



# **INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

## **ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**

---

---

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E  
INVESTIGACIÓN

**“Evaluación de la actividad antiartrítica de acetato de  
lupeol y derivado de Br-5-ASA en un modelo murino”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA**

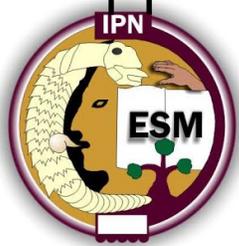
PRESENTA:

**I.F.B. ÓSCAR RENÉ ZAMBRANO VÁSQUEZ**

DIRECTORAS:

**D. EN C. JESSICA ELENA MENDIETA WEJEBE**

**D. EN C. MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES**



**Ciudad de México, DICIEMBRE 2018**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS  
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Ciudad de México, a 15 de noviembre de 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. En su sesión ordinaria No. 11 celebrada el día 07 del mes de noviembre de 2018 conoció la solicitud presentada por el alumno:

<b>Zambrano</b> Apellido paterno	<b>Vásquez</b> Apellido materno	<b>Oscar René</b> Nombre (s)
		Con registro: <b>A 1 7 0 5 3 3</b>

Aspirante de la: Maestría en Ciencias en Farmacología

1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:  
**“Evaluación de la actividad antiartrítica de acetato de lupeol y derivado de Br-5-ASA en un modelo murino”**

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:  
Resumen (versión español e inglés), Introducción (Antecedentes, Justificación y Objetivos),  
Material y Métodos, Resultados, Análisis, Conclusiones y Bibliografía

2.- Se designan como Directoras de Tesis a las Profesoras:  
**Dra. Jessica Elena Mendieta Wejebe y la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes**

3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:  
**el Laboratorio de Biofísica y Biotatálisis, Unidad de Investigación Médica en Farmacología (UIMF)**

que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directoras de Tesis

Dra. Jessica Elena Mendieta Wejebe

Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

Aspirante

Presidente del Colegio

Oscar René Zambrano Vásquez

Dr. Angel Ivan Orlando Rubio Gayosso  
  
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 11:00 horas del día 14 del mes de noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina para examinar la tesis titulada:

**“Evaluación de la actividad antiartrítica de acetato de lupeol y derivado de Br-5-ASA en un modelo murino”**

Presentada por el alumno:

**Zambrano**  
Apellido paterno

**Vásquez**  
Apellido materno

**Oscar René**  
Nombre(s)

Con registro: 

A	1	7	0	5	3	3
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de la:

**Maestría en Ciencias en Farmacología**

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directoras de tesis

\_\_\_\_\_  
Dra. Jessica Elena Mendieta Wejebe

\_\_\_\_\_  
Dra. María Adelina Jiménez Arellanes

\_\_\_\_\_  
Dra. Judith Espinosa Raya

\_\_\_\_\_  
Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández

\_\_\_\_\_  
Dr. José Correa Basurto

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

\_\_\_\_\_  
Dr. Angel Ivan Orlando Rubio Gayosso



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA  
I. P. N.  
SECCION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL  
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 14 del mes noviembre del año 2018, el que suscribe **Oscar René Zambrano Vásquez** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias en Farmacología** con número de registro **A170533**, adscrito a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Jessica Elena Mendieta Wejebe** y la **Dra. María Adelina Jiménez Arellanes** cede los derechos del trabajo titulado “**Evaluación de la actividad antiartrítica de acetato de lupeol y derivado de Br-5-ASA en un modelo murino**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **renezambrano2513@gmail.com**, si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

  
\_\_\_\_\_  
**Oscar René Zambrano Vásquez**



**ESTA TESIS SE REALIZÓ EN LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN FARMACOLOGÍA (UIMF), U.M.A.E. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES “BERNARDO SEPÚLVEDA GUTIÉRREZ” DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI DEL IMSS Y EN EL LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN DE BIOFÍSICA Y BIOCÁTÁLISIS DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA (ESM) DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL (IPN). EL PROYECTO FUE DIRIGIDO POR LA DRA. JESSICA ELENA MENDIETA WEJEBE Y LA DRA. MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES.**

**EL FINANCIAMIENTO FUE OTORGADO POR EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT: 1010/0532/2014), LA SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO (SIP: 20180810), ASÍ COMO EL APOYO OTORGADO POR LA COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD, IMSS; MEDIANTE EL FONDO DE INVESTIGACIÓN EN SALUD CON LOS PROYECTOS FIS/IMSS/PROT/G15/1414 Y FIS/IMSSPROT/17-2/1739 CON EL REGISTRO ANTE EL COMITÉ NACIONAL DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA CON NÚMERO DE REGISTRO CNIC R-2014-785-075 Y R-2018-3601-056**

**OSCAR RENÉ ZAMBRANO VÁSQUEZ RECIBIÓ UNA BECA OTORGADA POR EL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (No MATRICULA 99097557) Y EL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT: 1010/0532/2014)**

## CONTENIDO GENERAL

	<b>Página</b>
ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	V
ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XII

# INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	3
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	4
<b>2.1 Proceso inflamatorio</b> .....	4
<b>2.2 Fármacos antiinflamatorios</b> .....	5
<b>2.2.1 Antiinflamatorios esteroideos</b> .....	6
<b>2.2.2 Reacciones adversas de los antiinflamatorios esteroideos</b> .....	8
<b>2.2.3 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)</b> .....	8
<b>2.2.4 Reacciones adversas de los AINES</b> .....	10
<b>2.2.5 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME)</b> .....	11
<b>2.2.6 Reacciones adversas de los FAME</b> .....	13
<b>2.2.7 Terapia biológica</b> .....	14
<b>2.2.8 Reacciones adversas de la terapia biológicas</b> .....	16
<b>2.3 Artritis Reumatoide</b> .....	16
<b>2.3.1 Etiología</b> .....	16
<b>2.3.2 Epidemiología</b> .....	17
<b>2.3.3 Patogenia</b> .....	18
<b>2.4 Antecedentes del Ácido 5-aminosalicílico</b> .....	20
<b>2.4.1 Mecanismo de Acción</b> .....	21
<b>2.4.2 Ácido Bromo-5-Aminosalicílico (Br-5-ASA) [Ácido (2E)-5-(3-bromo-3-carboxiacrilamida)-2-hidroxibenzoico]</b> .....	22
<b>2.5 Compuestos puros obtenidos de plantas medicinales con actividad antiartrítica</b> .....	23
<b>2.6 Lupeol y sus derivados</b> .....	30
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	34
<b>4 HIPÓTESIS</b> .....	35
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	36
<b>5.1 General</b> .....	36
<b>5.2 Específicos</b> .....	36
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	37
<b>6.1 Procedimientos generales</b> .....	37
<b>6.2 Obtención del AL</b> .....	38

6.3	Síntesis del derivado Br-5-ASA.....	38
6.4	Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> .....	39
6.4.1	Modelo de inflamación tópica (TPA).....	40
6.4.2	Modelo de inflamación sistémica (carragenina) .....	40
6.4.3	Determinación de la dosis efectiva media (DE <sub>50</sub> ).....	41
6.4.4	Modelo de inflamación crónico (AFC).....	41
6.5	Análisis estadístico .....	44
7	<b>RESULTADOS</b> .....	45
7.1	Obtención del acetato de lupeol a partir del extracto orgánico de <i>C. tehuacanensis</i> .....	45
7.1.1	Fraccionamiento primario del extracto orgánico (CtH) .....	46
7.1.2	Fraccionamiento secundario de la fracción 40-58.....	48
7.1.3	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 49-53.....	51
7.1.4	Fraccionamiento terciario de fracciones ricas en AL .....	53
7.2	Síntesis e identificación del derivado de Br-5-ASA .....	55
7.3	Evaluación de la actividad antiinflamatoria <i>in vivo</i> .....	57
7.3.1	Evaluación de AL en el modelo de TPA.....	57
7.3.2	Evaluación de Br-5-ASA en el modelo de TPA.....	59
7.3.3	Evaluación de AL en el modelo carragenina .....	60
7.3.4	Evaluación de Br-5-ASA en el modelo de carragenina .....	63
7.3.5	Determinación de la DE <sub>50</sub> de FBZ.....	65
7.3.6	Evaluación antiartrítica del AL.....	67
7.3.7	Evaluación antiartrítica de Br-5-ASA.....	77
8	<b>DISCUSIÓN</b> .....	89
8.1	Actividad antiinflamatoria tópica de AL .....	89
8.2	Actividad antiinflamatoria tópica de Br-5-ASA .....	89
8.3	Actividad antiinflamatoria sistémica de AL .....	90
8.4	Actividad antiinflamatoria sistémica de Br-5-ASA.....	91
8.5	Actividad antiartrítica de AL .....	91
8.6	Actividad antiartrítica de Br-5-ASA .....	93
9	<b>CONCLUSIÓN</b> .....	94
10	<b>PERSPECTIVAS</b> .....	95
11	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

		Pag
Figura 1.	Fases de inflamación aguda y crónica	5
Figura 2.	Esquema a nivel celular de la fisiopatología de la AR en una articulación diartrodial	19
Figura 3.	químicas ácido 5-aminosalicílico (A) y Sulfasalazina (B)	20
Figura 4.	Estructuras químicas de Mesalazina (A), Olsalazina (B) y Balzalizida (C).	21
Figura 5.	Estructura química del derivado Br-5-ASA.	23
Figura 6.	Estructuras químicas tomentina (A) y ácido esphaerálcico (B).	24
Figura 7.	Estructuras químicas catequina (A) y baicaleína (B).	26
Figura 8.	Estructura química baicalina.	27
Figura 9.	Estructuras químicas apigenina (A) y resveratrol (B).	28
Figura 10.	Estructura química del ácido clorogénico.	28
Figura 11.	Estructura química de la magniferina	29
Figura 12.	Estructura química del AL.	31
Figura 13.	Síntesis del derivado de Br-5-ASA	39
Figura 14.	CCF de fracciones de baja polaridad del extracto CtH.	46
Figura 15.	Cromatograma de la fracción 40-58	48
Figura 16.	CCF de fracciones ricas en AL del extracto CtH.	49
Figura 17.	Cromatograma de la fracción 40-55	50
Figura 18.	Estructura química del AL determinado mediante difracción de rayos X	51
Figura 19.	Placas cromatográficas ricas en el compuesto de interés presentes en el fraccionamiento secundario 49-53	52
Figura 20.	Cromatograma de la fracción secundaria 49-53/4-21	53
Figura 21.	Perfil cromatográfico de fracciones ricas en el compuesto de interés.	54
Figura 22.	Cromatogramas de las fracciones a) CtH <sub>6</sub> 12-15 b) CtH <sub>6</sub> 18-19 y c) CtH <sub>6</sub> 22-25	55
Figura 23.	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del derivado de Br-5-ASA	57
Figura 24.	Actividad antiinflamatoria aguda tópica del AL sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones machos Balb/c machos	58
Figura 25.	Actividad antiinflamatoria aguda tópica de Br-5-ASA sobre la diferencia de peso del edema auricular inducido con TPA en ratones machos Balb/c machos.	59

Figura 26.	Actividad antiinflamatoria de AL (20,50 y 100 mg/kg) sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos	61
Figura 27.	Actividad antiinflamatoria de AL (150 y 250 mg/kg) sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos	62
Figura 28.	Actividad antiinflamatoria de Br-5-ASA sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/C machos.	64
Figura 29.	Actividad antiartrítica de FBZ sobre el edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos.	66
Figura 30.	Actividad antiartrítica de AL sobre el edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos.	67
Figura 31.	Reducción del edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos tratados con AL.	69
Figura 32.	Ganancia de peso (g) de AL en modelo de artritis inducido con AFC en ratones Balb/C machos	70
Figura 33.	Numero de linfocitos absolutos presentes en ganglio poplíteo. tratado con AL en modelo de artritis inducido con AFC	71
Figura 34.	Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con AL en modelo de artritis inducido con AFC.	72
Figura 35.	Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con AL (modelo de artritis inducido con AFC).	73
Figura 36.	Análisis histológico de la articulación de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.	74
Figura 37.	Análisis histológico del tejido blando de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.	75
Figura 38.	Análisis histológico del hígado de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo de inflamación crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.	76
Figura 39	Análisis histológico de ganglios poplíteos de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg).	77
Figura 40.	Actividad antiartrítica de Br-5-ASA sobre el edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos	78

Figura 41.	Reducción del edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos tratados con Br-5-ASA.	79
Figura 42.	Ganancia de peso de Br-5-ASA en modelo de artritis inducido con AFC en ratones Balb/C machos	81
Figura 43.	Numero de linfocitos absolutos presentes en ganglio poplíteo. tratado con Br-5-ASA en modelo de artritis inducido con AFC	82
Figura 44.	Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA (modelo de artritis inducido con AFC).	83
Figura 45	Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA (modelo de artritis inducido con AFC).	84
Figura 46	Análisis histológico de la articulación de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.	85
Figura 47.	Análisis histológico del tejido blando de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.	86
Figura 48.	Análisis histológico del hígado de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.	87
Figura 49.	Análisis histológico de ganglios poplíteos de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.	88

## ÍNDICE DE TABLAS

		Pag.
Tabla 1.	Recomendaciones de la EULAR para la dosis de GC, aplicaciones clínicas y relación entre dosis	7
Tabla 2.	Terapia farmacológica convencional de AINES en el tratamiento de AR	9
Tabla 3.	FAME's utilizados en el tratamiento de la AR	12
Tabla 4.	Agentes biológicos utilizados en el tratamiento de la AR	15
Tabla 5.	Fraccionamiento primario del extracto de <i>Cnidioscolus tehuacanensis</i> (CtH)	47
Tabla 6.	Fraccionamiento secundario	49
Tabla 7.	Fraccionamiento químico secundario de la fracción F49-53	52
Tabla 8.	Fraccionamiento químico terciario para la obtención de AL	54
Tabla 9.	Actividad antiinflamatoria (porcentaje de inhibición) de AL sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones Balb/c machos	58
Tabla 10	Actividad antiinflamatoria (porcentaje de inhibición) de Br-5-ASA sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones Balb/c machos	60
Tabla 11	Actividad antiinflamatoria de AL sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos	63
Tabla 12.	Actividad antiinflamatoria de Br-5-ASA sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos	65
Tabla 13	Actividad antiinflamatoria de FBZ sobre el edema suplantar crónico inducido con AFC en ratones Balb/c machos	66
Tabla 14	Actividad antiinflamatoria de AL sobre el edema suplantar crónico inducido con AFC en ratones Balb/c machos	68
Tabla 15	Ganancia de peso de animales tratados con AL (125 mg/kg)	69
Tabla 16.	Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con AL (modelo de artritis inducido con AFC).	71
Tabla 17.	Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con AL (modelo de artritis inducido con AFC).	73
Tabla 18.	Actividad antiinflamatoria y porcentaje de inhibición del Br-5-ASA sobre el edema crónico inducido con AFC en ratones Balb/c machos.	78
Tabla 19	Ganancia de peso de animales tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg)	80
Tabla 20.	Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con Br--ASA (modelo de artritis inducido con AFC).	82

Tabla 21.	Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA (modelo de artritis inducido con AFC).	84
-----------	--	----

## Abreviaturas

<b>AA</b>	Acido araquidónico	<b>IL</b>	Interleucina
<b>ACR</b>	Colegio americano de reumatología	<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa inducible
<b>AcOEt</b>	Acetato de etilo	<b>LPx</b>	Lipoperoxidación
<b>AFC</b>	Adyuvante de Freund Completo	<b>MCP-1</b>	Proteína quimiotáctica de monocitos
<b>AINES</b>	Antiinflamatorios no esteroideos	<b>MPO</b>	Mieloperoxidasa
<b>AL</b>	Acetato de lupeol	<b>MS</b>	Membrana sinovial
<b>AR</b>	Artritis reumatoide	<b>MTX</b>	Metotrexato
<b>Br-5-ASA</b>	Ácido Bromo-5-aminosalicílico	<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina	<b>n-but</b>	n-butanol
<b>CAT</b>	Catalasa	<b>NF-kB</b>	Factor nuclear potenciador de cadenas ligeras kappa de las células B
<b>CCF</b>	Cromatografía en capa fina	<b>PKC</b>	Proteína Cinasa C
<b>CC-FN</b>	Cromatografía en columna de fase normal	<b>PG</b>	Prostaglandinas
<b>CMN</b>	Centro Médico Nacional	<b>PM</b>	Plantas medicinales
<b>CU</b>	Colitis ulcerosa	<b>Pox</b>	Peroxidación
<b>CG-EM</b>	Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	<b>PPAR-γ</b>	Receptor activado por proliferador de peroxisomas
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa	<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>CU</b>	Colitis ulcerosa	<b>Rt</b>	Tiempo de retención
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media	<b>Rf</b>	Factor de referencia
<b>DAS28</b>	Puntuación de la actividad de la enfermedad	<b>TL-R</b>	Receptor Toll-Like
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dosis efectiva media	<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>EDTA</b>	Ácido etildiaminotetraacético	<b>SSI</b>	Solución salina inyectable
<b>EULAR</b>	Liga Europea Contra El Reumatismo	<b>SSZ</b>	Sulfasalazina
<b>FAME</b>	Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad	<b>TBA</b>	Ácido tiobarbitúrico
<b>FR</b>	Factores reumatoideos	<b>TCA</b>	Tricloroacético
<b>GC</b>	Glucocorticoide	<b>TNF-α</b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa	<b>TPA</b>	13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
<b>HAQ</b>	Cuestionario de evaluación de la salud	<b>Tx</b>	Tromboxano
<b>HCQ</b>	Hidroxicloroquina	<b>5-ASA</b>	Ácido 5-aminosalicílico

## RESUMEN

El acetato de lupeol (AL) es un triterpeno que ha sido aislado de la nuez de karite (*Vitellaria paradoxa*), mango (*Mangifera indica*), pimiento verde (*Capsicum annuum*), de *C. tehuacanensis* y de otras especies. El AL posee varias actividades biológicas destacando la actividad antiinflamatoria en modelo sistémico (inducción del edema con Carragenina) y tópico, también se describe que presenta efecto preventivo en caso de osteoporosis, así como antioxidante, anticancerígeno e inmunomodulador.

El Br-5-ASA es un derivado del ácido 5 aminosalicílico (5-ASA), el cual fue desarrollada para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, cuyo mecanismo de acción es inhibir la producción de eicosanoides, citoquinas y unión al interferón. A la fecha, se ha reportado la actividad antiinflamatoria tópica del Br-5-ASA en modelo TPA (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato), mostrando un efecto similar al fármaco de referencia (0.46 mg/oreja); así mismo, se evaluó la actividad antioxidante por el método colorimétrico empleando DPPH y ABTS, a la concentración 0.012 mM mostró 16% de inhibición de DPPH y 21% de inhibición para ABTS. Así mismo el Br-5-ASA fue evaluado en modelo murino donde a la dosis de 2 g/kg no mostró efectos adversos ni toxicidad.

Tanto el AL como Br-5-ASA mostraron actividad antiinflamatoria tópica y sistémica (TPA y carragenina), presentando las siguientes  $DE_{50}$  = 0.91 mg/oreja (AL) y 2.15 mg/oreja (Br-5-ASA) en el modelo tópico y su efecto máximo en el modelo sistémico se observó a la 5ª hora, siendo su  $DE_{50}$  = 243.9 y 239.23 mg/kg, respectivamente.

Por otro lado, en el modelo de artritis inducido con AFC, AL (125 mg/kg) mostró un efecto antiinflamatorio similar al fármaco de referencia (FBZ, 100 mg/kg), donde el efecto antiinflamatorio máximo mostrado fue >40% a partir del día 15 al día 28, mientras que Br-5-ASA (125 mg/kg), presentó una moderada actividad antiinflamatoria, con un efecto máximo no mayor al 25% en comparación con FBZ (100 mg/kg).

También se llevó a cabo la cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos, donde el AL presentó la concentración más baja de esta enzima mostrando 8.99 U/mg proteína, en comparación con AFC el cual mostro 11.37 U/mg proteína y FBZ 10.14 U/mg proteína, mientras que el Br-5-ASA presentó 10.94 U/mg proteína, valor similar a FBZ.

Por último el análisis histológico realizado en articulación, tejido blando, hígado y ganglio, mostró que los animales tratados con AL presentaron una reducción de la inflamación en el tejido sinovial, así como una reducción de la concentración leucocitaria en el sitio de lesión en comparación con AFC y no mostro daño a nivel hepático, mientras que el Br-5-ASA también redujo el proceso inflamatorio y una reducción de linfocitos en el sitio de lesión mostro un ligero daño hepático generado por la administración continua a una dosis de 125 mg/kg.

## ABSTRACT

Lupeol acetate (AL) is a triterpene that has been isolated from the karite nut (*Vitellaria paradoxa*), mango (*Mangifera indica*), green pepper (*Capsicum annuum*), *C. tehuacanensis* and other species. The AL has several biological activities highlighting the anti-inflammatory activity in systemic model (induction of edema with Carrageenan) and topical, it is also described as having a preventive effect in case of osteoporosis, as well as antioxidant, anticancer and immunomodulator. In relation to the toxicity studies, the toxicity of Lupeol Acetate has not been determined, however, the Lupeol precursor molecule has no toxicity in animal models, where at 2 g/kg orally it did not produce adverse effects in rats or mice.

Br-5-ASA is a derivative of 5-aminosalicylic acid (5-ASA), which was developed for the treatment of chronic intestinal inflammatory diseases, whose mechanism of action is to inhibit the production of eicosanoids, cytokines and interferon binding. To date, the topical anti-inflammatory activity of Br-5-ASA has been reported in the TPA model, showing an effect similar to the reference drug (0.46 mg / ear); Likewise, the antioxidant activity was evaluated by the colorimetric method using DPPH and ABTS, at the concentration 0.012 mM showed 16% inhibition of DPPH and 21% inhibition for ABTS. Likewise, Br-5-ASA was evaluated in a murine model where, at a dose of 2 g/kg, it did not show adverse effects or toxicity.

Both AL and Br-5-ASA showed topical and systemic anti-inflammatory activity (TPA and carrageenan), presenting the following  $ED_{50} = 0.91$  mg/ear (AL) and 2.15 mg/ear (Br-5-ASA) in the topical model and its maximum effect in the systemic model was observed at the 5th h, with its  $ED_{50} = 243.9$  and 239.23 mg / kg, respectively.

Furthermore, in the model of arthritis induced with AFC, AL (125 mg/kg) showed an antiinflammatory effect similar to reference drug (FBZ, 100 mg/kg), where the anti-inflammatory effect maximum shown was > 40% from day 15 to day 28, while Br-5-ASA (125 mg/kg), showed a moderate anti-inflammatory activity, with a maximum effect no greater than 25% compared to FBZ (100 mg/kg).

The quantification of COX-2 in popliteal ganglia was also carried out, where the AL showed the lowest concentration of this enzyme showing 8.99 U/mg protein, in comparison with AFC which showed 11.37 U / mg protein and FBZ 10.14 U/mg protein, while Br-5-ASA presented 10.94 U/mg protein, similar to FBZ.

Finally, the histological analysis performed on joint, soft tissue, liver and ganglion, showed that the animals treated with LA presented a reduction of inflammation in the synovial tissue, as well as a reduction of the leukocyte concentration at the site of injury compared to AFC and showed no damage to the liver, while Br-5-ASA also reduced the inflammatory process and a reduction of lymphocytes at the site of injury showed a slight liver damage generated by continuous administration at a dose of 125 mg/kg .

