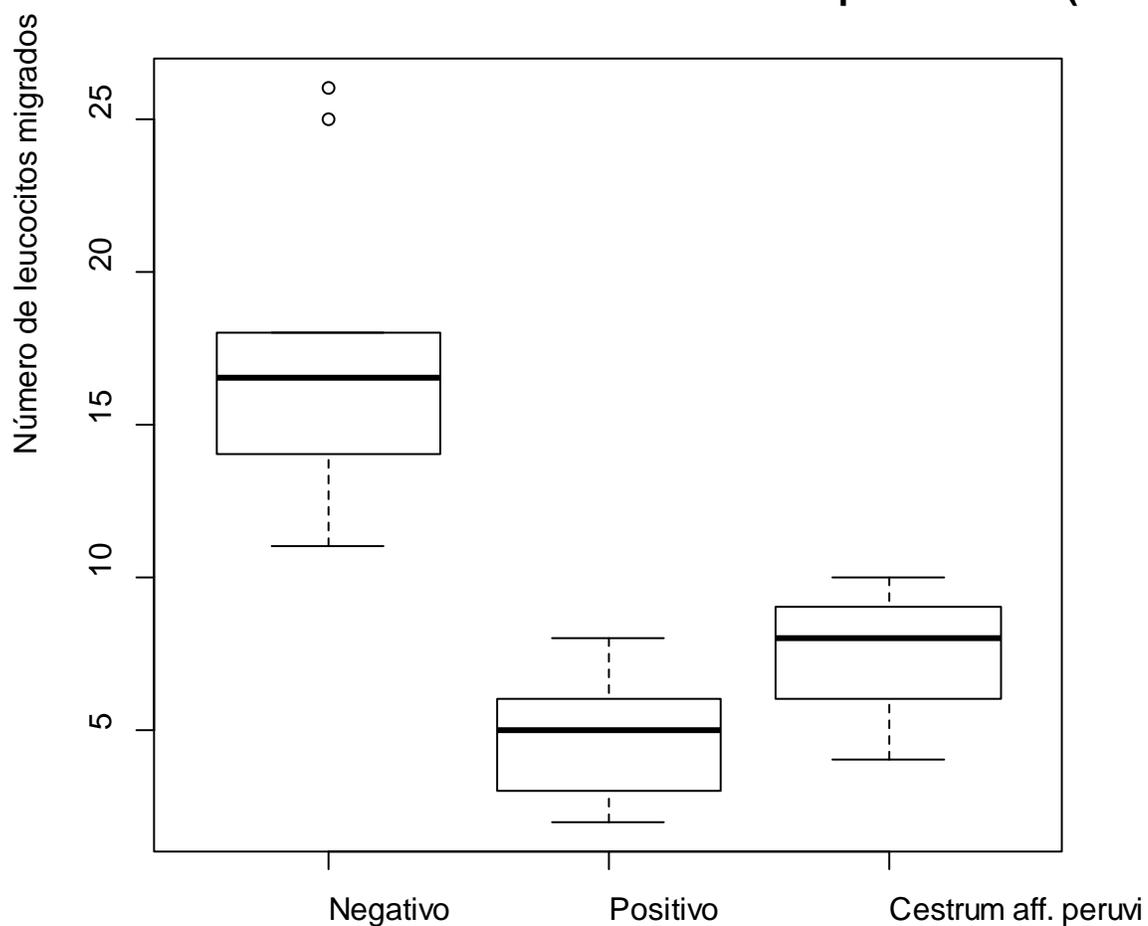
Anexo 14: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Urtica Urens* 200 µg/ml.