# 1 INTRODUCCIÓN

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad inflamatoria crónica, autoinmune y sistémica, que provoca principalmente deformidades en articulaciones y discapacidad funcional de articulaciones a lo largo de su evolución, afectando principalmente a las articulaciones diartrodiales de las manos pies y rodillas

La AR presenta una prevalencia aproximada del 0.5 % solamente en América Latina, y en México afecta al 1.6 % de la población en general, estadísticamente representa la principal causa de consultas en servicios de reumatología

En relación a su patogenia, la AR se encuentra bien caracterizada, ya que se observa una alteración de los elementos celulares que residen en el tejido conectivo de la membrana sinovial (MS), la cual se caracteriza por la proliferación y acumulación de diversos tipos de células inmunitarias y la producción excesiva de líquido sinovial, esta sinovitis aguda se manifiesta en las fases iniciales de la AR

Existe actualmente una amplia variedad de fármacos antiinflamatorios capaces de evitar una respuesta inflamatoria inducida por diferentes mediadores proinflamatorios. Sin embargo, es necesario contribuir en la búsqueda de nuevas alternativas para tratar la artritis ya sean de fuente natural o derivados de síntesis química.

El AL y Br-5-ASA son moléculas con actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda, por lo que constituyen candidatos a ser evaluados en el modelo de inflamación crónica y pueden ser alternativa en la terapia que cursan con inflamación crónica como la AR, esto con el objetivo de reducir costos de tratamiento y/o efectos adversos.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 Proceso inflamatorio

La inflamación es la respuesta inmunológica del organismo debido a un daño celular o vascular ocasionado por una agresión física, biológica o química. Por lo general esta respuesta se caracteriza por presentar cinco síntomas básicos: calor, rubor, edema, dolor y pérdida de la función y tiene como objetivo reparar el sitio de lesión afectado por el agente causal de dicha lesión. La naturaleza del agente causante de la lesión, influye en el tipo de inflamación que se presenta, así como su duración e intensidad (1,2). Así mismo, es considerada una condición patológica subyacente a una serie de padecimientos como enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus, cáncer, enfermedades inflamatorias crónicas, AR, entre otras (3,4).

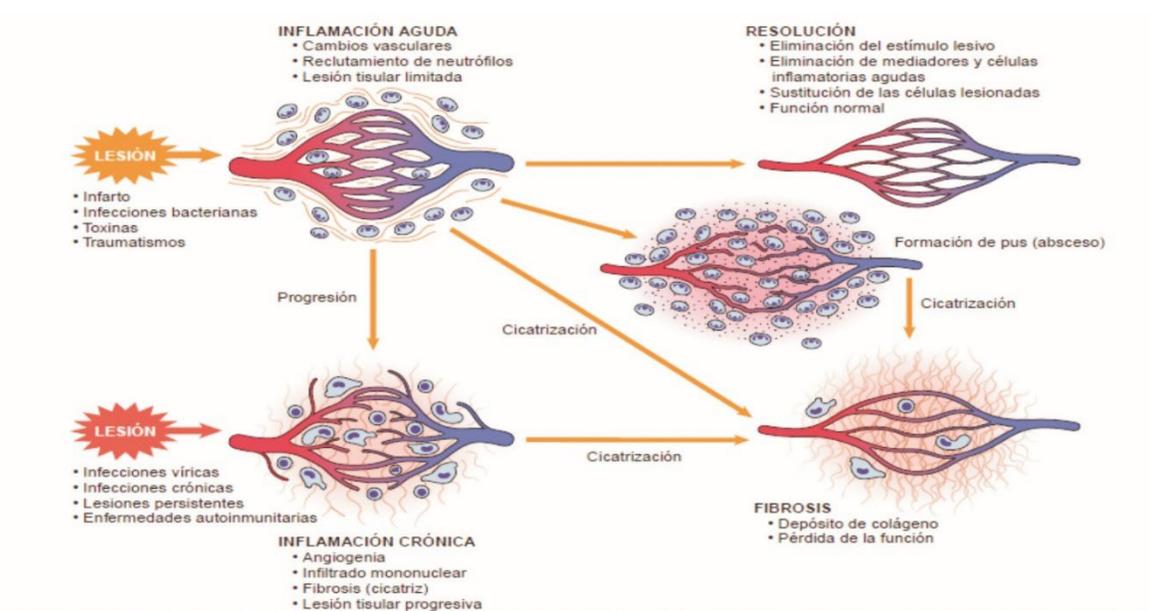
Esta respuesta inmunológica o condición patológica puede presentarse en dos fases: inflamación aguda y crónica; la primera se desarrolla durante los primeros minutos, horas, inclusive pocos días (cinco días como máximo) después de ocasionado el daño tisular; presentándose exudación de fluidos, activación de diferentes mediadores inflamatorios y acumulación de proteínas plasmáticas culminando con la formación de un edema (5). Además, existe una transición continua de leucocitos hacia el sitio de lesión (Figura 1).

Por otro lado, el proceso crónico se desarrolla cuando la acción del agente causal persiste y presenta mayor duración; se caracteriza porque en el sitio de lesión hay acumulación de células del sistema inmune (linfocitos B, linfocitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup>, células dendríticas, neutrófilos, mastocitos y macrófagos) (6). Por otra parte, los macrófagos son las células más importantes que participan durante la respuesta inmune; sin embargo, estas células no tienen la capacidad de replicación y suelen lisarse en el sitio de lesión, por lo que deben ser sustituidos por macrófagos nuevos; durante el proceso agonizante, los macrófagos liberan enzimas capaces de iniciar un proceso de licuefacción donde células sanas adyacentes y en conjunto con el antígeno forman un producto llamado pus; este producto también es indicativo de cuando un proceso inflamatorio agudo comienza a convertirse en crónico, el cual sí no es

tratado a tiempo ocasionará consecuencias como destrucción del tejido, fibrosis y necrosis tisular (7).

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> juegan un papel central en la respuesta inmune adaptativa, mediante la generación de distintas interleucinas (IL) como IL-1, IL-6, IL-8, IL-17, las cuales han sido descritas en la literatura como importantes citocinas proinflamatorias en un proceso inflamatorio crónico (8,9)

La sobreexpresión de las citocinas proinflamatorias descritas ha sido reportada para diversas enfermedades crónico degenerativo, principalmente sobre aquellas que generan daños a nivel estructural como AR, lupus eritematoso, arterosclerosis entre otras (10).



**Figura 1.** Fases de inflamación aguda y crónica

## 2.2 Fármacos antiinflamatorios

Existen en el mercado medicamentos capaces de evitar la respuesta inflamatoria inducida por diferentes mediadores; dentro de estos existen cuatro tipos que se describen a continuación:

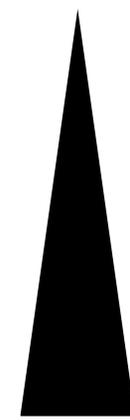
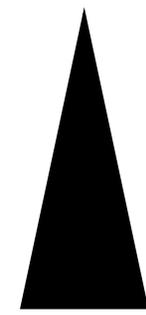
### **2.2.1 Antiinflamatorios esteroideos**

Los glucocorticoides (GC) endógenos como cortisol, testosterona o aldosterona cumplen importantes funciones regulatorias en el organismo; como el metabolismo de carbohidratos, catabolismo de proteínas y regulación de procesos inflamatorios. Por otro lado, los GC en relación a sus actividades terapéuticas poseen acción antiinflamatoria e inmunosupresora, debido a ello se encuentran entre los fármacos más ampliamente recetados para tratar un amplio espectro de enfermedades inflamatorias y autoinmunes (11). Barnes & Adcock y otros autores mencionan que este grupo de fármacos son los antiinflamatorios más efectivos en el tratamiento de diversas enfermedades autoinmunes inflamatorias como asma, AR, sepsis, colitis ulcerosa (CU), esclerosis múltiple o enfermedad inflamatoria intestinal (11,12).

Su actividad antiinflamatoria se debe a la inhibición o represión de genes pro-inflamatorios mediante la transducción de señales a través del receptor de GR, que conlleva a la inhibición de la vasodilatación, proliferación celular, exudación y formación del edema. Sus mecanismos de acción son variados, entre ellos suprimen la activación de diferentes mediadores inflamatorios, inhiben la entrada de neutrófilos al sitio de acción, bloqueando la expresión de moléculas de adhesión celular, de esta manera los leucocitos no pueden fijarse al endotelio y por ende no llegan hacia el foco de la inflamación (13,14).

En el tratamiento de AR existe diversas recomendaciones, donde mencionan la importancia de la terapia con GC, la “Liga Europea Contra el Reumatismo” (EULAR) en el año 2002 llevo a cabo una distinción entre las dosis utilizadas de GC (baja, mediana, alta o muy alta) y sus efectos a nivel genómicos (Tabla 1) (15).

**Tabla 1.** Recomendaciones de la EULAR para la dosis de GC, aplicaciones clínicas y relación entre dosis [Tomada de Strehl et al. (15)].

Terminología	Eq Prednisolona/día	Aplicación clínica	Efectos genómicos	Efectos no genómicos
Dosis baja	≤ 7 mg	Terapia de mantenimiento		
Dosis media	> 7.5 mg & ≤ 30 mg	Enfermedad reumática crónica principalmente		
Dosis alta	> 30 mg & ≤ 100 mg	Tratamiento inicial de enfermedades subagudas, incluidas las agudizaciones no mortales y las complicaciones viscerales de la AR		
Dosis muy alta	> 100 mg	Tratamiento inicial de amenaza aguda o potencialmente mortal		
Terapia de pulso	> 250 mg (1-5 días)			

Los GC se clasifican en relación al tiempo de acción terapéutica como (16):

- de acción corta: duración entre 6-12 horas (Hidrocortisona)
- de acción intermedia: duración entre 12-36 horas (Prednisolona, Metilprednisolona, Triamcinolona y Deflazacort)
- de acción prolongada: entre 36-72 horas (Dexametasona y Betametasona)

Dentro de los fármacos más empleados para controlar los episodios de AR, se encuentran los GC no fluorados, tales como la Prednisona y la Prednisolona (17). van Vollenhoven menciona que la administración de GC a dosis bajas por tiempo prolongado ayuda a disminuir la progresión del daño articular, lo que se traduce en un efecto protector de la estructura dañada. Así mismo, la guía realizada por el Colegio Americano de Reumatología (ACR) recomienda el uso de GC a dosis bajas (≤ 10 mg/día de prednisona o equivalente) en pacientes con AR moderada o severa (18,19).

Respecto a los costos de los GC en el tratamiento de enfermedades inflamatorias, específicamente AR; Boers & Buttgereit realizaron un estudio, donde describen que paciente con AR tratados con Prednisona de liberación prolongada (5 mg/kg) puede retrasar el inicio de tratamiento con FAME, lo que genero considerables ahorros por parte de los pacientes, donde los costos de fármacos biológicos ascienden a

aproximadamente €15,000/año y la Prednisona cuesta aproximadamente €1/día, generando ahorros de €395 euros/paciente al retrasar el tratamiento biológico durante 12 semanas. Por lo que al modificar las estrategias en el tratamiento de AR, optimizando el uso de GC se genera importante ahorro, específicamente al retrasar o evitar la necesidad de administrar medicamentos biológicos de alto costo (20,21).

### **2.2.2 Reacciones adversas de los antiinflamatorios esteroideos**

Los GC tienen una alta incidencia en lo que se refiere a eventos adversos frecuentes y graves; los tratamientos farmacológicos a largo plazo pueden provocar linfopenia, debido que, al bloquear la liberación de linfocitos al sitio de inflamación, estos quedan libres y circundantes en diversas áreas y suelen ser destruidos por apoptosis; por otra parte, también se produce neutrofilia y acumulación de colágeno y provocan un aumento de excreción glomerular en el riñón. A nivel cardiovascular provoca hipertensión e hipotensión arterial, debilidad muscular por catabolismo excesivo del músculo y bloquea la liberación de la hormona del crecimiento (22).

Así mismo, la administración oral por tiempo prolongado de Prednisona a dosis > 5 mg/día, puede reducir la densidad mineral ósea y aumenta el riesgo de fractura (osteoporosis). En el sistema nervioso central ocasionan eventos psiconeurológicos, que van desde euforia, insomnio, ansiedad, depresión hasta reacciones psicóticas. Su uso es limitado a un periodo de tiempo corto, el uso prolongado de los corticoides puede provocar un síndrome de abstinencia. Cabe mencionar que el organismo por sí mismo produce esteroides, tales como, y al administrar estos de forma exógena, el organismo deja de producirlos de forma endógena (23).

### **2.2.3 Antiinflamatorios no esteroideos (AINES)**

Algunos ejemplos de los más empleados se describen en la Tabla 2. Estos compuestos son antipiréticos y analgésicos; aunque comparten características

terapéuticas similares, su eficacia relativa puede ser diferente dependiendo de su especificidad, de igual manera son fármacos paliativos, dado que su función es sólo el alivio de los síntomas sin modificar el origen del padecimiento *per se* (24,25).

Los AINES son principalmente inhibidores de la ciclooxigenasa (COX), enzima capaz de transformar el ácido araquidónico (AA) en endoperóxidos cíclicos inestables dando paso a la generación de prostaglandinas (PG) y tromboxanos (TX); sin embargo, no poseen la capacidad de inhibir toda la cascada de inflamación que tiene origen a partir del AA, no intervienen en la activación de lipoxigenasas capaces de dar paso a la producción de leucotrienos (24).

La Aspirina al igual que el Paracetamol, Bumadizona y Tolmetina son considerados dentro de los inhibidores de la COX-2 como los más importantes en el manejo del dolor y la inflamación en AR (18) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Terapia farmacológica convencional de AINES en el tratamiento de AR [Tomado de Cisneros Caballero et al. (10)].

Familia	Mecanismo de acción	Medicamentos	Efectos secundarios
Fármacos no esteroideos anti-inflamatorios	Efecto paliativo: antipiréticos, analgésicos y antiinflamatorio Bloquean la síntesis de PG a través de la inhibición de COX-1 y COX-2	Paracetamol	Complicaciones gastrointestinales, cardiovasculares, renales y/o hepáticas. Resistencia al tratamiento. Interacciones entre fármacos al administrarse en conjunto
		Bumadizona	
		Tolmetina	
		Aspirina Naproxeno Ibuprofeno	

Todos los AINES poseen un cociente de inhibición COX-1/COX-2, que se ve expresado como la concentración de fármaco capaz de inhibir el 50 % de esta enzima; dependiendo de su cociente de inhibición pueden ser agrupados en 4

categorías, dependiendo de la capacidad de inhibición de las isoformas COX-1 o COX-2 (24,25):

- Inhibidores selectivos de la COX-1: Como la Aspirina
- Inhibidores no selectivos de la COX: Incluye varios AINEs que muestran una relación COX-1/COX-2 determinada por la  $CI_{50}$  entre 0,5 y 3,0
- Inhibidores relativamente selectivos de la COX-2: Dentro de este grupo se encuentran el Meloxicam, Nimesulida y Diclofenaco, mostrando una relación COX-1/COX-2 determinada por la  $CI_{50}$  de 10-20
- Inhibidores altamente selectivos de la COX-2: Que comprenden al Celecoxib con relaciones COX-1/COX-2 con una relación entre 140 a 250 y Rofecoxib con una relación > 400.

La isoformas COX-1 está relacionada con la producción de PG, donde los fármacos que inhiben con mayor selectividad esta isoforma (Indometacina -Ind-, Naproxeno, Ibuprofeno) generan daño severo en los tejidos gástricos, al estar COX-1 implicado en la protección de este sistema; mientras la COX-2 es inducida por la activación de la respuesta inflamatoria mediante citocinas, endotoxinas y mitógenos; además, propicia una elevada producción de PG en la inflamación causando mayor dolor (10,24–26).

#### **2.2.4 Reacciones adversas de los AINES**

La mayoría de los AINES son no selectivos de la COX, ya que tienen la capacidad de inhibir tanto la enzima COX-1 como COX-2. A nivel fisiológico COX-1 juega un papel importante en la protección de la mucosa gástrica frente a los ácidos estomacales, el uso de AINE no selectivos provoca una reducción en la producción plaquetaria de TX-A<sub>2</sub>, lo cual conlleva a la formación de úlceras gástricas, sangrado digestivo y gastroduodenitis. Mientras que los AINES inhibidores selectivos de COX-2 provocan efectos cardiovasculares como infartos al miocardio, hipertensión arterial e insuficiencia cardiaca; esto debido a que no poseen propiedades antitrombóticas, un claro ejemplo es el retiro de Rofecoxib del mercado en el año

2004, al encontrar que incrementaba el riesgo de enfermedades cardiovasculares durante el uso prolongado (25,26).

Otros fármacos AINEs retirados del mercado son Valdecoxib y Parecoxib, los cuales son inhibidores selectivo de COX-2, reducen la biosíntesis del componente antitrombótico PGI<sub>2</sub> en vasos sanguíneos, por que generan una descompensación en la producción de TX con propiedades protrombóticas, lo cual esta correlacionado a un incremento de riesgo de eventos cardiovasculares (infartos y ataques al corazón) (27). Lumiracoxib de igual manera fue retirado del mercado al existir informes sobre hepatitis grave e insuficiencia hepática aguda (28).

Así mismo, este tipo de fármacos pueden provocar problemas renales como disfunción renal aguda, debido a que en este órgano se incrementa la síntesis de PG, las cuales tienen un papel importante en la velocidad de filtración y un adecuado flujo renal, que al ser inhibidas provoca eventos adversos como retención de agua y disminución de los niveles de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> (29).

### **2.2.5 Fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FAME)**

Otro grupo importante de fármacos antiinflamatorios son aquellos cuya acción es más lenta que los AINES y actúa modificando la respuesta inmune, bloqueando producción de citocinas proinflamatorias o actuando a nivel de linfocitos B o en células presentadoras de antígenos. Controlando manifestaciones clínicas y progresión del daño articular (30).

Aunque este tipo de fármacos son ampliamente utilizados para el tratamiento de la AR, una desventaja notable es que raramente inducen al control clínico efectivo de la enfermedad, pero sí los pacientes son tratados de manera correcta permite el retiro de los AINES y los GC (31).

Dentro de los FAME, el más utilizado es el Metotrexato (MTX); este es considerado como el estándar de oro para tratar AR, ya que inhibe la síntesis de purinas y pirimidinas, reduce la proliferación de linfocitos T y por consiguiente suprime la

inflamación mediante la liberación de adenosina (32). Otros fármacos de este grupo utilizados en el tratamiento de la AR incluyen a la Azatioprina, Ciclosporina, Hidroxicloroquina (HCQ), Leflunamida, Sulfasalazina (SSZ) y oro inyectable. Es necesario mencionar que el mecanismo de acción de estos FAME ocupados como de primera línea en el tratamiento de la AR, es, por ejemplo, la HCQ controla el proceso de autoinmunidad por varias vías, dentro de lo que se destaca su capacidad por interferir con la presentación de autoantígenos, bloquea la respuesta de linfocitos T inducida por antígenos, disminuye la producción de mediadores inflamatorios e inhibe la activación de los receptores Toll-like (TLR). Mientras que el mecanismo de acción de la SSZ radica en la inhibición de la liberación de interleucinas IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$ , así como IgM e IgG (33–35)

De la misma manera dentro de este grupo de fármacos existen diferencias respecto a su eficacia, donde la azatioprina y la HCQ son menos eficaces que MTX, SSZ y Leflunomida. La toxicidad de los fármacos FAME difiere entre estos mismos, por lo que existe una gran cantidad de FAME utilizados en el tratamiento de la AR (Tabla 3) (31).

**Tabla 3.** FAME´s utilizados en el tratamiento de la AR [Tomada de Meier et al., (36)].

Fármaco	Objetivo terapéutico	Función y efecto en el objetivo terapéutico
Metotrexato	Enzimas dependientes de folato -Dihidrofolato reductasa (DHFR) -Timidilato sintasa (TS) ATIC	DHFR, TS y ATIC Disminuye la síntesis deficiente de pirimidina y purina conduce a la inhibición de la proliferación de linfocitos AICAR Aumenta: niveles de adenosina muestran efectos antiinflamatorios
Leflunamida	Dihidroorotato deshidrogenasa (DHODH)	DHODH Disminuye: la síntesis de pirimidina alterada conduce a la inhibición de la proliferación de linfocitos
Sulfasalazina	Enzimas dependientes de folato	Mecanismo de acción poco claro; se observó inhibición de las enzimas dependientes de folato (ver metotrexato); Otros efectos descritos son: bloqueo de I $\kappa$ B e inducción de apoptosis de neutrófilos y macrófagos

Sales de oro	Interacción con aminoácidos que contienen azufre en plasma o proteínas intracelulares	Inhibición de la transducción de señales y presentación de antígenos.
Hidroxicloroquina	Lisosomas, enzimas lisosomales, TLR-9	Las propiedades lisosotrópicas dificultan la presentación del antígeno La activación del sistema inmune innato se deteriora
Tofacitinib	JAK1 and JAK3 (>JAK2 and TYK)	Disminución de la maduración y activación de leucocitos Disminución de la producción de citoquinas Disminución de la producción de inmunoglobulina

Cabe mencionar que sí el tratamiento de la AR con un solo agente terapéutico falla, es necesario llevar a cabo la combinación de distintos FAME. La combinación más utilizada en el control de esta enfermedad es la llamada “triple terapia”, basada en el uso de MTX, SSZ y la HQC, demostrando ser más efectiva que el uso de MTX como monoterapia (37)

### 2.2.6 Reacciones adversas de los FAME

En la mayoría de pacientes, este tipo de fármacos ocasiona diversos efectos secundarios como son cardiovasculares, gastrointestinales, renales y hepáticos entre otros. Al igual que las fármacos esteroideos y AINES, estos también provocan diversos efectos adversos como citotoxicidad, afectan médula ósea, de igual forma propicia una inhibición de componentes del sistema inmunitario llevándolo a desencadenar una inmunodepresión por la administración de medicamentos (22,38,39).

Otra desventaja en el empleo de este tipo de agentes, es que los pacientes pueden contraer infecciones graves u oportunistas (como tuberculosis o herpes zóster) recurrentes, al encontrarse el sistema inmune del paciente deprimido. Datos epidemiológicos demuestran que la proporción de personas que continúan tomando sales de oro después de 5 años es del 20 %, SSZ 35 % y MTX es del 57 % (31,40).

### 2.2.7 Terapia biológica

El cuarto grupo de fármacos antiinflamatorios son los clasificados como terapia biológica. Este tipo de tratamiento está dirigido principalmente a la regulación de las moléculas implicadas en la fisiopatología de la enfermedad, en el caso de la AR la terapia biológica está enfocada a inhibir la producción ciertas citocinas como IL-1, IL-6, IL-17, IL-27 y TNF- $\alpha$  (10).

Entre estas terapias la más utilizadas están el empleo de anticuerpos mononucleares específicos para diversas moléculas; por ejemplo, se ha comprobado que el uso de anticuerpos antagonistas del factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) logran disminuir la gravedad de la patología mediante la disminución de la actividad proinflamatoria de las citocinas. Etarnecept es otro ejemplo de este tipo de terapia; otros fármacos capaces de inhibir el TNF- $\alpha$  que se encuentran actualmente en el mercado son Infliximab (1999), Adalimumab (2002) y Golimumab (2009); sin embargo, una desventaja en el uso de esta terapia biológica es que son de costo elevado respecto a las terapias convencionales y con mayor complejidad (10,41).

De la misma manera existen fármacos (anticuerpos monoclonales) que actúan mediante la inhibición de IL; por ejemplo, el fármaco Anakinra inhibe IL-1 y Tocilizumab inhibe la producción de IL-6. Existen también fármacos cuya actividad es inhibir el proceso de maduración de linfocitos T y B a nivel de médula ósea como el Rituximab (10,42).

En la siguiente Tabla (Tabla 4) se muestran los fármacos biológicos más utilizados en el tratamiento de la AR.

**Tabla 4.** Agentes biológicos utilizados en el tratamiento de la AR [Tomado de Meier et al., (36)].

Nombre	Estructura	Efecto farmacológico	Dosis usual	Efectos secundarios específicos y riesgos	Aprobado por FDA
Abatacept	Molécula CTLA4 recombinante dimerizada en el marco Ig	Bloqueador de coestimulación de células T	500-1,000 mg mensuales (intravenosos)	Reacciones infusionales, infecciones	2005
Adalimumab	Monoclonal humano	Bloqueo de TNF	40 mg quincenalmente (subcutáneo)	Reacciones en el sitio de inyección, infecciones (incluida la tuberculosis)	2002
Anakinra	Antagonista del receptor de IL-1 recombinante	Bloqueo de receptor de IL-1	100 mg diario (subcutáneo)	Reacciones en el sitio de inyección, infecciones, neutropenia	2001
Certolizumab Pegol	Fragmento Fab 'pegilado de anticuerpo monoclonal humanizado	Bloqueo de TNF	200 mg quincenales o 400 mg mensuales (subcutáneo)	Reacciones en el sitio de inyección, infecciones (incluida la tuberculosis)	2009
Etarnecept	Receptor TNF recombinante (p75) dimerizado en el marco Ig	Bloqueo de TNF	50 mg semanalmente (subcutáneo)	Reacciones en el sitio de inyección, infecciones (incluida la tuberculosis)	1998
Golimumab	Monoclonal humano	Bloqueo de TNF	100 mg cada 4 semanas (subcutáneo)	Reacciones en el sitio de inyección, infecciones (incluida la tuberculosis)	2009
Infliximab	Monoclonal quimérico	Bloqueo de TNF	3-10 mg / kg cada 4-8 semanas (intravenoso)	Reacciones en el sitio de inyección, infecciones (incluida la tuberculosis)	1998
Rituximab	Monoclonal quimérico	Agotamiento de células B	1,000 mg, 2 infusiones intravenosas con 2 semanas de diferencia	Reacciones infusiónales, infecciones	2006
Tocilizumab	Monoclonal humano	Bloqueo de receptor de IL-6	8 mg / kg cada 4 semanas (por vía intravenosa)	Reacciones infusiónales, infecciones, citopenias, colesterol elevado	2010

## **2.2.8 Reacciones adversas de la terapia biológicas**

El uso de este tipo de terapias conlleva a una serie de eventos adversos, desde una inmunodepresión debido a que los linfocitos no logran madurar y por consecuencia no son activos contra algún antígeno, hasta presentarse efectos adversos como son: trastornos gastrointestinales, trastornos renales y urinarios, trastornos a nivel del sistema nervioso, lesiones traumáticas, trastornos psiquiátricos, trastornos vasculares, entre otros; además su costo es elevado (22).

Sin embargo, Damjanov et al., menciona que pacientes tratados con inhibidores de TNF- $\alpha$  tienen menor riesgo de padecer eventos cardiovasculares (infarto al miocardio) en relación a pacientes que no son tratados con TNF- $\alpha$ . Según los datos presentados por la Sociedad Británica de Reumatología, pacientes con AR fueron tratados con inhibidores de TNF- $\alpha$  o FAME, y compararon la tasa de infarto al miocardio entre estos grupos, los resultados mostraron que los pacientes tratados con inhibidores de TNF- $\alpha$  presentaron un 60% de reducción de infarto al miocardio (43).

## **2.3 Artritis Reumatoide**

### **2.3.1 Etiología**

La AR es una enfermedad inflamatoria crónica, autoinmune y sistémica de etiología multifactorial, que provoca principalmente deformidad en las articulaciones; así como, discapacidad funcional de seis o más articulaciones a lo largo de su evolución, afectando principalmente las articulaciones diartrodiales de las manos, tobillos y rodillas (10,44,45).

Respecto al comportamiento clínico, la AR puede clasificarse en tres tipos dependiendo de sus características (46).

1. Monocíclico: Aproximadamente ocurre en el 20 % de los pacientes
2. Policíclico: Se presenta en el 70 % de los casos, y puede presentarse en dos formas, una con exacerbaciones seguida de inactividad completa y otra por periodos de actividad seguidos, pero sin lograr inactividad.

3. Progresiva: Si no es tratado provoca daño articular irreversible, limitación funcional y discapacidad

De igual manera se caracteriza por generar un daño progresivo, es irreversible, altera la función de las articulaciones, provocando dolor y sensibilidad debido al hinchamiento del revestimiento sinovial, así como destrucción del cartílago (47,48).

Este tipo de afecciones (artríticas) entre ellas la AR son una de las principales causas de dolor crónico entre la población (aproximadamente 1,500 millones de personas en todo el mundo), por lo que el manejo del dolor con terapia farmacológica se ha convertido en una prioridad en salud pública, aunado al aumento de la prevalencia en la población adulta (4).

La AR está asociada con costos sustanciales, de manera directa (adquisición de fármacos para uso hospitalario) como indirectos (reducción de productividad por parte del afectado). Aunado a esto, la enfermedad está asociada con mortalidad debido a eventos cardiovasculares, generando una tasa de muerte entre 1.3 y 3.9 veces mayor que el de la población sana (48). van den Hoek et al., llevo a cabo un metaanálisis sobre la mortalidad en pacientes con AR, del año 1997-2012, observando que las causas más frecuentes de mortalidad estaban asociadas con enfermedades del sistema circulatorio (32%), neoplasmas (21%) y enfermedades respiratorias (12%). Aumentando el riesgo de mortalidad en un 54% en comparación con la población general (49).

### **2.3.2 Epidemiología**

La prevalencia de la AR varia en un rango porcentual del 0.5-2 % dependiendo del autor; así mismo, la incidencia y la prevalencia puede variar debido a factores como la ubicación geográfica, el sexo y la edad del paciente. Existen informes que mencionan un aumento en la incidencia de este padecimiento en Europa y América del Norte en función del envejecimiento subyacente de la población y el aumento de la supervivencia (20,50)

Esta enfermedad se presenta mayormente en mujeres que en hombres (3:1), la mayoría de los casos son diagnosticados entre los 40 y 80 años, con una mayor incidencia entre los pacientes nacidos en la década de los 70's, pero es importante mencionar que no es

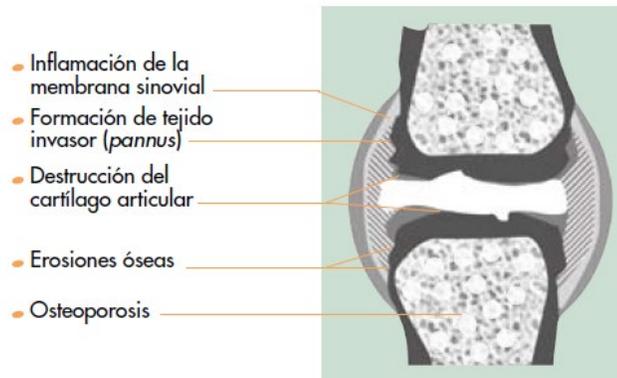
una enfermedad exclusiva de la vejez, pues suele presentarse también en jóvenes e iniciarse entre los 20 y 40 años, sí bien puede comenzar a cualquier edad, la susceptibilidad a la AR se debe en gran parte a la carga genética (22,48).

Cross et al., (2014) evaluaron la epidemiología de la AR a nivel global, donde de 291 padecimientos, la AR se clasificó como la número 42 en discapacidad global. Los años de vida vividos con discapacidad para pacientes con AR aumentaron de 2 566 000 en 1990 a 3 776 000 al 2010. Ajustando estos datos en cuestión de envejecimiento y aumento de la población, los años de vida vividos con discapacidad para pacientes con AR aumentaron de 48 por 100 000 habitantes en 1990 a 55 por 100 000 habitantes en 2010. Siendo los valores más altos en las mujeres en comparación con los hombres (51)

### **2.3.3 Patogenia**

Esta se encuentra bien caracterizada, ya que se observa una alteración de los elementos celulares que residen en el tejido conectivo de la membrana sinovial (MS), comportándose de forma pseudo-tumoral invadiendo y destruyendo tejidos continuos. Existen factores que están involucrados en su desarrollo como son los endocrinos, ambientales y genéticos, los cuales pueden variar de una población a otra (10).

El tejido sinovial inflamado (sinovitis aguda) se caracteriza por la proliferación y acumulación de diversos tipos de células inmunitarias y la producción excesiva de líquido sinovial, esta sinovitis aguda se manifiesta en las fases iniciales de la AR. Con el paso del tiempo la sinovitis se vuelve crónica, promoviendo la destrucción de la articulación a través del pannus mediante la activación de osteoclastos, condrocitos y fibroblastos sinoviales que llevan al deterioro del cartílago y hueso afectado (Figura 2) (10).



**Figura 2.** Esquema a nivel celular de la fisiopatología de la AR en una articulación diartrodial [Cisneros-Caballero et al., (10)].

Esta patología es considerada una condición autoinmune, ya que durante su desarrollo se lleva a cabo la expresión de ciertos anticuerpos representativos, incluidos factores reumatoideos (RF) y anticuerpos contra proteínas citrulinadas (ACPA) (45).

Debido a ello es necesario volver a mencionar, que la terapia farmacológica actual para el tratamiento de la AR incluye desde AINES, los cuales proporcionan un alivio sintomático, pero con una eficacia marginal; los FAME, y los agentes biológicos más nuevos. Por lo que la farmacoterapia adecuada se basa en la utilización de MTX como el agente FAME de primera línea con o sin terapia combinada entre estos (32,52).

La razón de que los FAME sean elegidos como primera opción en el tratamiento de la AR se debe a que poseen el potencial para reducir o prevenir el daño de las articulaciones; así como, preservar la integridad y funcionalidad de las articulaciones (47).

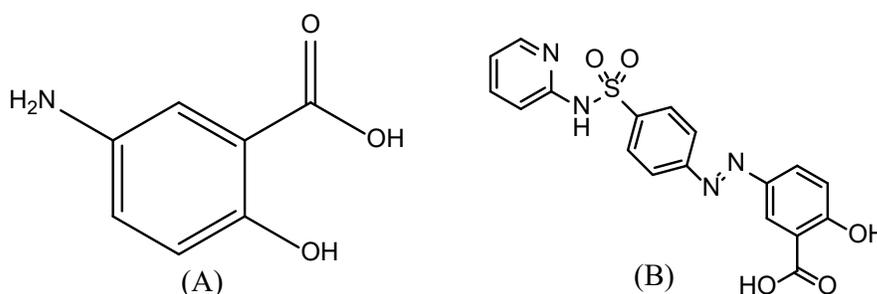
En general, la primera elección es la administración de MTX, SSZ, HQC, pero sí existe una respuesta inadecuada o ineficiente cuando se administra sólo FAME, el siguiente paso es iniciar con terapia biológica (Adalimumab, Certolizumab, Etanercept, Golimumab, Inflixima, Tocilizumab y Anakinra) (53)

Neogi, menciona que sólo en Estados Unidos entre 1996-2011, las condiciones relacionadas con AR representaron el mayor aumento en los gastos de atención de la salud en este país, de acuerdo con la Encuesta de Panel de Gastos Médicos. El costo directo total en dólares estadounidenses para artritis y dolor en las articulaciones en los

Estados Unidos fue de \$ 9,556 dólares entre 2009-2011; el total de costos directos agregados fue de \$ 580.9 mil millones de dólares. Estimaciones epidemiológicas pronostican que para el 2030 habrá 67 millones de personas con AR (54).

## 2.4 Antecedentes del Ácido 5-aminosalicílico

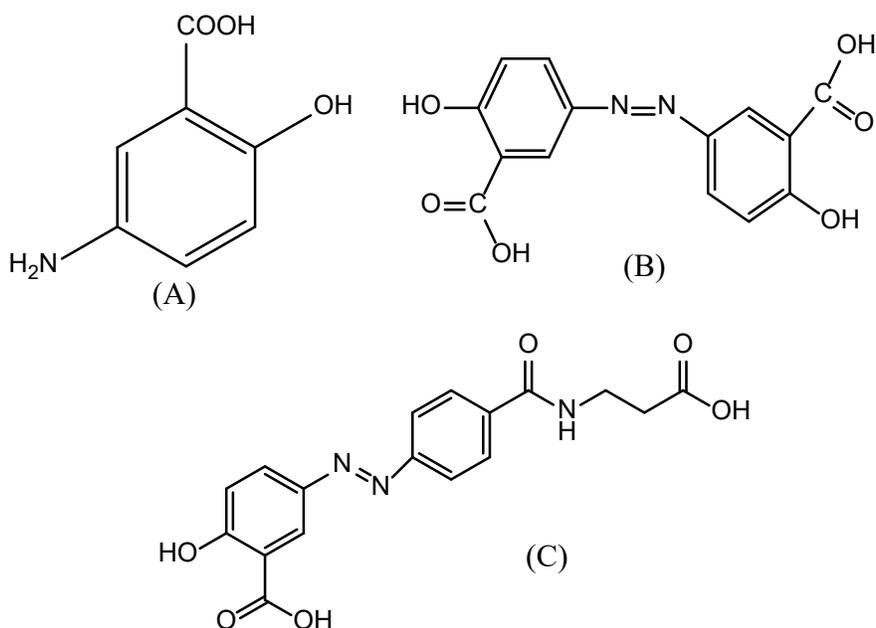
La unidad estructural, ácido 5-aminosalicílico (5-ASA, Figura 3A), es una molécula que fue desarrollada para el tratamiento de las enfermedades inflamatorias intestinales crónicas, el primer fármaco desarrollado a partir de esta molécula fue “Sulfasalazina” Figura 3B (55).



**Figura 3.** Estructuras químicas ácido 5-aminosalicílico (A) y Sulfasalazina (B).

Abdu-Allah et al. mencionan que el 5-ASA es el principio activo de numerosos agentes antimicrobianos, antitumorales, neuroprotectora; así como la ya mencionada actividad antiinflamatoria (56).

Existe una variedad de fármacos derivados del 5-ASA como la Sulfadiazina (5-aminosalicílico ligada a una aminopiridina), así como la Mesalazina, Olsalazina y Balzalizida (Figura 4), los cuales también son empleados en el tratamiento de enfermedades crónicas, como CU y enfermedad de Crohn's (56,57).



**Figura 4.** Estructuras químicas de Mesalazina (A), Olsalazina (B) y Balsalazida (C).

#### 2.4.1 Mecanismo de Acción

Esta descrito que el 5-ASA comparte algunas propiedades farmacológicas con los AINES; existen diversas propuestas en lo que respecta a su mecanismo de acción. Está sustancia afecta la producción de eicosanoides, citoquinas, unión al interferón; así como, afecta la permeabilidad celular o mediante la inhibición del TNF- $\alpha$  (57). Existe evidencia que el efecto del 5-ASA es a nivel del receptor activado por proliferador de peroxisomas (PPAR)- $\gamma$ . La activación de PPAR- $\gamma$  también tiene efectos anti-tumorigénicos que se manifiestan como actividades antiproliferativas (57,58).

Donde el receptor (PPAR)- $\gamma$  es una clase de receptor nuclear implicado en el control de la inflamación, la proliferación celular, la apoptosis y la función metabólica. Este receptor se expresa en altos niveles en las células epiteliales del colon, por lo que es muy probable que la actividad terapéutica de los fármacos derivados del 5-ASA, se deba a que está implicado en la modulación de este receptor (57,59).

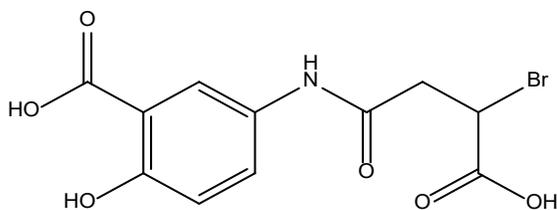
Los compuestos derivados del 5-ASA han sido reportados como inhibidores de la mieloperoxidasa (MPO), el cual se expresa en gránulos azurófilos (primarios) los cuales

funcionan como los lisosomas de los neutrófilos, estos neutrófilos junto con las células fagocitas constituyen la primera línea de defensa del sistema inmune (60).

Existe evidencia que los derivados oxidantes que se generan durante el ciclo catalítico de la MPO, especialmente durante el estrés oxidativo, están asociados con el inicio y la progresión de diversas enfermedades como desordenes cardiovasculares y neurodegenerativos, CU, cáncer y enfermedades de la piel (dermatitis) (61).

#### **2.4.2 Ácido Bromo-5-Aminosalicílico (Br-5-ASA) [Ácido (2E)-5-(3-bromo-3-carboxiacrilamida)-2-hidroxibenzoico]**

Es bien sabido la poca biodisponibilidad de la molécula 5-ASA. Por ello la búsqueda de nuevas moléculas derivadas de esta estructura es importante (57). Cabrera Pérez et al. llevaron a cabo la síntesis de 4 derivados del 5-ASA, entre estos está el Br-5-ASA (Figura 4) y evaluaron el efecto antiinflamatorio en un modelo tópico, induciendo el edema auricular con TPA en ratones machos CD-1 (n=6); así como la determinación de la actividad de peroxidación de MPO. Los resultados que obtuvieron mostraron que, de los 4 derivados sintetizados, el Br-5-ASA presentó el mejor efecto antiinflamatorio en este modelo, siendo muy similar al del fármaco de referencia (Ind) a una dosis de (0.46 mg/oreja). Se determinó la inhibición de la MPO de los derivados de 5-ASA y del fármaco de referencia (Ind), obteniendo las  $CI_{50}$  correspondientes. Los resultados mostraron que el Br-5-ASA presentó una  $CI_{50} = 301 \mu M$ , mientras que Ind presentó una  $CI_{50} = 122 \mu M$ . Los autores concluyeron respecto al derivado Br-5-ASA que, de los compuestos evaluados, fue el que mostró mejor efecto antiinflamatorio *in vivo* pero este efecto no es debido a que actuó como un inhibidor de la MPO, por lo que su mecanismo de acción se debe investigar. Así mismo, el Br-5-ASA fue evaluado en modelo murino donde a la dosis de 2 g/kg (vía i.g.) no mostró efectos adversos ni toxicidad (62).



**Figura 5.** Estructura química del derivado Br-5-ASA.

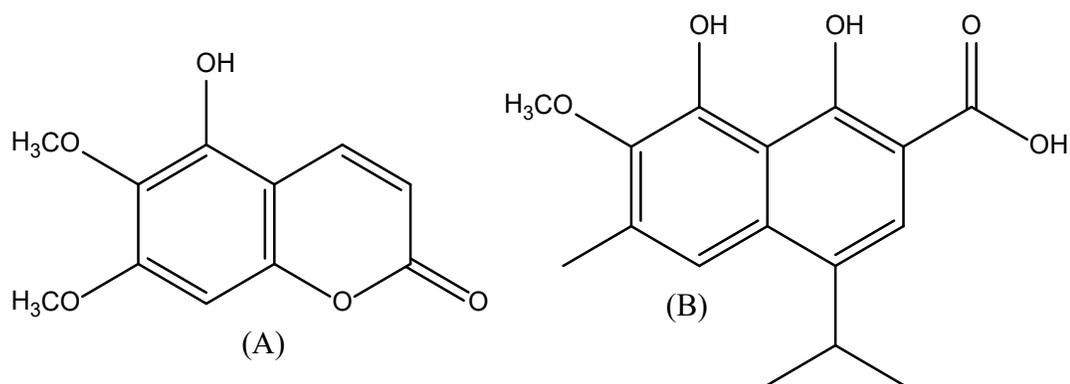
## 2.5 Compuestos puros obtenidos de plantas medicinales con actividad antiartrítica

A la fecha existen algunos compuestos puros obtenidos de plantas medicinales (PM) utilizadas para el tratamiento de padecimientos inflamatorios, en la medicina tradicional de México, dentro de estas sobresale *Sphaeralcea angustifolia* conocida comúnmente como “yerba del negro, vara de San José”, es una planta utilizada como un remedio antiinflamatorio y en el tratamiento de heridas (63).

Respecto a la actividad antiartrítica, García-Rodríguez et al. reportó la actividad antiinflamatoria del extracto  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  en dos modelos murino (uno de inflamación crónica al emplear Adyuvante de Freund Completo (AFC) y otro de inflamación aguda usando el modelo de edema auricular con TPA. Los resultados mostraron que este extracto (100 mg/kg) redujo considerablemente la inflamación crónica en el modelo de AFC, siendo del 60.2 % y sobre la inflamación aguda, el extracto de *Sphaeralcea angustifolia* (2 mg/Kg) redujo el edema auricular en un 50.6 % respecto a su vehículo (Acetona), a los 180 min de su aplicación. Al realizar el estudio químico biodirigido se detectaron las moléculas responsables de su actividad biológica, por análisis de cromatografía de masas acoplado a espectrometría de masas (CG-MS) se identificaron  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol, y mediante cromatografía de capa fina (CCF) preparativa se aisló la escopoletina, este último compuesto mostró importante actividad antiinflamatoria (63).

Además, por proceso biotecnológico se obtuvo el cultivo en suspensión de esta especie medicinal (*S. angustifolia*) y aislaron dos compuestos (tomentina y ácido esphaerálcico) (Figura 6), estas moléculas mostraron importante actividad antiinflamatoria en los modelos de inflamación sistémica y tópica. Los resultados mostraron que la tomentina y ácido esphaerálcico (45 mg/Kg) redujeron la formación del edema en el modelo de carragenina

en un 58 % y 66 % respectivamente, Ind (45 mg/kg) presentó actividad antiinflamatoria significativa en comparación con el grupo tratado solo con carragenina, sin embargo, no mostró diferencia significativa frente a los tratamientos probados. Y en el modelo tópico con TPA, la tomentatina (225 mM/oreja) mostró una inhibición de la formación del edema auricular en un 57 % y el ácido esphaerálcico (174 mM/oreja) inhibió en un 86%, de estos dos compuestos el más activo fue el ácido esphaerálcico al ser su efecto dependiente de la dosis, mostrando una  $DE_{50} = 93 \text{ mM}$  (64). Respecto a los fármacos de referencia (Ind y Naproxeno), los dos presentaron efecto antiinflamatorio muy similar en el modelo tópico.



**Figura 6.** Estructuras químicas de tomentina (A) y ácido esphaerálcico (B).

De igual manera del Pilar Nicasio-Torres et al. mencionan la importancia de esta especie en el tratamiento de procesos inflamatorios y describe que está en peligro de extinción según el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de México, por lo que el uso de la biotecnología como una herramienta para la producción de compuestos con potencial biológico es una buena alternativa. De la biomasa obtenida mediante proceso biotecnológico a partir de material vegetal se preparó el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y este extracto fue sometido a evaluación de la actividad antiinflamatoria sistémica (inducción del edema subplantar con carragenina), donde el extracto orgánico de la biomasa obtenida mostró un efecto inhibitorio del 39 % a la 3<sup>ra</sup> hora, y una  $DE_{50} = 137 \text{ mg/Kg}$ , mientras que la Ind (fármaco de referencia) presentó un 27 y 60 % de inhibición a la 1<sup>ra</sup> y la 5<sup>ta</sup> hora respectivamente (65).

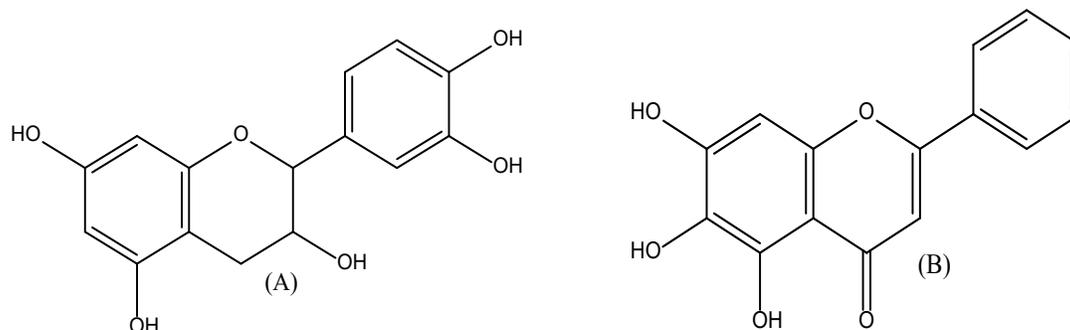
Otra planta medicinal es *Xanthium strumarium* L., la cual es utilizada ampliamente en China, Europa y América, se ha reportado que es utilizado en el tratamiento de la bronquitis crónica, rinitis crónica y AR. Se llevó a cabo un estudio donde evaluaron el

extracto EtOH al 70 % en un modelo de inflamación crónica inducida con AFC, calcularon el % de inhibición del edema subplantar, el peso corporal y los mediadores proinflamatorios. Así mismo, determinaron mediante un análisis cualitativo por HPLC los principales compuestos presentes en el extracto, siendo el ácido 1,5-O-cafeoilquínico y ácido clorogénico los mayoritarios. Los resultados mostraron una reducción significativa del edema subplantar en comparación con el grupo control, también favoreció la ganancia de peso en los roedores y respecto a la evaluación de los mediadores proinflamatorios, se observó la supresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y un aumento de IL-10 (66).