Cestrum sp. (sauco blanco) 100 µg/ml



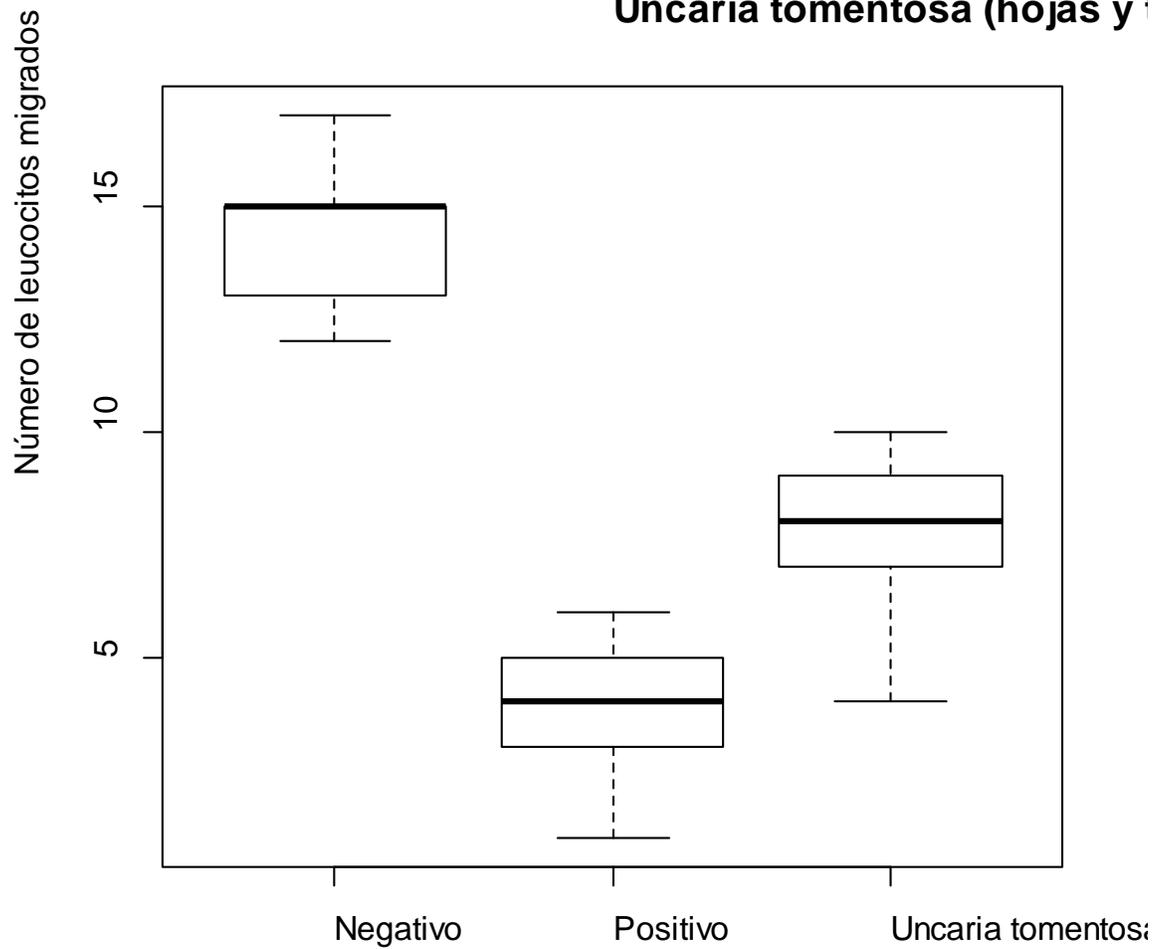
Anexo 15: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Cestrum sp* (sauco blanco) 100 µg/ml.