Referente al estudio de PM con actividad antiartrítica, Alamgeer et al. realizó la evaluación de un extracto H<sub>2</sub>O:EtOH (30:70) de *Berberia orthobotrys* ex Aitch y sus respectivas fracciones (n-butanol, acetato de etilo -AcOEt-, H<sub>2</sub>O) en diferentes modelos. Mediante estudios fitoquímicos, se reportó la presencia de diferentes metabolitos como aporfina-benzillisoquinolina, alcaloides como berberina, berbamina, oxiacantina, pakistamina, pakistanamina, kalashina y citralina (47). La berberina se reporta que es un inhibidor de la inflamación crónica en un modelo de diabetes mellitus en murinos, donde la resistencia a insulina fue inducida con estreptomicina y dieta alta en grasas (67). Respecto a los resultados de la evaluación antiartrítica, en el modelo de inhibición de desnaturalización de proteínas utilizando seroalbúmina bovina (BSA), el extracto crudo (H<sub>2</sub>O:EtOH de *B. orthobotrys*) mostró un 92.81 % de inhibición a la máxima concentración evaluada (800  $\mu$ g/mL), al ser comparada con su fármaco de referencia (Aspirina), el cual mostró un 97.55 % de inhibición a la misma dosis. La fracción de n-butanol mostró la mejor eficacia de todas las fracciones con un % de inhibición muy similar al extracto de la planta. En el modelo de inflamación crónica *in vivo* ocupando AFC, se realizó la evaluación del extracto crudo, las fracciones de n-butanol y AcOEt a una dosis de 150 mg/Kg, las cuales mostraron un 80.98, 78.24 y 76.60 % de inhibición del edema subplantar, respectivamente, mostrando su potente actividad antiartrítica en los modelos evaluados (47).

En este sentido podemos mencionar que en la literatura se describen algunos productos con actividad antiinflamatoria obtenidos de extractos de PM con una composición definida, estandarizada y con una regulación establecida, denominados "fitofármacos" (68). Por ejemplo, tenemos el Flavocoxid (US patent number 7,514,469) que es un fitofármaco con

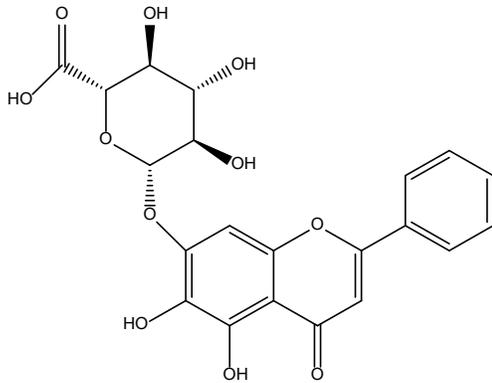
90 % de pureza que contiene dos flavonoides naturales, baicaleína y catequina (Figura.7) aislados de *Scutellaria baicalensis* y *Acacia catechu*, este fitofármaco actúa mediante la inhibición de COX-2 y de la 5-LOX (69,70).



**Figura 7.** Estructuras químicas catequina (A) y baicaleína (B).

Se ha demostrado que la catequina tiene la capacidad de reducir la inflamación y atenuar la producción de citoquinas proinflamatorias, como la IL-1 y el TNF- $\alpha$  en un modelo animal de AR. Este polifenol también fue evaluado en un modelo crónico de osteoartritis donde fue administrada durante 8 semanas (25 mg/kg vía i.p.) en ratones C57BL/6; los resultados mostraron que el tratamiento mostro una disminución en la erosión del cartílago, ligado a una disminución de citocinas proinflamatorias como IL-1 o TN- $\alpha$ , en comparación con el grupo control. Sin embargo, otros autores mencionan que su actividad antiinflamatoria se puede llevar a cabo mediante la inhibición de migración de la inflamación (gota), modulando la activación del inflamasona NLRP3 (71–73) .

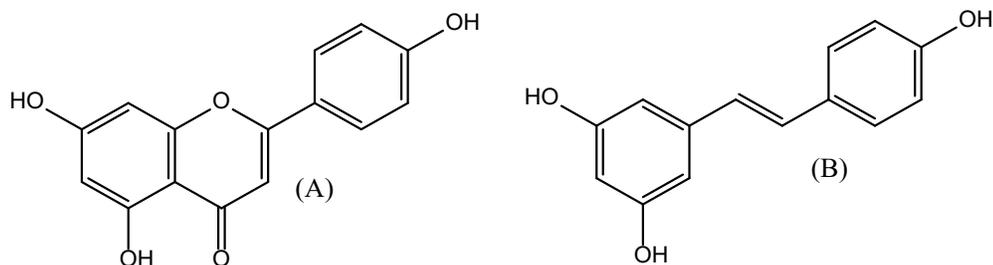
La baicaleína tiene la capacidad de regular la vía NF- $\kappa$ B encargada de la expresión de moléculas inflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , y actividad enzimática de COX-2 disminuyendo la producción de eicosanoides proinflamatorios y atenuando el edema en un modelo de inflamación *in vivo*. Por otro lado, la baicalina (análogo químico de baicaleína) posee un mecanismo similar mediante la supresión de la proteína p65 de NF- $\kappa$ B e inhibición de citoquinas proinflamatorias (Figura 8), en un modelo artritis inducido con colágeno (ratas Wistar hembras) donde se administró a 3 dosis (50, 100 y 200 mg/kg). Los resultados mostraron que la baicalina (200 mg/kg) presentó el mejor efecto antiartrítico y mostró una reducción en el daño articular, en comparación con el vehículo (ácido acético 0.05 M) y similar al control positivo (MTX, 1 mg/kg) (74,75)



**Figura 8.** Estructura química baicalina.

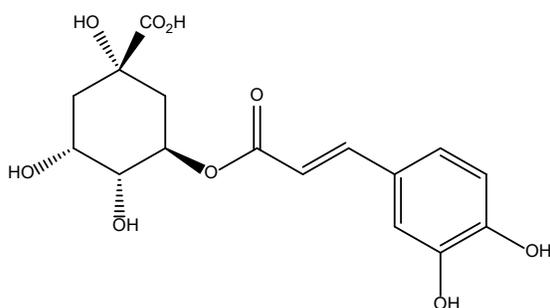
Sin embargo, existen otros compuestos aislado de origen natural que poseen actividad antiartrítica demostrada en modelos animales o cultivos celulares, algunos ejemplos son apigenina (Figura 9A), en un estudio realizado donde se evaluó a diferentes dosis (20 y 40 mg/kg) en un modelo de AFC, este compuesto natural tiene la capacidad de inhibir la proteína P2X7, la cual ha sido reportada con diversas funciones dentro del sistema inmune y en diversas enfermedades inflamatoria crónicas a través de la vía NF-kB (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas). Los resultados mostraron que la apigenina no solo tiene la capacidad de regular la expresión de esta proteína, sí no también mostro una reducción significativa del daño articular provocado por el AFC en comparación con el control y el fármaco de referencia (Diclofenaco sódico 5 mg/kg) (76,77).

El resveratrol (Figura 8B) presento actividad antiartrítica en un modelo *ex vivo*, donde se evaluó este compuesto solo y en combinación con MTX y Adalimumab en cultivos de células mononucleares del líquido sinovial de pacientes con AR (n=7) y espondiloartritis (n=7). Los resultados mostraron que el resveratrol disminuyo de manera significativa la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) tanto en las dos líneas celulares probadas. Por otro lado, la combinación de resveratrol y MTX mostró mejor efecto sobre la MCP-1 en el modelo *ex vivo* (78).



**Figura 9.** Estructuras químicas apigenina (A) y resveratrol (B).

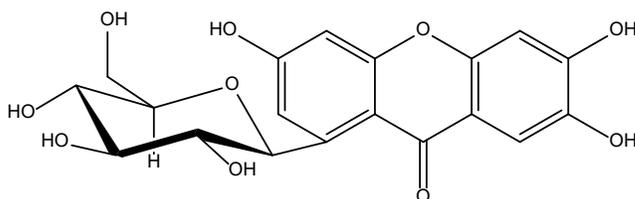
Otro flavonoide el cual ha sido reportado con diversas actividades (antioxidante, antibacteriana) y sobre todo la actividad antiinflamatoria es el ácido clorogénico (Figura 10). En un estudio donde se llevó a cabo la evaluación del efecto hepatoprotector en ratas Wistar pretratadas con ácido clorogénico (50 y 100 mg/kg) frente a MTX (20 mg/kg), se determinó que el ácido clorogénico no solo reduce la actividad de las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GPx) significativamente en comparación con el grupo tratado solo con MTX, si no llevo a cabo una reducción del proceso inflamatorio en el hígado generado por el MTX, mediante la inhibición de COX-2, iNOS, Caspasa 3 y 9. Los autores concluyeron que este flavonoide no solo tiene la capacidad de reducir el daño causado por MTX en hígado sino también de al mismo tiempo de reducir la inflamación en hígado (79).



**Figura 10.** Estructura química del ácido clorogénico.

Otro fitofármaco que ha demostrado actividad antiartrítica es Vimang®, este es un extracto acuoso obtenido de *Mangifera indica* L., el cual contiene una mezcla de metabolitos secundarios (polifenoles, triterpenos, fitoesteroles, ácidos grasos). De manera específica la composición química del extracto contiene ácidos polifenólicos (ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxi-benzoico), ésteres fenólicos (éster metílico del ácido gálico, éster propílico del ácido gálico, éster propílico del ácido benzoico), flavanoles (catequina y epicatequina) y

en mayor concentración (16%) una xantona denominada “mangiferina” (Figura 11), entre otros (80). Así mismo, se han reportado diversas actividades biológicas de *Mangifera indica* como antioxidante, antiinflamatoria, inmunomoduladora, quimioprotectora, antidiabética y analgésica (81,82).



**Figura 11.** Estructura química de la mangiferina.

Luczkiewicz et al. mencionan que Vimang inhibe la activación de diversos marcadores implicados en un proceso inflamatorio (como COX-2), metástasis (receptor de quimiocinas tipo 4), angiogénesis (VEGF, Factor de crecimiento endotelial vascular) y la vía de señalización NF- $\kappa$ B, implicada en la inflamación (80).

En otro estudio llevaron a cabo la evaluación de Vimang sobre los factores de riesgo de arterosclerosis en un modelo de hipercolesterolemia en ratones. Los resultados mostraron que los animales tratados con el fitofármaco a una dosis de 250 mg/kg presentaron niveles reducidos de colesterol plasmático y en hígado en un 15 y 20% respectivamente, así como un aumento de la capacidad antioxidante total plasmática (10%) y disminución de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (82).

Mantecón et al., llevo a cabo la evaluación de Vimang (300 mg/tableta) mezclado con MTX (2.5 mg/tableta) en un estudio clínico en pacientes (n=20) con AR para evaluar la reducción de la enfermedad después de 180 días de tratamiento y compararlo con la terapia convencional, la cual consistía en MTX (12.5 mg/semana) y AINE o prednisona (5 o 10 mg/día). La actividad antiartrítica fue monitoreada mediante la actividad de la enfermedad a 28 días (empleando la escala DAS 28) y el cuestionario de evaluación de salud (HAQ). Los resultados fueron expresados en término del criterio del ACR.

Los resultados mostraron que los pacientes tratados con la combinación de Vimang y MTX presentaron mejoría estadísticamente significativa en los parámetros DAS 28 y respecto a los criterios de ACR, el grupo MTX-Vimang presentó una mejoría del 80% a los 90 días. En el grupo MTX-Vimang, el 100% de los pacientes redujo la administración de AINE y el 70% de los pacientes no presentaron efectos gastrointestinales secundarios (81).

En relación a estudios clínicos realizados sobre el uso de PM en pacientes con AR es muy escaso. Rambod et al. llevó a cabo un estudio en adultos con AR (n=500) y en adultos sanos (n=500); con el objetivo de conocer el porcentaje de personas que utilizan PM para el tratamiento de este padecimiento. Los resultados mostraron que el 51.4 % de los sujetos con AR utilizan PM, mientras que el 36.4% del grupo sano también las utiliza. Así mismo, evaluaron otras variables dentro de este estudio, en el cual destacan que personas con un mayor grado de estudio ocupan en mayor proporción las PM que el resto de los pacientes, y los pacientes adultos (hombres) utilizan con mayor frecuencia la PM para el tratamiento de AR que las mujeres, todas las comparaciones entre los grupos y variables mencionados presentaron una diferencia significativa. También, encontraron que las PM más utilizadas para el tratamiento de AR son tomillo (43.4%), manzanilla (36.9%), borraja (36.8%), lavanda (31.2%), jengibre (28.5%) y canela (21.5%). Los autores concluyen que más de la mitad de los pacientes con AR emplean diversas PM para el tratamiento de la enfermedad, las cuales muestran eficacia y seguridad en su uso (83).

## **2.6 Lupeol y sus derivados**

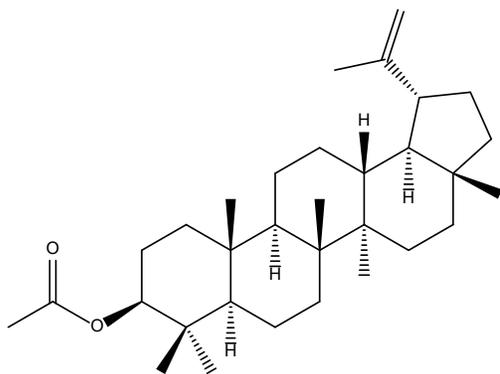
Existen principios activos de estructuras químicas variadas aislados de plantas, que poseen importante actividad biológica, entre ellas antiinflamatorias. Un grupo de compuestos aislados de plantas con actividad antiinflamatoria son los triterpenos, los cuales son muy similares a los esteroides (84).

En los últimos años, los triterpenos de origen natural han sido investigados debido a que no solo presentan actividad antiinflamatoria, sino también antitumoral. A la fecha, existen más de 100 esqueletos distintos, siendo los esqueletos del olaneano, ursano y lupano los más importantes dentro de los triterpenos, generando una diversidad estructural. A la

fecha se describe que existen entre 40,000 y 60,000 compuestos, los cuales tiene diversas actividades biológicas (antimicrobiana, antiinflamatorios y analgésica entre muchas otras), por otro lado, se han aislado más de 100 triterpenos de origen natural como prometedores agentes antineoplásicos (85,86).

Entre las diversas actividades biológicas de triterpenos como el lupeol destacan la antiprotozoaria, antiinflamatoria, antitumoral, cardioprotectora, hepatoprotectora y antimicrobiana (87).

El acetato de lupeol (AL) es un derivado de este triterpeno, el cual ha sido aislado de la nuez de karite (*Vitellaria paradoxa*), mango (*Mangifera indica*) o pimiento verde (*Capsicum annuum*), *Cnidocolus tehuacanensis* y *Euphorbia geniculata* y se ha descrito que tiene actividad antiinflamatoria en diversos modelos: tópico (inducción del edema con TPA) y sistémico (inducción del edema con carragenina), antioxidante, anticancerígeno e inmunomodulador (88–90) (Figura 12).



**Figura 12.** Estructura química del AL.

Kweifio-Okai & Carroll evaluaron la actividad antiartrítica del AL en un modelo murino, donde inocularon ratas con AFC y midieron el diámetro del edema formado en los días 11, 32 y 60; el AL fue administrado vía i.p. a dosis de 66 mg/kg a partir del día 32 hasta el día 40. Tanto en las ratas artríticas tratadas como en las no tratadas, los diámetros de tobillo y pata contralaterales permanecieron sin cambios hasta el día 60; por lo que el grupo tratado con AL (n=5) no mostró efecto antiinflamatorio alguno durante y después de la administración de este compuesto (91).

Otra investigación del AL (aislado de *Himatanthus drasticus* mediante cromatografía en columna, del cual se determinó la estructura mediante RMN  $^{13}\text{C}$ ), sobre la actividad antiinflamatoria en tres modelos diferentes (formalina, carragenina y dextran) en ratones machos suizos. Los resultados mostraron que, en el modelo de formalina, el AL (50 mg/kg) redujo la inflamación del edema en un 61 %, mientras que el fármaco de referencia (morfina) presentó 91 % de inhibición de la inflamación. En el modelo de inflamación con carragenina, el AL en dosis de 10 y 20 mg/kg presentaron la mejor reducción del edema durante las primeras 4 horas en las que se llevó a cabo la evaluación, destacando que los mayores % de inhibición del edema se presentaron a la 4ª hora con 51 y 49 % de inhibición, respectivamente, en comparación con el grupo de animales tratados solamente con vehículo (Tween 80). Por último, en el modelo de inducción de edema con dextran, el grupo pretratado con AL (12.5 y 25 mg/kg) i.p. presentó el efecto máximo a la 3ª hora con un 30 y 50 % de inhibición de inflamación respectivamente, efecto muy similar al del fármaco de referencia (Dexametasona) (92).

Respecto a la actividad antiinflamatoria en el modelo de carragenina, otra investigación evaluó el AL aislado de una fracción hexánica de *Balanophora spicata*, los resultados mostraron que los animales pretratados con AL (100 mg/kg) administrado por vía i.p. presentaron mayor efecto antiinflamatorio respecto al grupo de Ind (4 mg/kg) entre la primera y la quinta hora. El AL de igual manera se evaluó en un modelo de inflamación tópica con TPA, determinando la  $\text{DI}_{50} = 0.54 \mu\text{mol/oreja}$  (93).

Otro estudio realizado por Zambrano-Vásquez et al., donde evaluaron la actividad antiinflamatoria aguda tópica y sistémica del extracto  $\text{CHCl}_3\text{:EtOH}$  de *C. tehuacanensis* y de las fracciones primarias obtenidas a partir de este extracto por CC-FN. En este trabajo se encontró que la fracción 33-43 (rica en AL, con un contenido del 90.4%) mostró importante efecto antiinflamatorio por vía tópica (inducido con TPA), el cual inhibió en un 57.28% a la dosis de 2 mg/oreja, actividad similar al fármaco de referencia Ind (55.6%) evaluada a la misma dosis. La evaluación de la fracción rica en AL (33-43) fue evaluada a una dosis 150 mg/kg observándose que el efecto antiinflamatorio máximo fue de 41.86%. En este caso encontraron que la fracción rica en AL resultó más activa que el extracto (90).

El AL también ha sido evaluado (*in vitro*) en una línea de macrófagos RAW264.7, para el tratamiento y prevención de la osteoartritis solo y en combinación con curcumina. El AL se evaluó a la dosis de 10, 20, 40, 80  $\mu\text{M}$ ), la curcumina (2.5, 5, 7.5, 10  $\mu\text{M}$ ) y una combinación de ambas: curcumina (10  $\mu\text{M}$ ) + AL (10  $\mu\text{M}$ ), curcumina (10  $\mu\text{M}$ ) + AL (20  $\mu\text{M}$ ), curcumina (10  $\mu\text{M}$ ) + AL (40  $\mu\text{M}$ ) y curcumina (10  $\mu\text{M}$ ) + AL (80  $\mu\text{M}$ ) y determinaron viabilidad celular, supresión de mediadores proinflamatorios y la inhibición de formación de osteoclastos. Los resultados mostraron que los tratamientos no presentaron citotoxicidad en la línea celular RAW264.7; respecto a la supresión de mediadores inflamatorios, la combinación de curcumina (10  $\mu\text{M}$ ) + AL (10  $\mu\text{M}$ ) inhibió los niveles de TNF- $\alpha$  mejor que AL a la dosis más alta (80  $\mu\text{M}$ ); además observaron que la combinación con mejor efecto sinérgico frente a todas las citocinas fue curcumina (10  $\mu\text{M}$ ) + AL (40  $\mu\text{M}$ ) y observaron que todas las combinaciones de curcumina y AL evitaron la formación y maduración de osteoclastos mediante la modulación de la actividad de NF- $\kappa\text{B}$ . Mostrando que el AL solo o en combinación, puede ser un excelente agente frente enfermedades inflamatorias crónicas (88)

### **3 JUSTIFICACIÓN**

Datos epidemiológicos muestran que en México la AR afecta al 1.6 % de la población; además es la primera causa de consultas en servicios de reumatología. La enfermedad al ser crónico degenerativo reduce la productividad laboral del afectado, los tratamientos son prolongados y de elevado costo e inducen severos efectos secundarios.

Al respecto, se ha descrito que tan sólo en Estados Unidos entre 1996-2011, la AR y sus complicaciones representaron el mayor aumento en los gastos de atención de la salud en este país, de acuerdo con la Encuesta de Panel de Gastos Médicos. El costo directo total por persona en 2011 fue \$ 9,556 dólares/año durante el periodo 2009-2011 y el costo directo total fue de \$ 580.9 mil millones de dólares. Estimaciones epidemiológicas pronostican que para el 2030 habrá 67 millones de personas con AR.

Por lo que es necesario y urgente contribuir en la búsqueda de nuevas alternativas, ya sean de origen natural o derivados de síntesis química, con el objetivo de mejorar de la calidad de vida del paciente, que sean de menor costo y con menos efectos secundarios que los existentes.

## 4 HIPÓTESIS

Los compuestos Acetato de lupeol y Br-5-ASA poseen actividad *in vivo* en procesos inflamatorios crónicos evaluados en un modelo murino.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 General

Evaluar la actividad *in vivo* del acetato de lupeol y del derivado Br-5-ASA en procesos inflamatorios de tipo agudo y crónico.

### 5.2 Específicos

1. Obtención del Acetato de Lupeol a partir de un extracto orgánico CHCl<sub>3</sub>:EtOH (1:1) de *Cnidoscolus tehuacanensis* mediante fraccionamiento químico y por proceso de recristalización.
2. Obtención del derivado de Br-5-ASA mediante síntesis química.
3. Determinar la DE<sub>50</sub> del AL y del derivado Br-5-ASA a partir de ensayos *in vivo* de edema auricular inducido con TPA y agudo sistémico en un ensayo *in vivo* de edema subplantar inducido con Carragenina.
4. Evaluar el efecto antiinflamatorio crónico y antioxidante *in vivo* del AL y y Br-5-ASA en un ensayo inducido con Adyuvante de Freud Completo
5. Determinar la concentración COX-2 y de linfocitos (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>) presentes en los animales tratados con AL y Br-5-ASA.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Procedimientos generales

El punto de fusión fue determinado utilizando un aparato Fisher-Jhons, la cromatografía en columna de fase normal (CC-FN) se llevó a cabo en gel de sílice 60 (malla 70-230; Merck, Darmstadt, Alemania). Los análisis de cromatografía de capa fina (CCF) se realizaron en placas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> con base de aluminio (Merck) y las manchas se visualizaron con una solución al 10% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> acuoso seguido de calentamiento a 100 ° C para identificar triterpenoides y como fase móvil se emplearon disolventes con grado creciente de polaridad Hexano (Hex), Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>), Acetato de etilo (AcOEt), Metanol (MeOH) y Etanol (EtOH) grado analítico (J.T. Baker) destilados previamente. El análisis de las fracciones ricas en AL se realizó por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS) en un cromatógrafo de gases marca Agilent 6890 N (GC) y en un Espectrómetro de Masas marca AGILENT modelo 5975 C. La columna utilizada fue AGILENT 19091S-433E DB-5MS, FN, de 30 m X 0.25 mm de diámetro interno y partícula de 25 micras y como gas acarreador He, 9.59 psi. Utilizando las siguientes condiciones para la detección de triterpenos: temperatura del inyector: 250 °C; modo de inyección: Split; radio: 80:1; flujo del Split: 79.4 mL/min; flujo de corrida: 37 cm/seg; volumen de inyección: 2µL. La temperatura inicial del horno fue de 70 °C con rampa de calentamiento de 20 °C/min hasta 230 °C, la segunda rampa fue de 8 °C/min hasta 280 °C esto se mantuvo por 5 min y el tiempo de corrida total fue de 21.25 min.

Los reactivos empleados para la síntesis del derivado Br-5-ASA fueron ácido 5-aminosalícilo (Sigma), anhídrido bromo maleico (Sigma), y los solventes empleados durante la reacción fueron AcOEt, Hex y MeOH grado analítico (J.T. Baker). Los análisis de RMN <sup>1</sup>H del Br-5-ASA se realizaron con un espectrómetro de resonancia magnética nuclear 300 MHz (Varian Mercury Vx).

Para los ensayos de actividad antiinflamatoria se empleó el 13-acetato de 12-orto-tetradecanoilforbol (TPA, Sigma), Carragenina λ (Sigma), Adyuvante de Freund Completo

(DIFCO), Ind (Sigma) y Fenilbutazona (Sigma), el vehículo utilizado fue Tween 80 (Sigma) o acetona J.T. Baker) y la medición del edema subplantar se realizó con un micrómetro digital (Mitutoyo, APB-2D)

## **6.2 Obtención del AL**

Esto se realizó mediante el fraccionamiento primario de extracto hexánico de *Cnidocolus tehuacanensis* por cromatografía en columna fase normal (CC-FN) empleando como soporte 200 g de silica gel y como sistemas de elución mezclas de disolventes con grado decreciente de polaridad. En la columna se sembraron 20 g de extracto, durante este proceso se recolectaron 126 fracciones de 500 mL, cada fracción se concentró y reunió según el perfil cromatográfico mostrado en CCF, con la finalidad de obtener el compuesto de interés. De la fracción primaria 40-58 se realizó una siguiente CCF-FN, en donde se sembraron 1.4 g de muestra, la columna se eluyó con Hexano [100%] y mediante este proceso se obtuvo el compuesto de interés (AL) en forma de polvo blanco con p.f. = 208-210 °C.

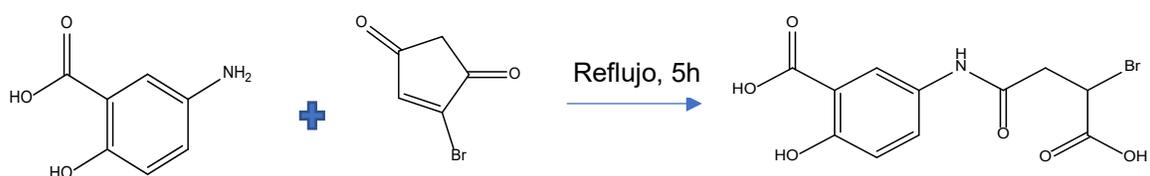
Todas las fracciones con menor grado de pureza, fueron reunidas mediante su comparación por CCF, y sometidas a diversos fraccionamientos por CC-FN para enriquecer el AL, el cual fue utilizado en los ensayos biológicos, las fracciones con mayor abundancia en AL fueron separadas y analizadas posteriormente.

La detección del compuesto de interés (AL) se realizó por CG-EM y la identificación química de este compuesto se realizó por comparación de su espectro de masas con el descrito por el National Institute of Standards and Technology Library (NIST 8.0) y comparación de sus datos de resonancia magnética nuclear (RMN) previamente reportado y/o Rayos X y por comparación de  $R_f$  de fracciones ricas en AL por CCF comparativas.

## **6.3 Síntesis del derivado Br-5-ASA**

La síntesis química se llevó a cabo de acuerdo a lo reportado previamente por Cabrera Pérez et al., (62) con algunas modificaciones. Se colocarán en un matraz bola de 250 mL

cantidades equimolares de 5-ASA (6.2 mmol/1.0 g) y anhídrido bromo maleico (6.2 mmol/0.6 mL), se adicionaron 80 mL de AcOEt y la mezcla de reacción se mantuvo en agitación a reflujo durante 5 h (Figura. 13). Pasado el tiempo de reacción, se obtuvo un sólido de color blanco que se filtró al vacío. El sólido se colocó en un vaso de precipitados de 25 mL y fue resuspendido en 10 mL de etanol frío y se mantuvo en agitación constante durante 3 min a temperatura ambiente. Se filtro nuevamente al vacío y se lavó con 10 mL de etanol frío. El sólido obtenido se dejó secar en estufa a 100 °C durante 1 h



**Figura 13.** Síntesis del derivado de Br-5-ASA.

La caracterización y purificación del derivado de Br-5-ASA se llevó a cabo mediante análisis por CCF, mediante la comparación de su ( $R_f$ ), así como por comparación de sus datos de RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) reportados por Cabrera et al., (62).

#### 6.4 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

Para los ensayos biológicos, se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c con un peso de  $25 \pm 2$  g, los cuales fueron suministrados por el bioterio del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CNM SXXI) del IMSS. Los animales se mantuvieron en cajas de acrílico, bajo condiciones normales de humedad, con periodos de luz-oscuridad 12/12 h, con alimentación y consumo de agua *ad libitum*. Cabe señalar que los procedimientos utilizados para el manejo de los animales de experimentación fueron realizados conforme a la NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción y uso de animales de laboratorio) revisado en 2005. El presente protocolo fue aprobado por el comité local de investigación científica del Hospital de Especialidades del CMN SXXI IMSS con número de registro R-2018-3601-056.

Los animales fueron anestesiados con xilacina (5 mg/kg) y se sacrificaron por dislocación cervical y los cadáveres fueron incinerados en el bioterio del CMN Siglo XXI, IMSS.

Todas las determinaciones *in vivo* se realizaron por duplicado en ensayos independientes, bajo las mismas condiciones, para poder observar reproducibilidad de los posibles efectos farmacológicos.

#### **6.4.1 Modelo de inflamación tópica (TPA)**

Este ensayo se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Domínguez-Ortiz et al. y García-Rodríguez et al. (94,95) y se emplearon grupos de 5 ratones machos (n = 5). Los grupos controles fueron administrados de forma tópica con 2.5 µg de TPA disueltos en 25 µL de acetona en la oreja derecha (Ws), y en la oreja izquierda se aplicaron 25 µL de acetona (Wo). Los grupos tratados recibieron una primera aplicación tópica de TPA en la oreja derecha (W's) al igual que los controles, y transcurridos 30 minutos, se aplicaron 50 µL de los compuestos a evaluar AL o Br-5-ASA (0.5, 1 y 2 mg/oreja de cada compuesto) o Ind (0.5, 1 y 2 mg/oreja). Los ratones se sacrificaron por dislocación cervical en la sexta hora posterior a la aplicación del TPA, y se obtuvieron secciones de 6 mm del tejido auricular, para ser pesadas. La actividad antiinflamatoria local se calculó con base a la diferencia de los pesos entre los tejidos auriculares comparados con el grupo control de TPA, con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ \frac{(W_s - W_o)_{\text{Control}} - (W's - Wó)_{\text{Tratado}}}{(W_s - W_o)_{\text{Control}}} \right] \times 100$$

#### **6.4.2 Modelo de inflamación sistémica (carragenina)**

Se realizó una inyección vía subcutánea (s.c.) de 20 µL con carragenina disuelta en solución salina inyectable (SSI) en el cojinete subplantar de ratones machos. Los grupos tratados (n= 5), fueron administrados vía intragástrica (i.g.) con Ind (10 mg/kg) y los compuestos AL o Br 5-ASA fueron administrados a la dosis de 20, 50, 100, 150 y 250 mg/kg, una hora antes de la inoculación del agente irritante, siguiendo la metodología descrita por Domínguez-Ortiz et al. y García-Rodríguez et al. (94,95). Las muestras problema se solubilizaron en el vehículo Tween 80: agua (1:9), y el grupo control de

carragenina recibió sólo el vehículo por vía i.g. El porcentaje de inhibición se calculó comparando las mediciones del edema subplantar en los distintos tiempos (1, 3, 5 y 7 h) (Et), con respecto de la medición basal al tiempo cero antes de inocular la carragenina (Eo). Los resultados fueron analizados con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = \left[ \frac{(\text{Et} - \text{Eo})_{\text{Control carragenina}} - (\text{Et} - \text{Eo})_{\text{Grupos tratados}}}{(\text{Et} - \text{Eo})_{\text{Control carragenina}}} \right] \times 100$$

#### **6.4.3 Determinación de la dosis efectiva media (DE<sub>50</sub>)**

La dosis efectiva media fue calculada mediante el análisis de los datos obtenidos a partir de porcentaje de inhibición del edema tanto de TPA como de carragenina (y), contra el logaritmo de cada dosis (x), de acuerdo con lo descrito por Perazzo et al. (96). Este método se utilizó con la finalidad de evaluar la efectividad de AL y Br 5-ASA en relación con la inhibición del proceso inflamatorio al compararlo con el grupo control y la Ind, un fármaco AINES usado como control positivo, cuya DE<sub>50</sub> se calculó para ambos ensayos de inflamación aguda.

#### **6.4.4 Modelo de inflamación crónica (AFC)**

Con el fin de determinar el efecto de AL y de Br 5-ASA en el modelo de inflamación crónica, se utilizó el ensayo de monoartritis inducida con AFC. La dosis de los compuestos fue la DE<sub>50</sub> determinada en el modelo de carragenina (inflamación sistémica) siendo de 125 mg/kg para ambos compuestos, los cuales fueron solubilizadas en Tween 80:H<sub>2</sub>O (1:9). El ensayo de inflamación crónica se llevó a cabo de acuerdo con la metodología descrita por Rasool et al., (97) y Gutiérrez-Rebolledo et al., (98) en el cual los animales fueron seleccionados de forma aleatoria y se formaron 5 grupos de 10 ratones Balb/C machos con el siguiente esquema de tratamiento:

Grupo I: Control de animales sanos que recibieron sólo vehículos

Grupo II: Testigo con AR, dos inoculaciones de AFC (20 µL) los días 0 y 14 del estudio.

Grupo III: Fenilbutazona 100 mg/kg, con dos inoculaciones de AFC (20 µL, día 0 y 14)

Grupo IV: Acetato de lupeol (125 mg/kg), con dos inoculaciones de AFC (20 µL, día 0 y 14)

Grupo V: Br-5-ASA (125 mg/kg), con dos inoculaciones de AFC (20 µL, día 0 y 14)

Los animales del grupo I no recibieron ninguna inoculación subplantar y solo recibieron el vehículo por vía i.g durante 28 días. Los grupos II, III, IV y V recibieron dos inyecciones de 20 µL de AFC sin emulsificar en los días 0 y 14 del estudio de forma s.c. en la base plantar de la pata izquierda. La primera inoculación subplantar del AFC fue tomada como el día 0 del estudio.

Los tratamientos fueron administrados por vía i.g. a partir del día 7 posterior a la administración AFC, hasta el día 27 del estudio. Los tratamientos fueron administrados en un volumen no mayor a 10 mL/kg peso corporal.

#### **6.4.4.1 Medición del edema plantar y peso corporal**

El desarrollo del edema subplantar se registró en los días 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23, 25,27 y 28 del estudio, reportándose como aumento del diámetro del edema en milímetros con respecto del día cero (basal), y su porcentaje de inhibición con respecto del testigo positivo (AFC sin tratamiento) a partir del día 7 al 28. El registro del incremento del peso corporal se registró los mismos días que las mediciones.

$$\% \text{ Inhibición del edema} = \left[ \frac{(Ct - Co)\text{Tratamientos}}{(Ct - Co)\text{Testigo AFC}} \times 100 \right] - 100$$

En donde:

Co= Diferencia del tamaño del edema subplantar a tiempo cero (antes de la primera inoculación del AFC) de cada grupo

Ct= Diferencia del tamaño del edema subplantar a cualquier tiempo posterior a la primera inoculación del AFC (día 1,3,5,7,9,11,13,15,17,19,21,23,25,27 y 28) de cada grupo

La ganancia de peso se calculó entre las diferencias de las medidas con respecto al día cero (medición basal)(98).

#### **6.4.4.2 Cuantificación de linfocitos CD4<sup>+</sup>**

Transcurrido el tiempo de tratamiento (28 días), se obtuvieron los ganglios poplíteos de las patas traseras de cada grupo [ratones sanos, tratados con AFC, control positivo (PBZ 100 mg/kg) y los tratamientos (AL y Br-5-ASA 125 mg/kg)] y fueron lavados con SSI y colocados en medio RPMI con suero fetal bovino 10%, las células libres y filtradas fueron aislados para la tinción extracelular (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>). Se utilizaron los siguientes anticuerpos clon anti-CD3, anti-CD4 y anti-CD8. Las muestras se midieron en un citómetro de flujo MACS Quant analizador (Miltenyi Biotec); los resultados se analizaron con el software estadístico FlowJo versión 10 y los parámetros calculados fueron relación de linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.(98).

#### **6.4.4.3 Análisis histológico de hígado, ganglios poplíteos y edema subplantar**

Cada grupo de animal fue sacrificado para obtener el hígado y ganglio poplíteo para su análisis macroscópico e histológico. Posteriormente, se colocaron en una solución de formol amortiguada al 10% para su fijación.

Los órganos extraídos de los animales fueron lavados con SSI, y se sumergidos en EtOH anhidro durante 48 horas para su deshidratación. Transcurrido el tiempo, los tejidos se retiraron del EtOH y colocados en un procesador de tejidos para hacerlos pasar por xileno por una hora en dos ocasiones y finalmente incluirlos en parafina histológica. Cada tejido tratado fue colocado en cubos de parafina para obtener cortes de 5 µm realizados en un micrótopo. Cada corte se tiño con la técnica de hematoxilina eosina. Los cortes de cada tejido (edema subplantar y ganglios poplíteos) se analizaron en microscopio con la intención de buscar alteraciones histológicas en comparación con el grupo control (22,98).

#### **6.4.4.4 Cuantificación de enzima COX-2 por método fluorométrico**

Se utilizo un kit de ensayo (Cayman Chemilcal No 700200) para realizar la curva de cuantificación de COX-2 a diferentes concentraciones (0, 0.008, 0.016, 0.030, 0.063, 0.125, 0.250,0.500 U/µL), y el reactivo DUP-697 (inhibidor de COX-2).

Previamente fueron obtenidos los ganglios poplíteos (n=4) de los tratamientos, se colocaron en buffer de fosfato (PBS pH=7.4), para después ser homogenizado el tejido con 500 µL de buffer Tris-HCl (pH=7.5 con inhibidor de proteasas), el homogenizado fue centrifugado a 10,000 rpm/15 min a 4°C, el sobrenadante se refrigeró a -80°C para su utilización. Se calculó la concentración de COX-2 presente en los tratamientos a partir de una regresión lineal ( $y = mx + b$ ) obtenida de la curva patrón previamente realizada con COX-2 (Cayman).

#### **6.4.4.5 Determinación de proteínas totales**

Se utilizó un kit de ensayo (Cayman Chemical No 704002) para realizar la curva utilizando estándar de BSA (albumina de suero bovino) a diferentes concentraciones (0, 5.6, 7.5, 10.1, 13.5, 18, 24, 32 µg/mL), por otro lado las muestras de ganglios obtenidos previamente fueron diluidas en un factor de 100 [(10 µL, muestra + 990 µL, agua), las muestras fueron colocados en su respectivo pozo y se adicionaron 100 µL de reactivo de Bradford, para posteriormente leer a una absorbancia de 595 nm en un lector de Elisa, los resultados se emplearon para conocer la cantidad de proteína presente en los ganglios poplíteos (99).

### **6.5 Análisis estadístico**

Las pruebas estadísticas y las gráficas, fueron realizadas con el programa Sigma Plot versión 12.5. Todos los ensayos de inflamación *in vivo* y los resultados fueron expresados como las medias con su error estándar. El análisis de los resultados obtenidos en la inflamación aguda tópica (TPA) para la diferencia de pesos del tejido auricular se empleó una ANOVA una vía, mientras que para la inflamación sistémica (Carragenina) y crónica (AFC) para el diámetro del edema subplantar, se realizará mediante una ANOVA bifactorial de medidas repetidas (RM). La diferencia entre medias se determinará con la prueba post hoc SNK,  $p < 0.05$  para aquellas que serán considerados significativas.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Obtención del acetato de lupeol a partir del extracto orgánico de *C. tehuacanensis*

La especie vegetal objeto de estudio fue colectada en la comunidad de Calipán, perteneciente al municipio de Coxcatlán, Puebla. La colecta se realizó el 24 de julio del 2016; para realizar este proyecto de investigación se utilizaron las partes aéreas de *Cnidioscolus tehuacanensis* Breckon. Recientemente (21 de octubre del 2017) se realizó una colecta adicional de *C. tehuacanensis* con la finalidad de contar con material vegetal suficiente para obtener el compuesto de interés. Después de realizar la colecta del material vegetal (0.15 kg), éste fue secado durante dos semanas a temperatura ambiente (25 ± 2°C) y posteriormente fue triturado con la ayuda de un molino de cuchillas (Tor-Rey).

Con el material ya triturado se procedió a la preparación del extracto vía maceración a temperatura ambiente, repitiendo el proceso tres veces. El extracto se preparó empleando Hex como solvente, en proporción 50 g de material vegetal/litro de solvente. Transcurrido el tiempo de maceración (2 semanas), el extracto fue filtrado con papel filtro poro mediano por gravedad; de cada filtrado se eliminó el solvente a presión reducida (474-175 Pa).

Al finalizar el proceso se obtuvo el extracto crudo y libre de solvente (Hex). Se calculó el rendimiento con base en el peso seco y molido del material vegetal (Ecuación 1) cuyo rendimiento fue de 4.13 %. El extracto orgánico (CtH) fue guardado para su posterior uso.

$$\% \text{ de rendimiento} = [\text{PEC}/\text{PMv}] \times 100$$

Donde:

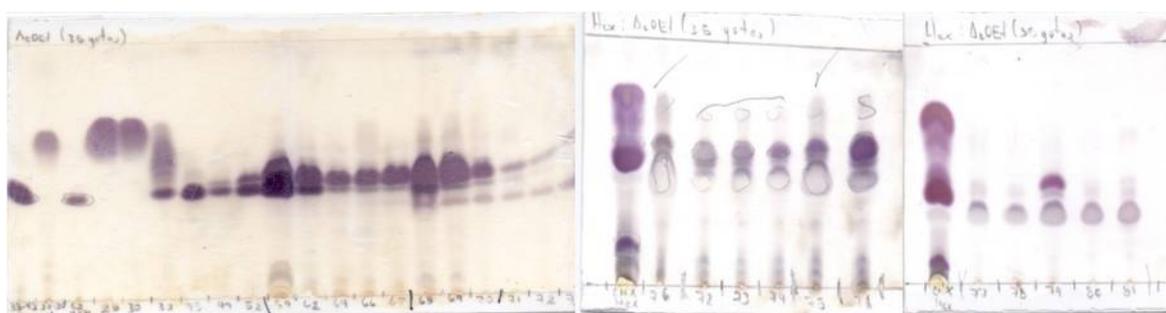
PEC: Peso del extracto crudo (g)

PMv: Peso del material vegetal seco y molido (g)

Cabe señalar que la metodología empleada fue similar a la reportada previamente por Zambrano-Vásquez et al., (90)

### 7.1.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico (CtH)

El fraccionamiento primario de extracto CtH se realizó por CC-FN empleando como fase estacionaria sílica gel 60 (168 g) y como fase móvil se emplearon disolventes con grado creciente de polaridad iniciando con Hex, mezcla de Hex:CHCl<sub>3</sub>, y CHCl<sub>3</sub> destilados previamente. Para este fraccionamiento se sometieron a la columna 6 g de extracto CtH, a partir de los cuales fueron colectadas 56 fracciones de 250 mL cada una, 62 fracciones de 500 mL y 8 fracciones de 1000 mL. Cada fracción fue concentrada al vacío para eliminar el solvente y fueron sometidas a CCF para conocer su perfil fitoquímico, después se reunieron según el perfil cromatográfico (Figura 13). Mediante este proceso se obtuvieron 8 grupos de fracciones, los sistemas empleados, los rendimientos obtenidos, y las claves finales de cada fracción se describen en la Tabla 5.



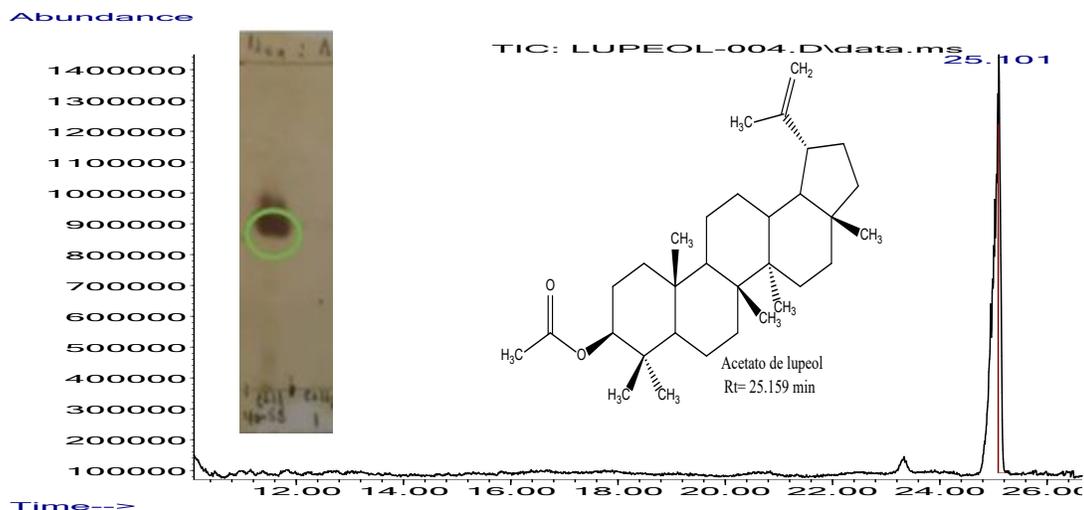
**Figura 14.** CCF de fracciones de baja polaridad del extracto CtH. Muestras: CtH 1-81. Referencia: CtH Hex (Extracto Hexánico *C. tehuacanensis*). Sistema: Hex:AcOEt [95:5]. Revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %.

**Tabla 5.** Fraccionamiento primario de *Cnidocolus tehuacanensis* (CtH).

Sistema de elución	Fracciones reunidas		Peso (mg)	% de Rendimiento	Clave final
	Colectadas	Reunidas			
Hexano [100]	1-71	1-23	202.9	3.38	CtH 1-23
		24-39	733	12.21	CtH 24-39
		<b>40-58</b>	<b>1400</b>	<b>23.33</b>	<b>CtH 40-58*</b>
		59-67	94.3	1.57	CtH 59-67
Hex:CHCl <sub>3</sub> [9:1]	72-79	68-82	274.6	4.57	CtH 68-82
Hex:CHCl <sub>3</sub> [8:2]	80-83				
Hex:CHCl <sub>3</sub> [6:4]	84-92	83-95	553	9.2	CtH 83-95
CHCl <sub>3</sub> :Hex [6:4]	93-100	96-104	276.3	4.605	CtH 96-104
CHCl <sub>3</sub> :Hex [8:2]	101-117	105-126	1537.4	25.53	CtH 105-126
CHCl <sub>3</sub> 100%	118-126				

\*Polvo blanco con P.F. 203-205°C y  $R_f = 0.55$  en CCF empleando sistema de elución Hex:AcOEt (95:5), analizado por CG-MS.