Cestrum aff. peruvianum (saú)



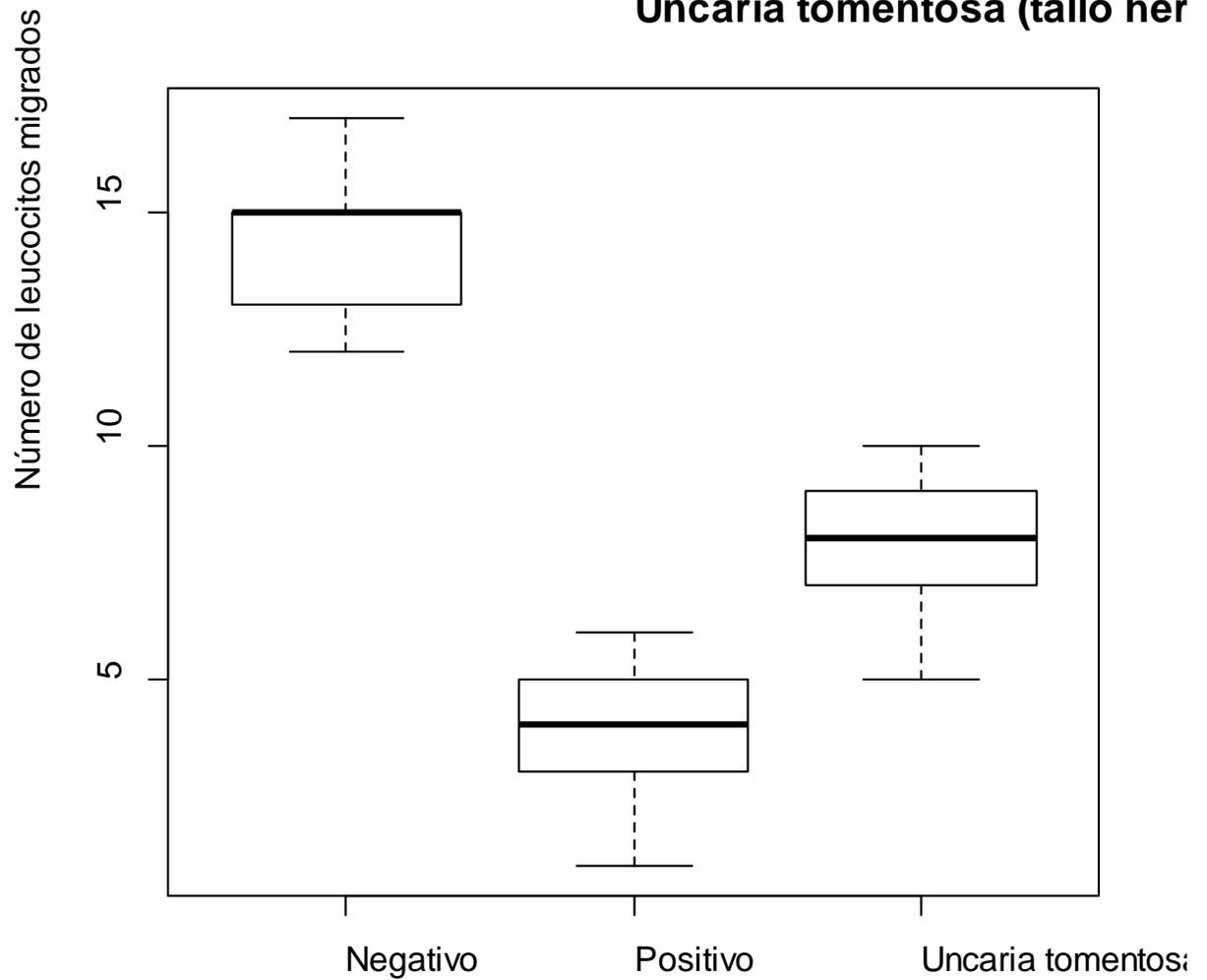
Anexo 16: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Cestrum aff. Peruvianum* (sauco negro) 200 µg/ml.