La fracción primaria 40-58 fue seleccionada a partir de su perfil en CCF y su rendimiento, la cual fue analizada por CG-MS, como se observa en la Figura 15 el compuesto de interés se encuentra en un 99.19 % de abundancia, con un tiempo de retención (Rt) de 25.16 min.



**Figura 15.** Cromatograma de CG-EM de la fracción primaria 40-58.  
Muestra: CtH 40-58. Sistema: Hex:AcOEt [95:5]. Revelador H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

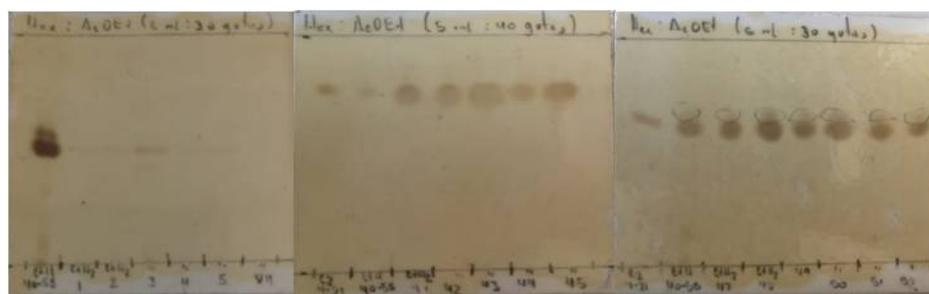
### 7.1.2 Fraccionamiento secundario de la fracción 40-58

A partir del fraccionamiento primario denominado CtH, se seleccionó la fracción F40-58 para realizar un fraccionamiento secundario y aislar el compuesto de interés (acetato de lupeol) con mejor grado de pureza. Para este proceso, se sometieron 1,380 mg de dicha fracción a CC-FN, en este caso la fase estacionaria (55.2 g de silica gel 60) fue impregnada con nitrato de plata (AgNO<sub>3</sub>). Mediante este proceso se recolectaron 31 fracciones de 50 mL, 8 fracciones de 100 mL, 12 fracciones de 200 mL y 3 fracciones de 500 mL, cada una de las fracciones se concentró y se reunió según el perfil cromatográfico mostrado en CCF, utilizando H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> al 10 % como agente cromogénico. Estas fracciones fueron reunidas y agrupadas en 8 grupos. El sistema de elución empleado, el rendimiento obtenido, así como su respectiva clave final se describen en la Tabla 6. La CCF de cada fracción se muestran en la Figura 16.

**Tabla 6.** Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 40-58.

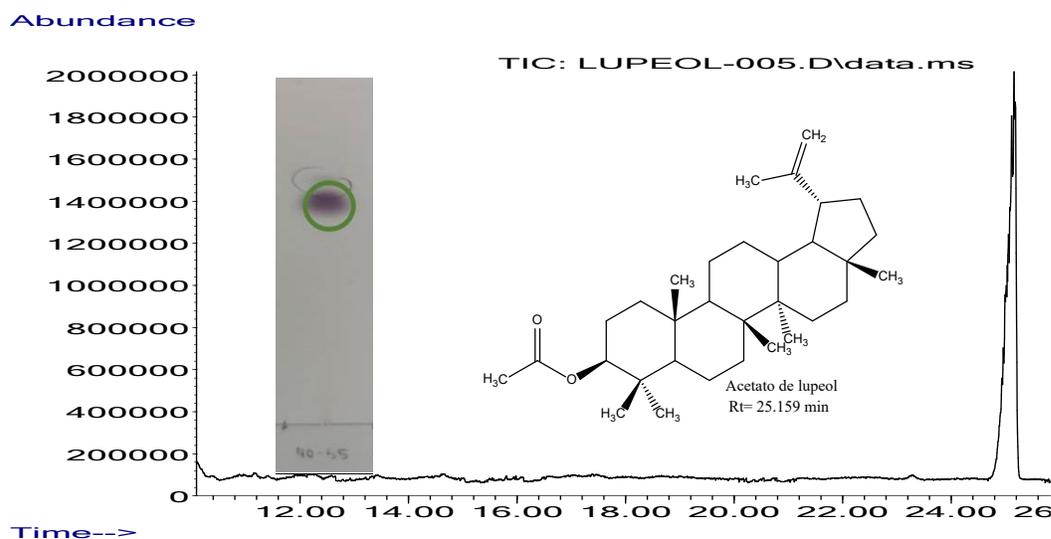
Sistema de elución	Fracciones		Peso (mg)	Rendimiento (%)	Clave Final
	Colectadas	Reunidas			
Hexano [100]	1-55	1-14	19.3	1.4	CtH <sub>2</sub> 1-14
		15-17	2.8	0.2	CtH <sub>2</sub> 15-17
		18-38	62.95	4.56	CtH <sub>2</sub> 18-24
		39	48.8	3.29	CtH <sub>2</sub> 39
		<b>40-55</b>	<b>983.9</b>	<b>71.29</b>	<b>CtH<sub>2</sub> 40-55*</b>

\*R<sub>f</sub> = 0.55 en CCF empleando sistema de elución Hex:AcOEt (95:5). Analizado por CG-MS.



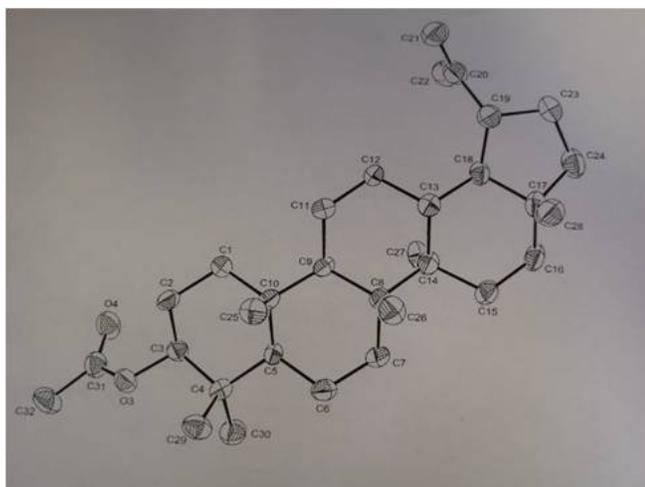
**Figura 16.** CCF de fracciones ricas en AL del extracto CtH.  
Muestras: CtH<sub>2</sub> 1-6, 40-55. Referencia: F40-58 (Fraccionamiento CtH).  
Sistema: Hex:AcOEt [95:5]. Revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %.

La fracción secundaria 40-55 fue la de mayor rendimiento y se obtuvo como polvo blanco con p.f. = 208-210 °C, soluble en Hex y con R<sub>f</sub> = 0.55, al emplear un sistema de elución Hex:AcOEt [95:5]. El R<sub>f</sub> fue similar al AL, para confirmar su pureza e identificación se realizó un análisis de CG-EM. En la Figura 17 se observa el respectivo cromatograma de CG-EM, así como el R<sub>t</sub> correspondiente (25.16 min) y el porcentaje de abundancia del compuesto de interés que fue del 100%.



**Figura 17.** Cromatograma de la fracción secundaria 40-55.

Así mismo, se realizó un análisis por difracción de rayos X, la cual es una técnica aplicada para la caracterización de materiales cristalinos (F40-55) que tiene como fundamento la interacción entre el haz de rayos X y los electrones del entorno ordenado de un cristal, permitiendo el acceso a la información de la estructura de la muestra (23). La Figura 18 muestra la estructura química, permitiendo corroborar la identificación del compuesto de interés. A partir de los análisis realizados mediante diversos métodos cromatográficos, la fracción C<sub>t</sub>H<sub>2</sub> 40-55 (983.9 mg) se seleccionó para realizar las pruebas biológicas correspondientes por su pureza y abundancia.



**Figura 18.** Estructura química del AL determinado mediante difracción de rayos X.

### 7.1.3 Fraccionamiento secundario de la fracción primaria 49-53

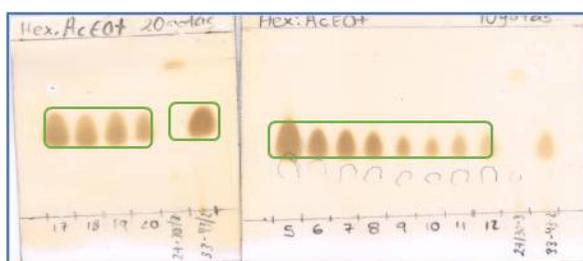
En un estudio previo (tesis de Licenciatura) se realizó el fraccionamiento primario de un extracto  $\text{CHCl}_3:\text{EtOH}$  de *C. tehuacanensis* (CtH) y se obtuvieron 169 fracciones primarias, de estas fracciones primarias se eligió la fracción 49-53 para realizar un fraccionamiento secundario y aislar el compuesto de interés (AL). Para este proceso, se sometieron 507.9 mg de dicha fracción a CC-FN, en este caso la fase estacionaria (23 g de silica gel 60) fue impregnada de nitrato de plata ( $\text{AgNO}_3$ ). Mediante este proceso se recolectaron 39 fracciones de 50 mL, cada una de las fracciones se concentró y se reunió según el perfil cromatográfico mostrado en CCF, utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  como agente cromogénico. De acuerdo a su perfil cromatográfico (Figura 19), estas fracciones secundarias fueron agrupadas en 4 grupos. El sistema de elución empleado, el rendimiento obtenido, así como su respectiva clave final se describen en la Tabla 7.

**Tabla 7.** Fraccionamiento químico secundario de la fracción F49-53.

Sistema de elución	Fracciones		Peso (mg)	Rendimiento (%)	Clave Final	p.f.
	Colectadas	Reunidas				
Hexano [100]	1-39	1-3	2.1	0.41	1-3	
		<b>4-21</b>	<b>321.8</b>	<b>63.3</b>	<b>4-21*</b>	<b>210-215**</b>
		22-28	50.5	9.9	22-28	
		29	4.1	0.8	29	
		31-39	43.9	8.64	31-39	

\*R<sub>f</sub> = 0.55 en CCF empleando sistema de elución Hex:AcOEt (95:5). Analizado por CG-MS.

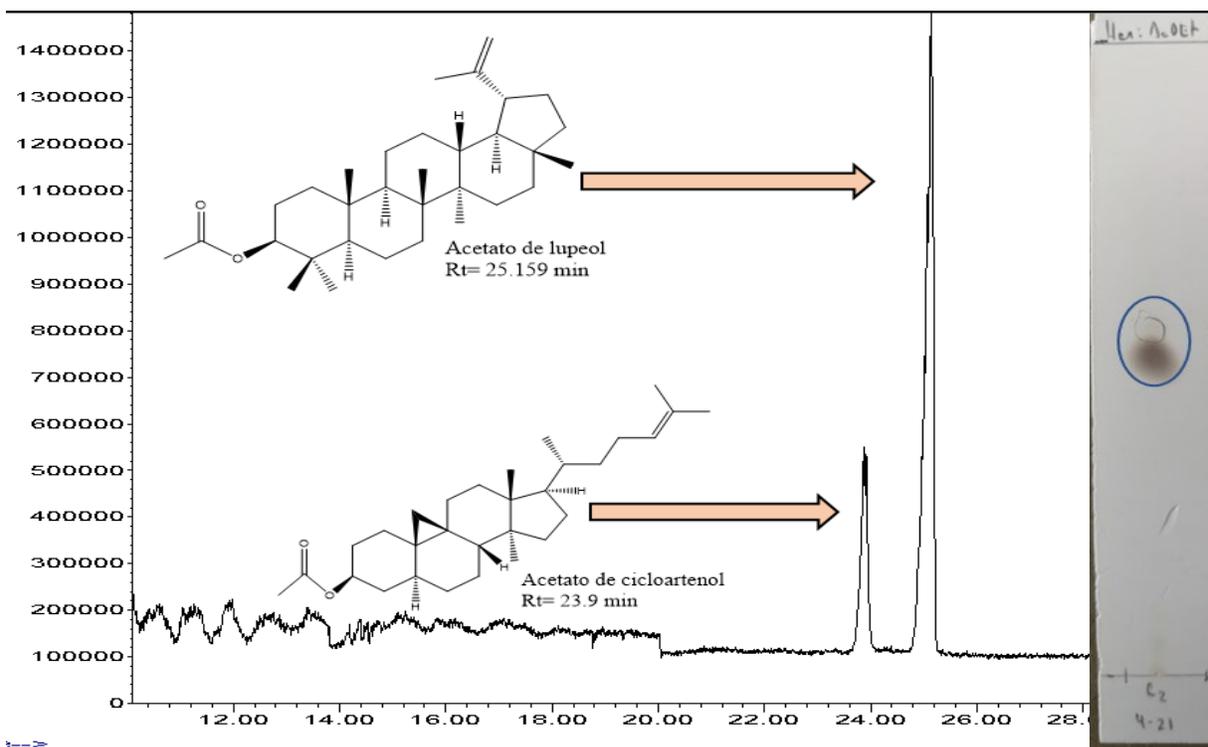
\*\*p.f. reportado para AL (216-218 °C).



**Figura 19.** CCF de las fracciones obtenidas por el fraccionamiento secundario 49-53.

Muestras: F49-53/5,6,7,8,9,10,11,17,18,19,20. Referencia: AL. Sistema: Hex: AcOEt [97:3]. Revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %.

La fracción secundaria 49-53/4-21, presenta un R<sub>f</sub> similar al obtenido para el AL, por lo que fue analizada por CG-MS para determinar su grado de pureza, así como la abundancia presente en esta fracción. En la Figura 20 se observa el respectivo cromatograma de gases, así como los R<sub>t</sub> correspondientes y los porcentajes de abundancia. En el cromatograma se observó la presencia de dos triterpenos: acetato de cicloartenol con un R<sub>t</sub> = 23.9 min y el compuesto de interés (AL) con un R<sub>t</sub> = 25.16 min, valor similar al presentado al cromatograma de la fracción primaria CtH 40-55 (Figura 16). Respecto al porcentaje de abundancia de los dos triterpenos presentes en la muestra, el acetato de cicloartenol está presente en un 31.1% y el AL un 68.9 %. A partir del cromatograma obtenido se decidió someterlo nuevamente a CC-FN con la finalidad de obtener AL puro.



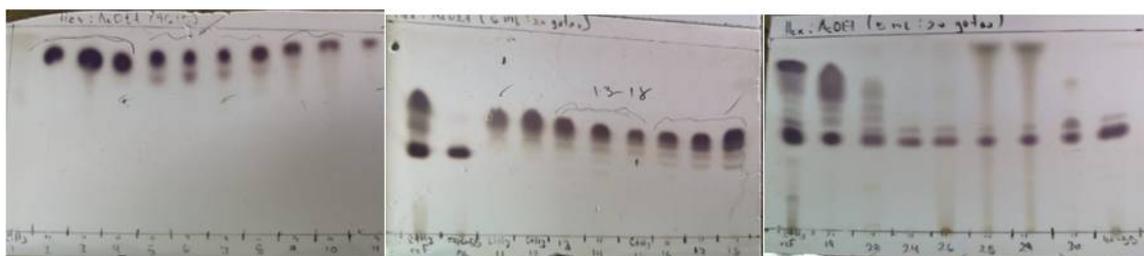
**Figura 20.** Cromatograma de la fracción secundaria 49-53/4-21.

#### 7.1.4 Fraccionamiento terciario de fracciones ricas en AL

Se llevó a cabo un fraccionamiento terciario a partir de fracciones colectadas de los fraccionamientos F49-53 (Tabla 7) y CtH (Tabla 6); las fracciones 49-53/4-46, CtH 24-39 y CtH 59-82 mostraron la presencia de AL pero con algunas impurezas cuyo perfil fue similar a la fracción 40-55 (Figura 17). Este fraccionamiento en CC-FN se llevó a cabo sometiendo 1,700 mg de las fracciones reunidas; en este caso la fase estacionaria (55.2 g de silica gel 60) fue impregnada con  $\text{AgNO}_3$ . Mediante este proceso se recolectaron 16 fracciones de 50 mL y fracciones de 100 mL. Cada una de las fracciones se concentró y se reunió según el perfil cromatográfico mostrado en CCF, utilizando  $\text{H}_2\text{SO}_4$  al 10 % (Figura 18). Estas fracciones fueron reunidas y agrupadas en 10 grupos. El sistema de elución empleado, el rendimiento obtenido, así como su respectiva clave final se describen en la Tabla 8. Mediante este fraccionamiento se logra obtener el compuesto de interés (AL); sin embargo, estas fracciones están contaminadas según se observa en la CCF y en la Figura. 21

**Tabla 8.** Fraccionamiento químico terciario para la obtención de AL.

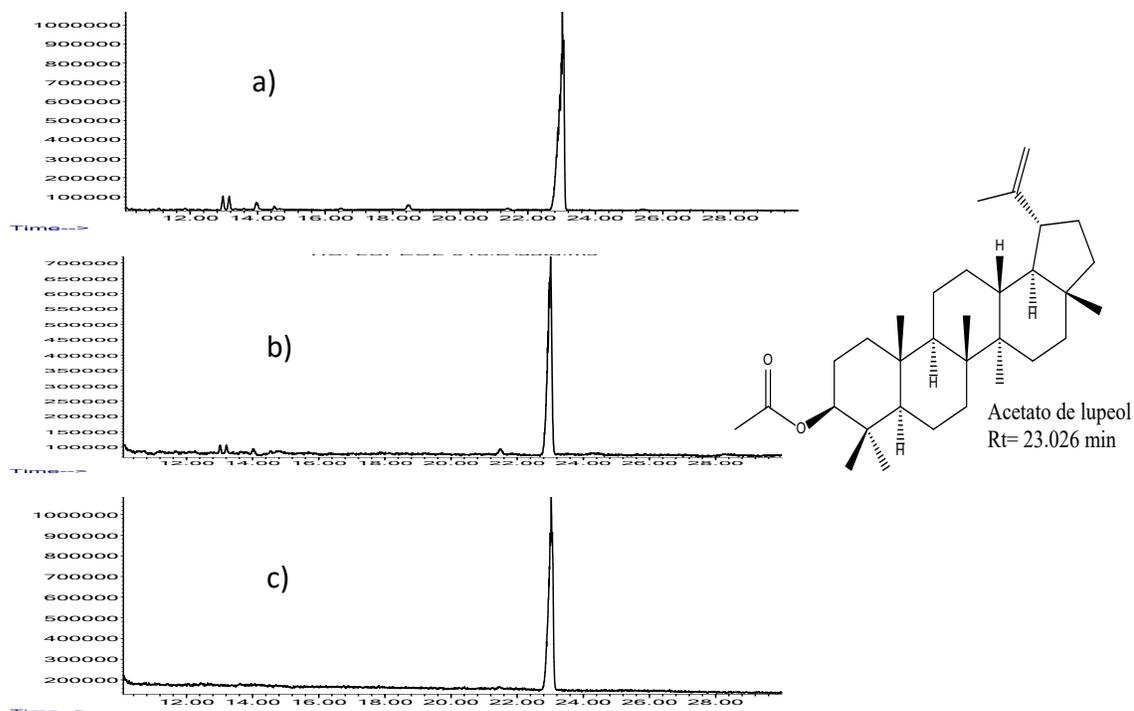
Sistema de elución	Fracciones		Peso (mg)	Rendimiento (%)	Clave Final
	Colectadas	Reunidas			
Hexano [100]	1-36	1-4	417.8	24.57	CtH <sub>3</sub> 2-4
		5-6	78.7	4.63	CtH <sub>3</sub> 5-6
		7-8	49.5	2.91	CtH <sub>3</sub> 7-8
		9-10	32.3	1.9	CtH <sub>3</sub> 9-10
		11-12	29.8	1.75	CtH <sub>3</sub> 11-12
		13-18	45.1	2.65	CtH <sub>3</sub> 13-18
		19-20	460.1	27.06	CtH <sub>3</sub> 19-20
		<b>21-30</b>	<b>323</b>	<b>19</b>	<b>CtH<sub>3</sub> 21-30*</b>
		31-36	28.1	1.65	CtH <sub>3</sub> 31-36



**Figura 21.** Perfil cromatográfico de fracciones ricas en el compuesto de interés.

Muestras: CtH<sub>3</sub> 1-36. Referencia: CtH<sub>2</sub> 40-55 (acetato de lupeol). Sistema: Hex:AcOEt [95:5]. Revelador: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 %.

Con la finalidad de obtener cantidad suficiente de AL para poder realizar el ensayo biológico, se realizaron al menos cinco CC-FN, mediante las cuales se logró obtener el AL con grado de pureza diferente como se observa en la Figura 22.



**Figura 22.** Cromatogramas de las fracciones a) CtH<sub>6</sub> 12-15; b) CtH<sub>6</sub> 18-19 y c) CtH<sub>6</sub> 22-25.

En la Figura 22 se observan los cromatogramas, mostrando que la fracción a) posee un 92.76% de pureza, la fracción b) y c) presentaron un 95.9 y 100 % de pureza respectivamente. La fracción CtH<sub>6</sub> 22-25 (c) fue reunida con la fracción CtH<sub>2</sub> 40-55 para el ensayo biológico.

## 7.2 Síntesis e identificación del derivado de Br-5-ASA

Se llevó a cabo la síntesis del derivado Br-5-ASA siguiendo las condiciones descritas por Cabrera-Pérez et al., (62). Mediante dos reacciones, la primera presentó un rendimiento del 50.81% obteniendo 548.3 mg de derivado Br-5-ASA; en la segunda reacción se obtuvieron 1.475 g del compuesto de interés, mostrando un rendimiento del 67.92%. Los rendimientos fueron calculados a partir del rendimiento teórico como se observa en las siguientes ecuaciones:

Ecuación 1. Calculo de rendimiento (%) Rx1 Br-5-ASA

$$0.5008 \text{ g ASA} \left| \frac{1 \text{ mol ASA}}{153.14 \text{ g ASA}} \right| \left| \frac{1 \text{ mol prod}}{1 \text{ mol ASA}} \right| \left| \frac{330.08 \text{ g}}{1 \text{ mol prod}} \right| = 1.079 \text{ g (Teórico)}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \left( \frac{0.5483 \text{ g}}{1.079 \text{ g}} \right) \times 100 = 50.81 \%$$

Ecuación 2. Calculo de rendimiento (%) Rx2 Br-5-ASA

$$01.0078 \text{ g ASA} \left| \frac{1 \text{ mol ASA}}{153.14 \text{ g ASA}} \right| \left| \frac{1 \text{ mol prod}}{1 \text{ mol ASA}} \right| \left| \frac{330.08 \text{ g}}{1 \text{ mol prod}} \right| = 2.172 \text{ g (Teórico)}$$

$$\% \text{ Rendimiento} = \left( \frac{1.4753 \text{ g}}{2.172 \text{ g}} \right) \times 100 = 67.92 \%$$

El sólido obtenido presento color amarillo mp: 215 °C. PM (teórico) = 330.08 g/mol. El compuesto fue soluble en: dimetilsulfóxido (DMSO), tetrahidrofurano y EtOH, mostró parcial solubilidad en MeOH y acetona y ligera solubilidad en AcOEt, acetonitrilo.

Los datos de RMN <sup>1</sup>H (300 MHz, DMSO) fueron: ppm 12.2 y 11.0 (a, 1H c/u, OH), 9.85 (s, 1H, NH), 8.09 (d, 1H, J = 3, H6), 7.63 (dd, 1H, J = 9, J = 3, H4), 6.87 (d, J = 9, H3), 2.27 (m, 4H, J = 7, H9 y H11), 1.77 (q, 2H, J = 7, H10) (Figura 23).