Uncaria tomentosa (hojas y t



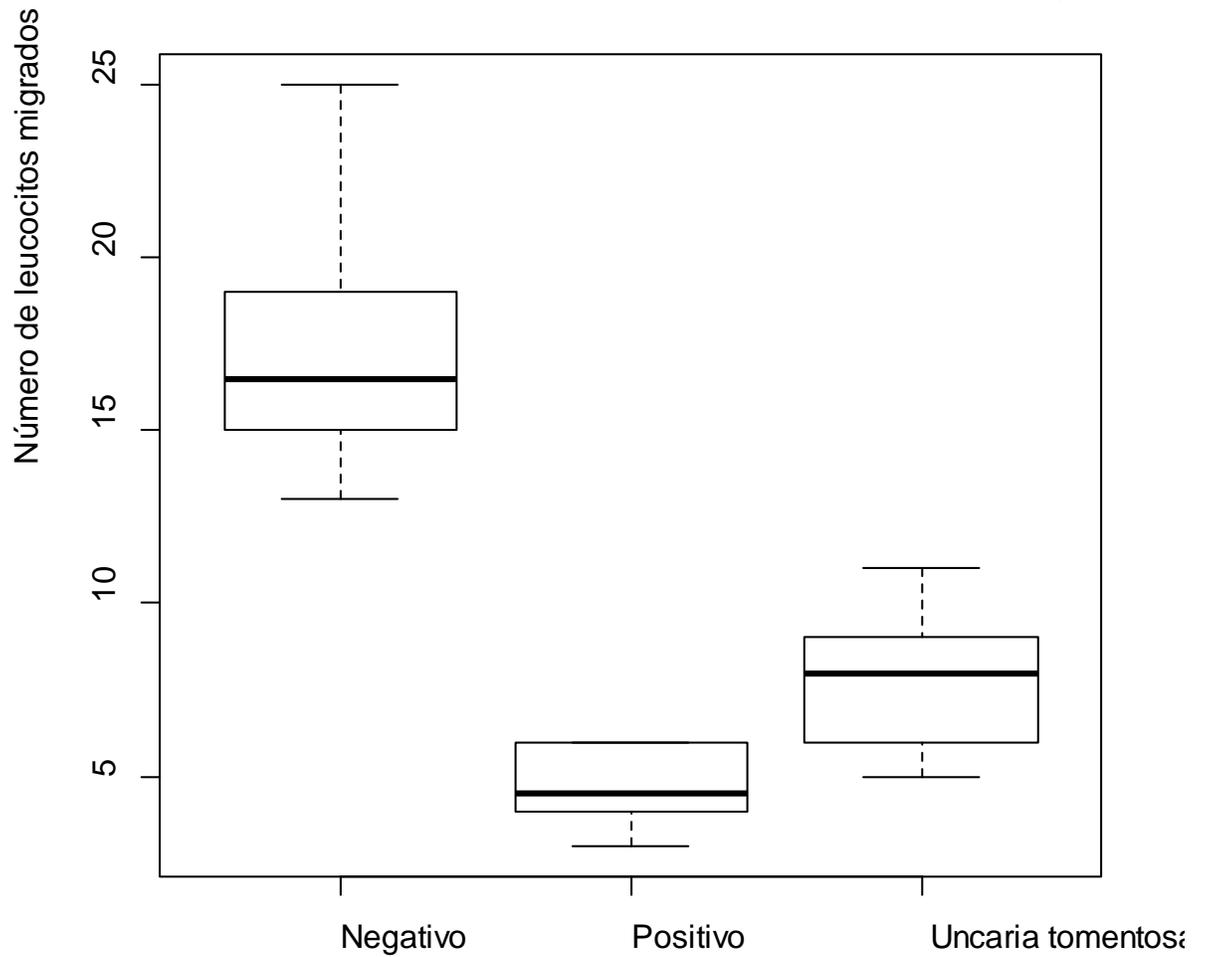
Anexo 17: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebra del extracto clorofórmico de *Uncaria tomentosa* (hojas y tallo herbario) 200 µg/ml.

Uncaria tomentosa (tallos her



Anexo 18: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebras del extracto clorofórmico de *Uncaria tomentosa* (tallos herbario) 200 µg/ml.

Uncaria tomentosa (hojas) 200



Anexo 19: Ensayo de Migración Leucocitaria inducida por lipopolisacárido en peces cebras del extracto clorofórmico de *Uncaria tomentosa* (hojas) 200 µg/ml.