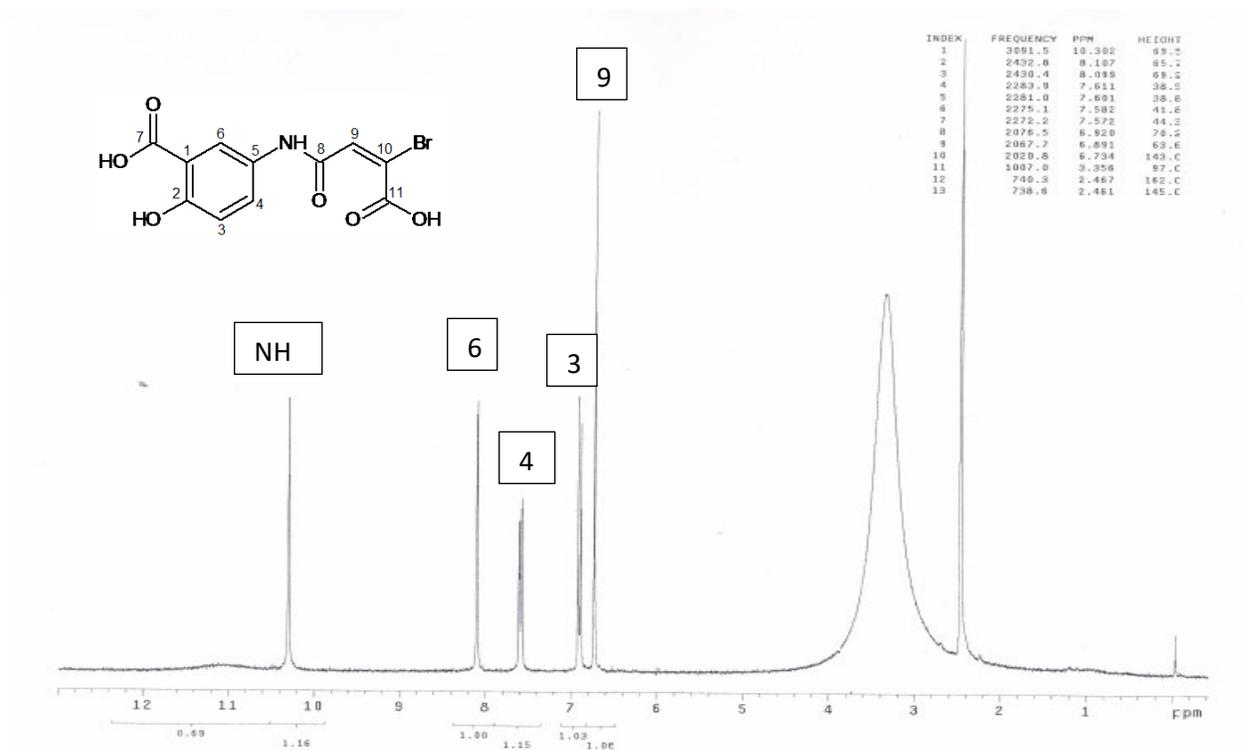
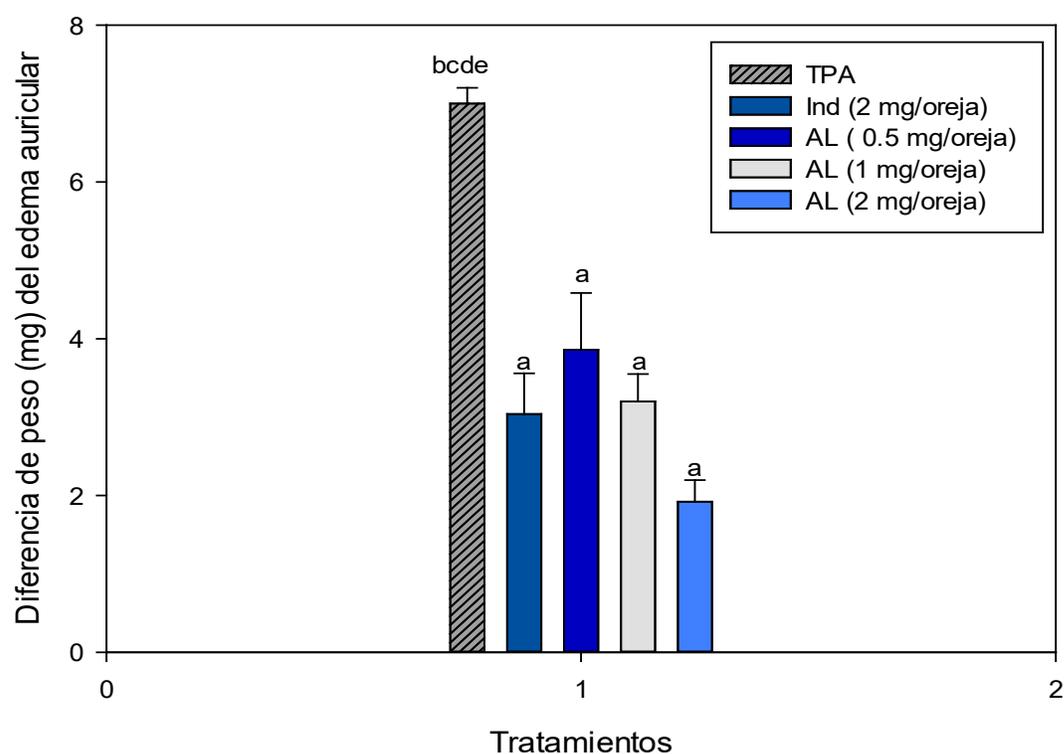


Figura 23. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del derivado de Br-5-ASA.

### 7.3 Evaluación de la actividad antiinflamatoria *in vivo*

#### 7.3.1 Evaluación de AL en el modelo de TPA

Para determinar la DE<sub>50</sub> de este compuesto, se evaluó en un rango 0.5 a 2 mg/oreja, y se procedió a calcular el porcentaje de inhibición. Los resultados obtenidos se describen en la Figura 24 y Tabla 9, mediante estos datos se calculó el valor de DE<sub>50</sub> siendo de 0.91 mg/oreja (7.10 mM/oreja) y la DE<sub>50</sub> para el control positivo fue de 1.76 mg/oreja (19.39 mM/oreja).



**Figura 24.** Actividad antiinflamatoria aguda tópica del AL sobre el edema auricular inducido con TPA en ratones machos Balb/c machos.

Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Las dosis para cada grupo y tratamiento fueron de 0.5, 1 y 2 mg/oreja. ANOVA de una vía y prueba, post hoc Student Newman Keuls ( $p \leq 0.05$ ). <sup>a</sup>vs control TPA. <sup>b</sup>vs Ind. <sup>c</sup>vs AL (0.5 mg/oreja), <sup>d</sup>vs AL (1 mg/oreja), <sup>e</sup>vs AL (2 mg/oreja),  $n = 5$ .

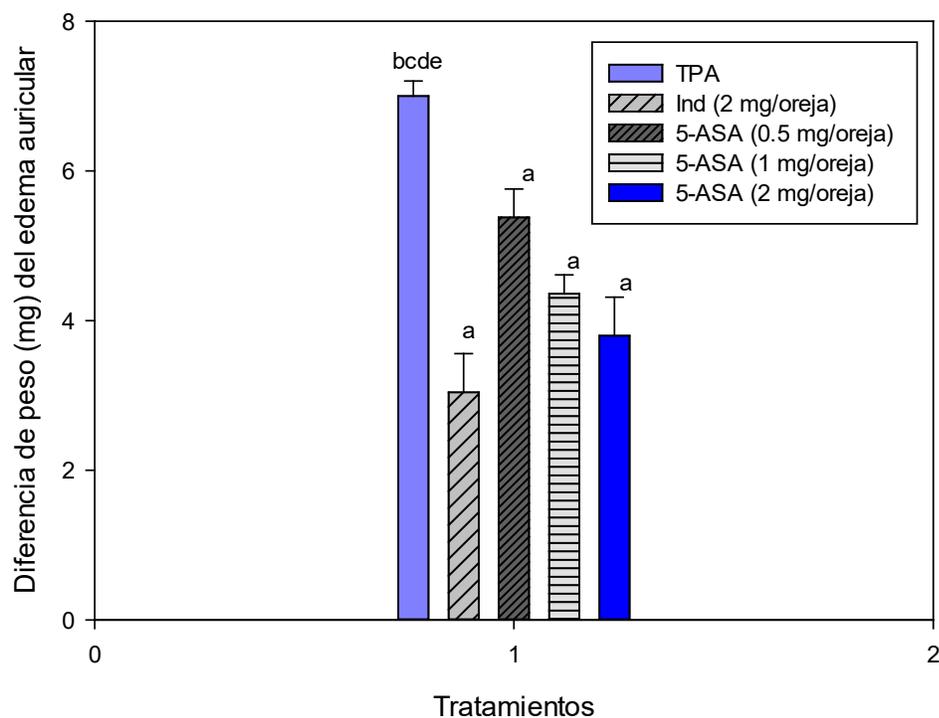
**Tabla 9.** Actividad antiinflamatoria (porcentaje de inhibición) de AL sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones Balb/c machos.

Tratamiento	Diferencia de peso del edema auricular (mg)	Porcentaje de inhibición (%)
Control TPA	7 $\pm$ 0.20 <sup>bcde</sup>	
Ind (18.63 mM/oreja)	3.04 $\pm$ 0.52 <sup>a</sup>	56.57%
AL (3.90 mM/oreja)	3.86 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	45.63%
AL (7.81 mM/oreja)	3.2 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>	54.93%
AL (15.62 mM/oreja)	1.92 $\pm$ 0.27 <sup>a</sup>	73.69%

\*Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Las dosis para cada grupo y tratamiento fueron de 0.5, 1 y 2 mg/oreja. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de inhibición del edema auricular con respecto del grupo control de TPA. ANOVA de una vía y prueba, post hoc Student Newman Keuls ( $p \leq 0.05$ ). <sup>a</sup>vs control TPA, <sup>b</sup>vs Ind, <sup>c</sup>vs AL (2 mg/oreja), <sup>d</sup>vs AL (1 mg/oreja), <sup>e</sup>vs AL (0.5 mg/oreja),  $n=5$ .

### 7.3.2 Evaluación de Br-5-ASA en el modelo de TPA

El compuesto Br-5-ASA fue evaluado en el rango de 0.5 a 2 mg/oreja. Los resultados muestran que el porcentaje de inhibición máximo fue de 46.48% a la mayor dosis (Figura 25, Tabla 10). En este caso la DE<sub>50</sub> fue de 2.15 mg/oreja (2.17 mM/oreja).



**Figura 25.** Actividad antiinflamatoria aguda tópica de Br-5-ASA sobre la diferencia de peso del edema auricular inducido con TPA en ratones machos Balb/c machos.

Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Las dosis para cada grupo y tratamiento fueron de 0.5, 1 y 2 mg/oreja. ANOVA de una vía y prueba, post hoc Student Newman Keuls ( $p \leq 0.05$ ). <sup>a</sup>vs control TPA, <sup>b</sup>vs Ind, <sup>c</sup>vs Br-5-ASA (0.5 mg/oreja), <sup>d</sup>vs Br-5-ASA (1 mg/oreja), <sup>e</sup>vs Br-5-ASA (2 mg/oreja), n = 5.

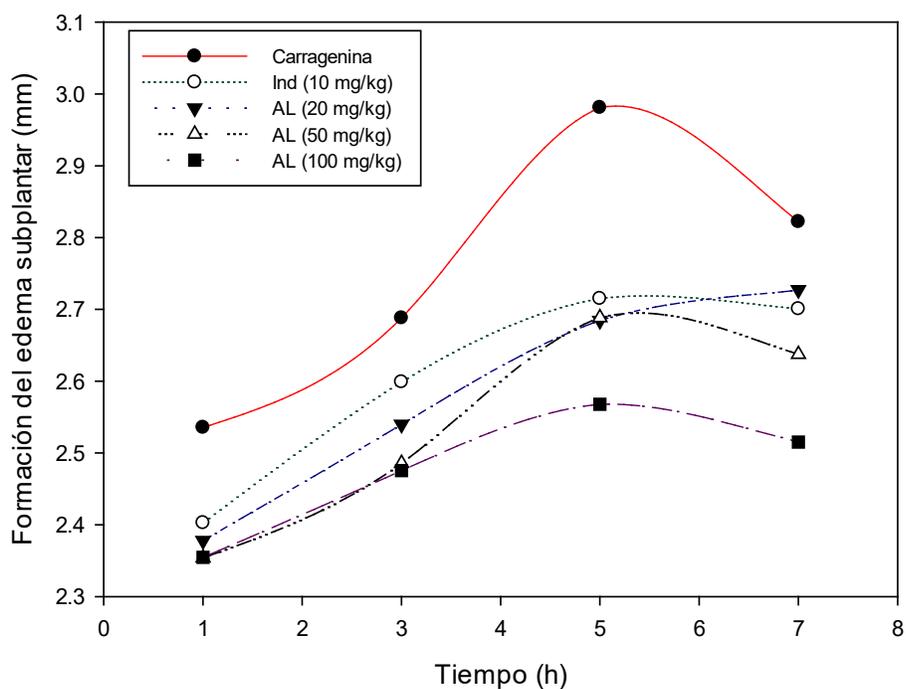
**Tabla 10.** Actividad antiinflamatoria (porcentaje de inhibición) de Br-5-ASA sobre la formación del edema auricular inducido con TPA en ratones Balb/c machos.

Tratamiento	Diferencia de peso del edema auricular (mg)	Porcentaje de inhibición (%)
Control TPA	0.7±0.20 <sup>bcde</sup>	
Ind (18.63 mM/oreja)	3.04±0.52 <sup>a</sup>	56.57%
Br-5-ASA (0.5 mM/oreja)	5.38±0.37 <sup>a</sup>	24.23%
Br-5-ASA (1.01 mM/oreja)	4.36±0.25 <sup>a</sup>	38.59%
Br-5-ASA (2.02 mM/oreja)	3.8±0.51 <sup>a</sup>	46.48%

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Las dosis para cada grupo y tratamiento fueron de 0.5, 1 y 2 mg/oreja. Los valores entre paréntesis indican el porcentaje de inhibición del edema auricular con respecto del grupo control de TPA. ANOVA de una vía y prueba, post hoc Student Newman Keuls ( $p \leq 0.05$ ). <sup>a</sup>vs control TPA, <sup>b</sup>vs Ind, <sup>c</sup>vs Br-ASA (0.5 mg/oreja), <sup>d</sup>vs Br-5ASA (1 mg/oreja), <sup>e</sup>vs Br-5ASA (2 mg/oreja), n=5.

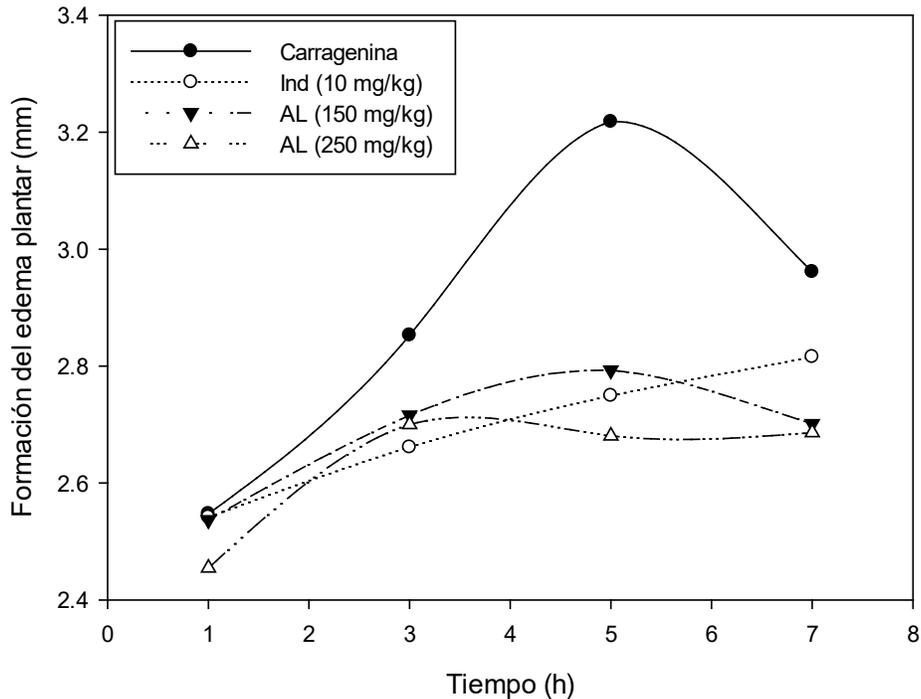
### 7.3.3 Evaluación de AL en el modelo carragenina

En este experimento se usó la carragenina como agente flogístico, Ind como fármaco de referencia y el compuesto AL se evaluó a las dosis de 20, 50, 100, 150 y 250 mg/kg, administrado por vía i.g. y evaluados en dos experimentos. Los animales tratados con AL a la dosis de 20 y 50 mg/kg presentaron un máximo de inhibición (33.05 y 33.62 %, respectivamente) a la quinta hora, este porcentaje de inhibición fue similar a la Ind (31.33%) a la misma hora. Por otro lado, el efecto antiinflamatorio del compuesto de interés a la dosis de 100 y 150 mg/kg mostró un valor del 43.31% y 40.22% a la quinta hora, respectivamente, respecto al control sin tratamiento; estas dosis presentaron mayor porcentaje de inhibición que el control positivo (Ind) al mismo tiempo (Figura 25, Tabla 11). Cabe señalar que a la dosis de 250 mg/kg se observó un 51.25 % de inhibición a la 5a hora, siendo mayor este porcentaje que el observado para la Ind (31.33 %).



**Figura 26.** Actividad antiinflamatoria de AL (20, 50 y 100 mg/kg) sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos. Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ),  $n = 5$ .

A las dosis más altas (150 y 250 mg/kg) en el segundo experimento, el porcentaje de inhibición fue muy similar a la 5ª hora de formación del edema, siendo este valor 40.2 y 51.2 % de inhibición; sin embargo, al realizar un análisis estadístico no se observó diferencia significativa. Los resultados de este 2do experimento permitieron calcular la  $DE_{50} = 243.9$  mg/kg (204.13 mM/kg) y se describen en la Figura 27 y Tabla 11.



**Figura 27.** Actividad antiinflamatoria de AL (150 y 250 mg/kg) sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos. Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ),  $n = 5$ .

El análisis estadístico correspondiente se llevó a cabo mediante un ANOVA de dos vías de medias repetidas, donde se comparó el factor (tratamiento) vs factor (tiempo), mostrando que las diferentes dosis evaluadas de AL sólo presentan diferencia significativa al ser comparadas con el control negativo (tratamiento con carragenina) a la 5ª hora, en la cual todas las dosis evaluadas presentaron actividad antiinflamatoria sistémica (Tabla 11).

**Tabla 11.** Actividad antiinflamatoria de AL sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos.

Tratamiento	Hora de medición			
	1 <sup>er</sup> h	3 <sup>er</sup> hora	5 <sup>ta</sup> h	7 <sup>a</sup> h
Carragenina	0.36±0.02 <sup>ijk</sup>	0.51±0.07 <sup>hjk</sup>	0.8±0.17 <sup>bcdefhik</sup>	0.64±0.1 <sup>ahij</sup>
Ind (10 mg/kg)	0.24±0.03 <sup>ijk</sup> (33.12%)	0.44±0.02 <sup>hjk</sup> (14.62%)	0.55±0.05 <sup>ahik</sup> (31.33%)	0.67±0.03 <sup>behij</sup> (13.90%)
AL (20 mg/kg)	0.23±0.03 <sup>ijk</sup> (35.31%)	0.39±0.02 <sup>hjk</sup> (22.94%)	0.54±0.03 <sup>ahi</sup> (33.05%)	0.58±0.03 <sup>hi</sup> (9.9%)
AL (50 mg/kg)	0.20±0.01 <sup>ijk</sup> (44.43%)	0.33±0.04 <sup>fghjk</sup> (35.25%)	0.53±0.03 <sup>ahi</sup> (33.62%)	0.48±0.05 <sup>hi</sup> (25.20%)
AL (100 mg/kg)	0.24±0.01 <sup>ijk</sup> (32.28%)	0.36±0.03 <sup>h</sup> (28.86%)	0.46±0.03 <sup>ah</sup> (43.31%)	0.40±0.04 <sup>bh</sup> (37.50%)
AL (150 mg/kg)	0.35±0.06 <sup>ijk</sup> (10.8%)	0.55±0.04 <sup>dh</sup> (21.17%)	0.63±0.06 <sup>ah</sup> (40.22%)	0.55±0.05 <sup>h</sup> (37.7%)
AL (250 mg/kg)	0.32±0.01 <sup>ijk</sup> (17.2%)	0.52±0.07 <sup>dh</sup> (25.5%)	0.51±0.06 <sup>ah</sup> (51.25%)	0.53±0.02 <sup>h</sup> (40.01%)

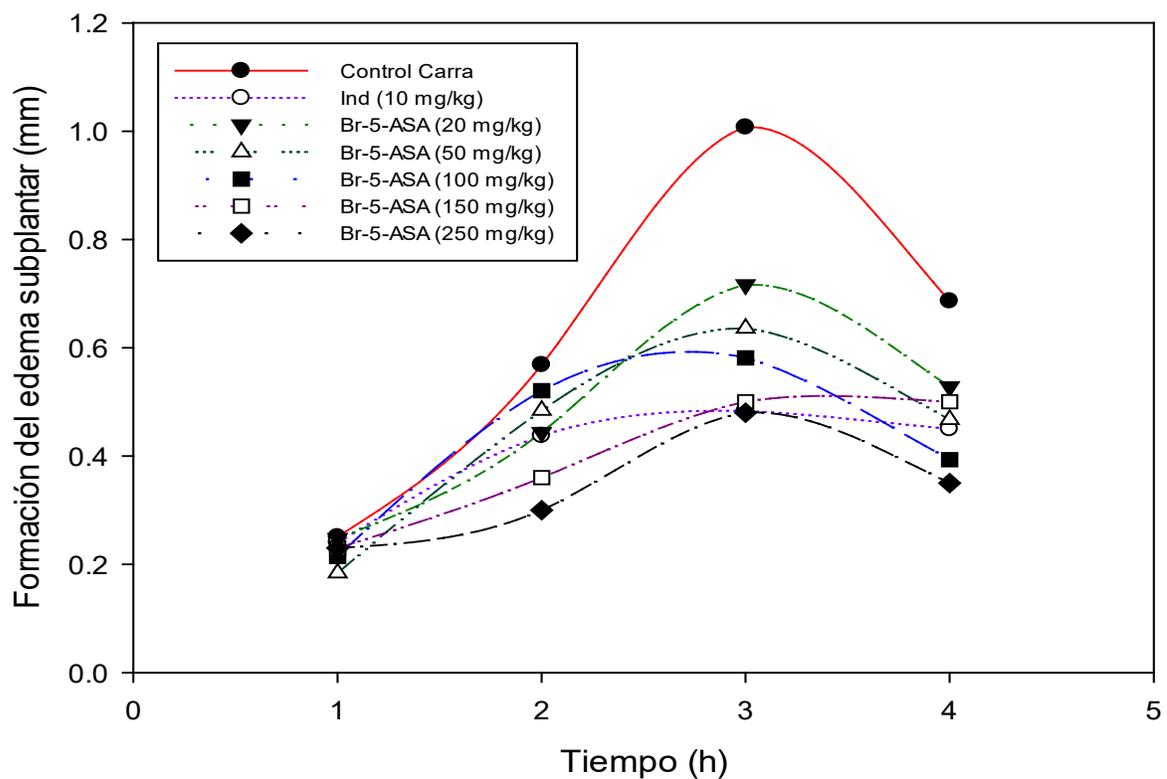
\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Control carragenina, <sup>b</sup>vs Ind, <sup>c</sup>vs AL 20 mg/kg, <sup>d</sup>vs AL 50 mg/kg, <sup>e</sup>vs AL 100 mg/kg, <sup>f</sup>vs AL 150 mg/kg, <sup>g</sup>vs AL 250 mg/kg, <sup>h</sup>vs 1h, <sup>i</sup>vs 3h, <sup>j</sup>vs 5h, <sup>k</sup>vs 7h; AL, Acetato de lupeol; n=5.

### 7.3.4 Evaluación de Br-5-ASA en el modelo de carragenina

El Br-5ASA se evaluó a las dosis de 20, 50, 100, 150 y 250 mg/kg y se empleó Ind como control positivo. El compuesto a la dosis menor (20 mg/kg) mostró 28.88 % de inhibición a la quinta hora, y a la dosis máxima (250 mg/kg) presentó un mejor efecto antiinflamatorio siendo de 52.25% a la misma hora. Cabe destacar que las 5 dosis evaluadas en el modelo presentaron un comportamiento dependiente de la dosis (Figura 28), con estos resultados se determinó su respectiva  $DE_{50} = 240.38$  mg/kg (284.72 mM/kg) (Tabla 12).

Así mismo, se llevó a cabo el análisis estadístico correspondiente mediante un ANOVA de dos vías de medias repetidas, donde nuevamente fue comparado el tratamiento vs tiempo, mostrando que las diferentes dosis evaluadas de Br-5-ASA presentaron diferencia significativa entre los tratamientos administrados y frente al control negativo (tratamiento con carragenina) a la 5<sup>ta</sup> hora, en la cual todas las dosis evaluadas mostraron actividad

antiinflamatoria sistémica, observando que la dosis de 250 mg/kg fue la dosis que presentó el mejor efecto antiinflamatorio (Tabla 12).



**Figura 28.** Actividad antiinflamatoria de Br-5-ASA sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/C machos. Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ );  $n=5$ .

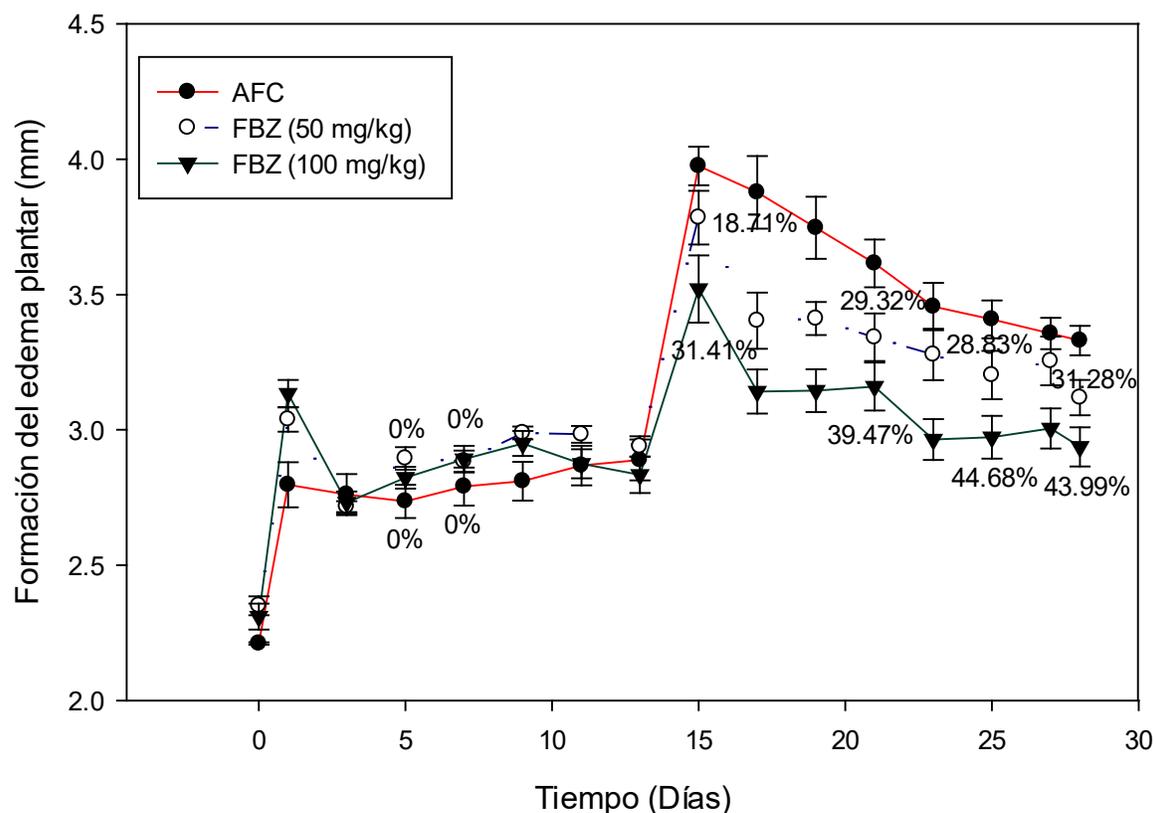
**Tabla 12.** Actividad antiinflamatoria de Br-5-ASA sobre el edema suplantar agudo inducido con carragenina en ratones Balb/c machos.

Tratamiento	Hora de medición			
	1 <sup>er</sup> h	3 <sup>er</sup> h	5 <sup>ta</sup> h	7 <sup>a</sup> h
Carragenina	0.25±0.01 <sup>ijk</sup>	0.56±0.03 <sup>bcfghjk</sup>	1.0±0.04 <sup>bcdefghik</sup>	0.68±0.06 <sup>bcdefghij</sup>
Ind (10 mg/kg)	0.24±0.01 <sup>ijk</sup> (4.2%)	0.43±0.02 <sup>agh</sup> (23.02%)	0.48±0.003 <sup>acdeh</sup> (52.05%)	0.45±0.02 <sup>agh</sup> (34.44%)
Br-5-ASA (20 mg/kg)	0.24±0.01 <sup>ijk</sup> (1.27%)	0.44±0.01 <sup>aghjk</sup> (21.95%)	0.71±0.01 <sup>abdefghik</sup> (28.05%)	0.52±0.01 <sup>aeghij</sup> (23.19%)
Br-5-ASA (50 mg/kg)	0.18±0.01 <sup>ijk</sup> (26.71%)	0.48±0.03 <sup>fghj</sup> (14.84%)	0.63±0.01 <sup>abcfnik</sup> (36.90%)	0.46±0.1 <sup>aghj</sup> (31.93%)
Br-5-ASA (100 mg/kg)	0.21±0.01 <sup>ijk</sup> (14.43%)	0.52±0.02 <sup>fghk</sup> (8.44%)	0.58±0.01 <sup>abcgkh</sup> (42.30%)	0.39±0.02 <sup>acfnij</sup> (42.7%)
Br-5-ASA (150 mg/kg)	0.23±0.03 <sup>ijk</sup> (8.05%)	0.36±0.03 <sup>adehjk</sup> (36.52.45%)	0.50±0.02 <sup>acdhi</sup> (49.71%)	0.50±0.04 <sup>aeghi</sup> (26.86%)
Br-5-ASA (250 mg/kg)	0.23±0.04 <sup>ijk</sup> (7.81%)	0.30±0.02 <sup>abcdehj</sup> (45.91%)	0.48±0.02 <sup>acehik</sup> (52.25%)	0.35±0.03 <sup>abcdfhj</sup> (47.63%)

\*Cada grupo está representado como la media ± E.E. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Control carragenina, <sup>b</sup>vs Ind, <sup>c</sup>vs Br-5-ASA 20 mg/kg, <sup>d</sup>vs Br-5-ASA 50 mg/kg, <sup>e</sup>vs Br-5-ASA 100 mg/kg, <sup>f</sup>vs Br-5-ASA 150 mg/kg, <sup>g</sup>vs Br-5-ASA 250 mg/kg, <sup>h</sup>vs 1h, <sup>i</sup>vs 3h, <sup>j</sup>vs 5h, <sup>k</sup>vs 7h; n=5.

### 7.3.5 Determinación de la DE<sub>50</sub> de FBZ

Antes de llevar a cabo la evaluación de los diferentes compuestos, se evaluó el control positivo (FBZ) a dos diferentes dosis (50 y 100 mg/kg, vía i.g.). Se empleó el modelo de AFC para la inducción de la inflamación, inoculando éste el día 0 y 14 del experimento en la pata derecha trasera. FBZ fue administrado a partir del día 7 hasta el día 28, con el objetivo de determinar la dosis a ocupar en el estudio final. Se observó que la dosis de 100 mg/kg presentó el mejor efecto antiinflamatorio y ambas dosis mostraron actividad a partir del día 15 al 28 (Figura 29, Tabla 13).



**Figura 29.** Actividad antiartrítica de FBZ sobre el edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos.

Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ );  $n=10$ .

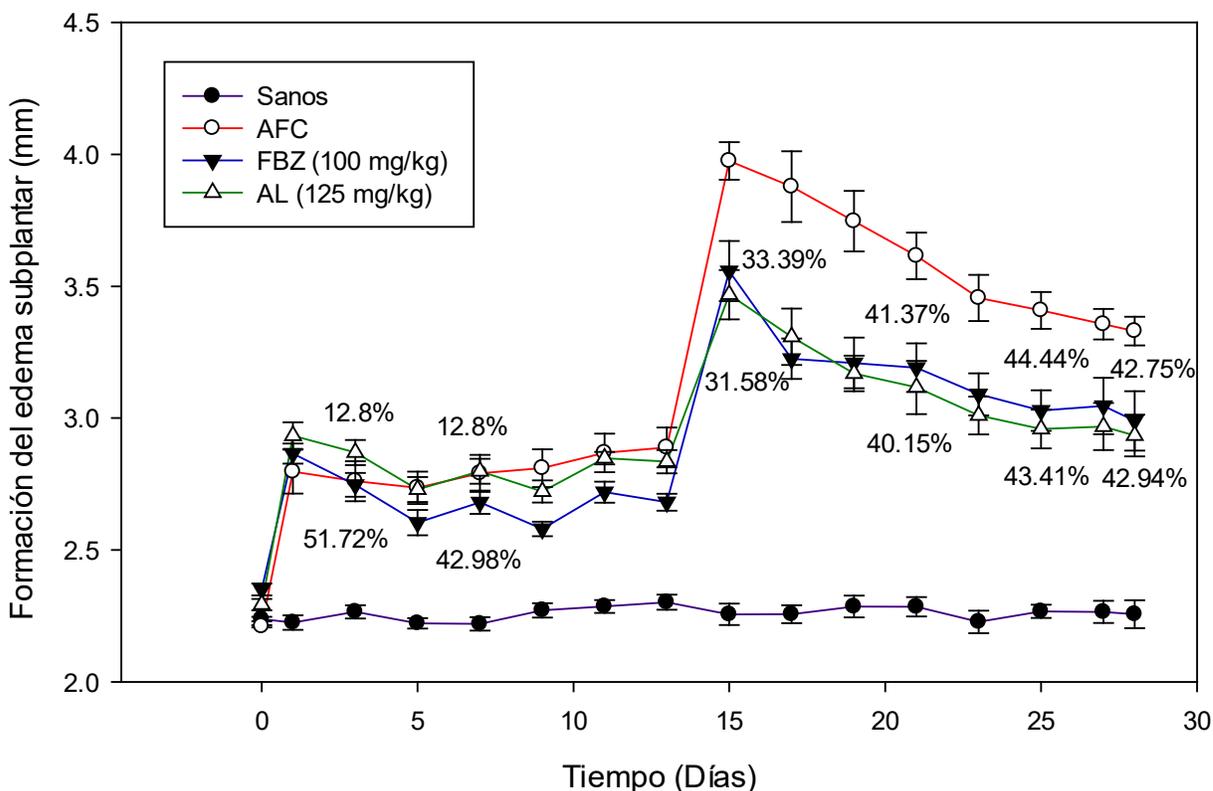
**Tabla 13.** Actividad antiinflamatoria de FBZ sobre el edema suplantar crónico inducido con AFC en ratones Balb/c machos.

Tratamiento	Días de medición					
	T15	T17	T19	T21	T25	T28
AFC	1.76 $\pm$ 0.02	1.67 $\pm$ 0.13	1.54 $\pm$ 0.11	1.40 $\pm$ 0.09	1.20 $\pm$ 0.07	1.12 $\pm$ 0.05
FBZ (50 mg/kg)	1.43 $\pm$ 0.10 (18.71%)	1.05 $\pm$ 0.11 (36.8%)	1.06 $\pm$ 0.08 (30.89%)	0.99 $\pm$ 0.1 (29.32%)	0.85 $\pm$ 0.1 (28.83%)	0.77 $\pm$ 0.08 (31.28%)
FBZ (100 mg/kg)	1.21 $\pm$ 0.14 (31.41%)	0.83 $\pm$ 0.11 (50.13%)	0.84 $\pm$ 0.1 (45.64%)	0.85 $\pm$ 0.11 (44.68%)	0.66 $\pm$ 0.11 (44.44%)	0.63 $\pm$ 0.11 (43.99%)

A partir de los resultados obtenidos se decidió utilizar la dosis de 100 mg/kg de FBZ para la evaluación de la actividad antiartrítica de AL y Br-5-ASA.

### 7.3.6 Evaluación antiartrítica del AL

En este modelo se empleó el AFC para la inducción de inflamación y FBZ (100 mg/kg) como fármaco de referencia. El AFC se inyectó el día 0 y 14 en la pata derecha trasera del animal y el edema se midió cada tercer día durante el experimento (28 días). La FBZ y el compuesto AL (125 mg/kg) se administraron a partir del día 7 hasta el día 28. Cabe mencionar que la dosis administrada fue la DE<sub>50</sub> obtenida en el modelo de carragenina. El efecto antiinflamatorio se calculó a partir del día 15 hasta finalizar el experimento. Se observó que la inflamación disminuyó tanto en el grupo de FBZ como en el grupo que recibió AL (Figura 30). El efecto antiinflamatorio fue muy similar en ambos grupos (FBZ y AL) hasta el día 28, observándose una disminución de alrededor del 31.58% en el día 15 y del 42 % al día 28 (Tabla 14),



**Figura 30.** Actividad antiartrítica de AL sobre el edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos.

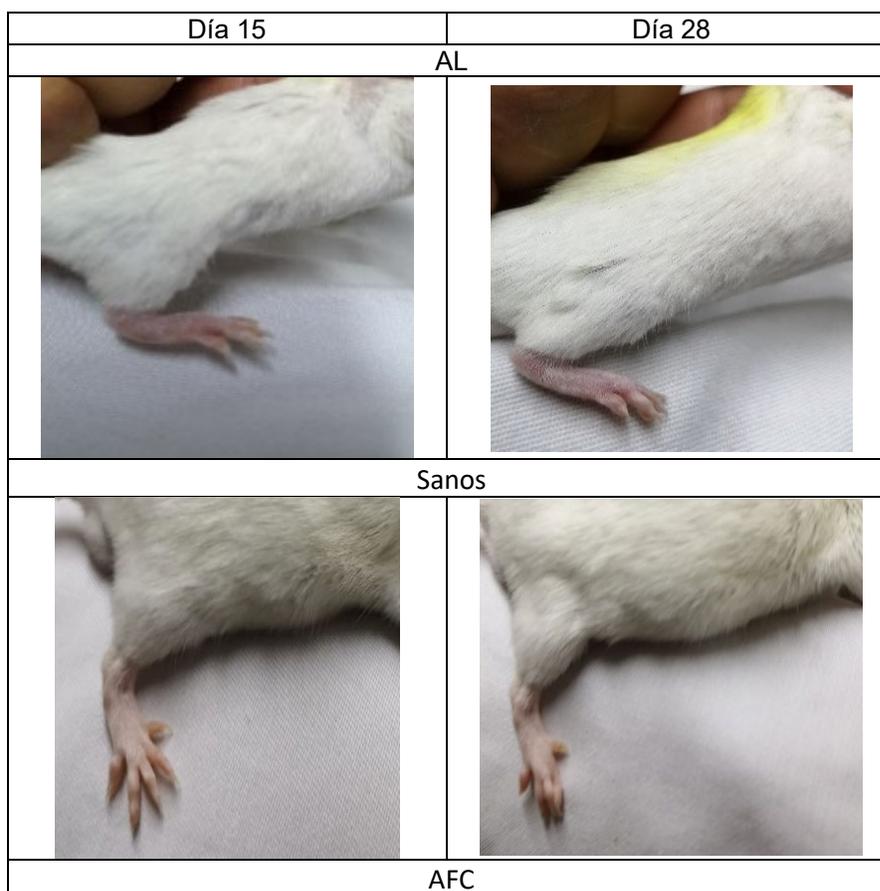
Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ );  $n=10$ .

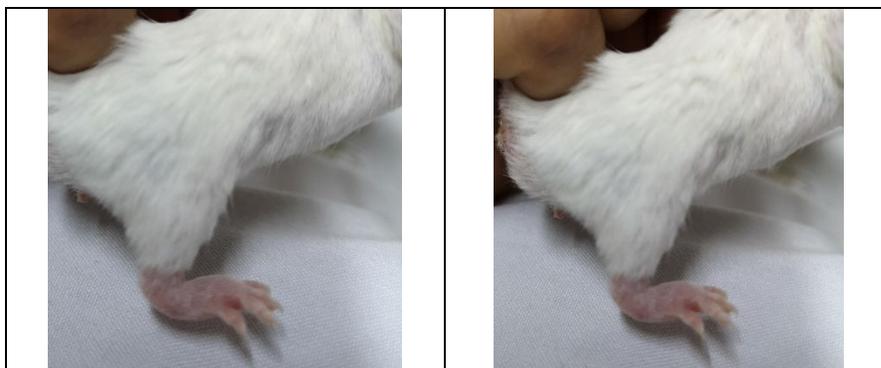
**Tabla 14.** Actividad antiinflamatoria de AL sobre el edema suplantar crónico inducido con AFC en ratones Balb/c machos.

Tratamiento	Días de medición					
	T15	T17	T19	T21	T25	T28
AFC	1.76±0.02 acdghij	1.67±0.13 acdghij	1.54±0.11 acdfhij	1.40±0.09 acdfghij	1.20±0.07 acdef	1.12±0.05 acdef
Sanos	-----bcd	----- bcd	----- bcd	----- bcd	----- bcd	----- bcd
Fenilbutazona (100 mg/kg)	1.21±0.11 (31.58%) abfjhij	0.88±0.08 (47.52%) abeij	0.86±0.09 (44.09%) abeij	0.84±0.09 (40.15%) abeij	0.68±0.07 (43.41%) abehhi	0.64±0.11 (42.94%) abefgh
AL (125 mg/kg)	1.18±0.1 (33.39%) ababfjhij	1.02±0.11 (39.08%) abeij	0.88±0.07 (42.92%) abeij	0.82±0.11 (41.38%) abeij	0.67±0.09 (44.44%) abehhi	0.64±0.09 (42.75%) abefgh

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup> vs Sanos, <sup>b</sup> vs AFC vs, <sup>c</sup> vs FBZ 100 mg/kg, <sup>d</sup> vs AL 125 mg/kg, <sup>e</sup> vs día 15 mg/kg, <sup>f</sup> vs día 17, <sup>g</sup> vs día 19, <sup>h</sup> vs día 21, <sup>i</sup> vs día 25, <sup>j</sup> vs día 28; AL, Acetato de lupeol; n=10.

El AL redujo el edema subplantar a partir de la reinoculación con AFC (día14), presentado una reducción similar al 40% en comparación con el grupo tratado con AFC (Figura 31).





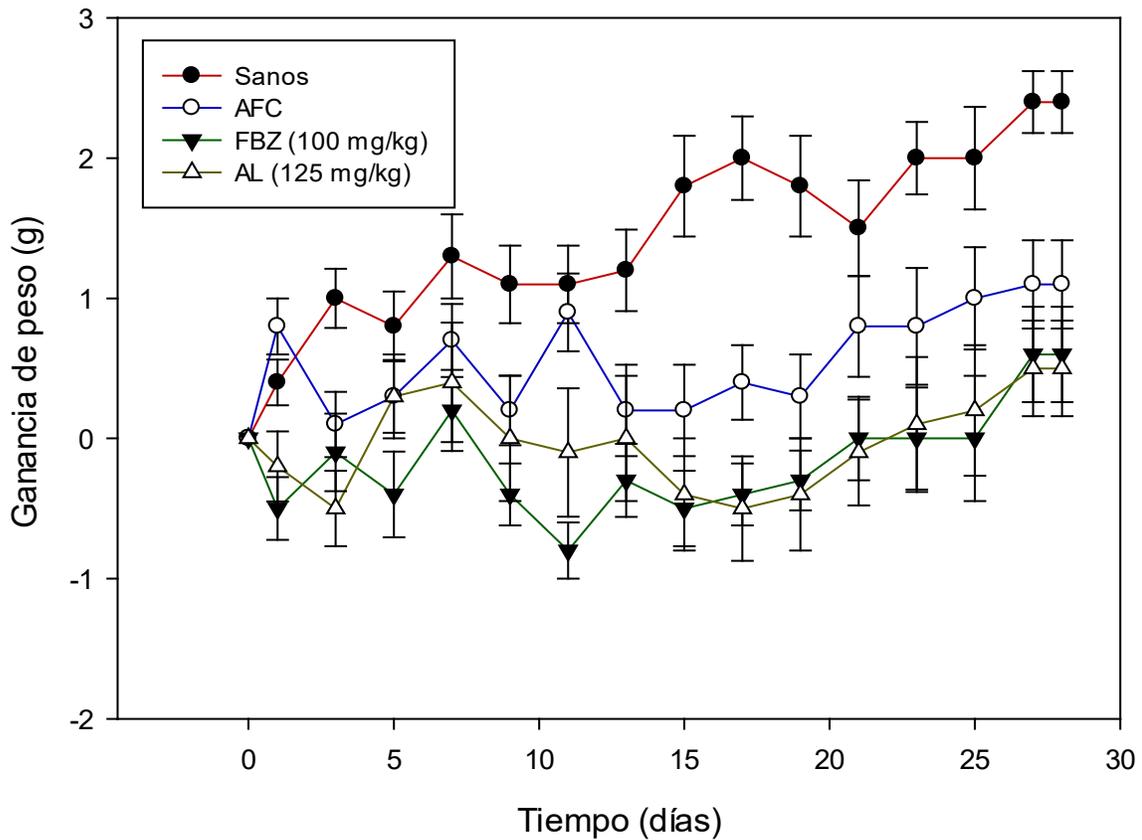
**Figura 30.** Reducción del edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos tratados con AL.

### 7.3.6.1 Ganancia de peso de ratones con AFC y tratados con AL

El peso corporal es otro parámetro que se mide de manera indirecta en el desarrollo de un proceso inflamatorio crónico. A partir de ello se observó que los ratones sanos durante el transcurso del experimento (28 días) presentaron aumento constante de peso, donde el día 15 del experimento presentaron un aumento de 1.8 g respecto al día basal (día 0), mientras que el día 28 presentaron la ganancia máxima (2.4 g). Por otro lado, los tratamientos FBZ (100 mg/kg) y AL (125 mg/kg) provocaron una disminución de la ganancia de peso corporal durante la mayor parte del experimento, el día 15 presentaron ligera pérdida de peso, siendo -0.5 y -0.4 g respecto al día 0; sin embargo, la última medición realizada el día 28 se observó que los ratones tratados con AL y FBZ mostraron ligera ganancia de peso respecto al día 0 siendo de 0.5 y 0.6 g, respectivamente (Figura 32). Cabe señalar que la ganancia de peso de los animales que recibieron AL fue menor que el control sano (0.5 g vs 2.4 g) y similar al del control positivo (FBZ, 0.6 g) Tabla 15.

**Tabla 15.** Ganancia de peso de animales tratados con AL (125 mg/kg)

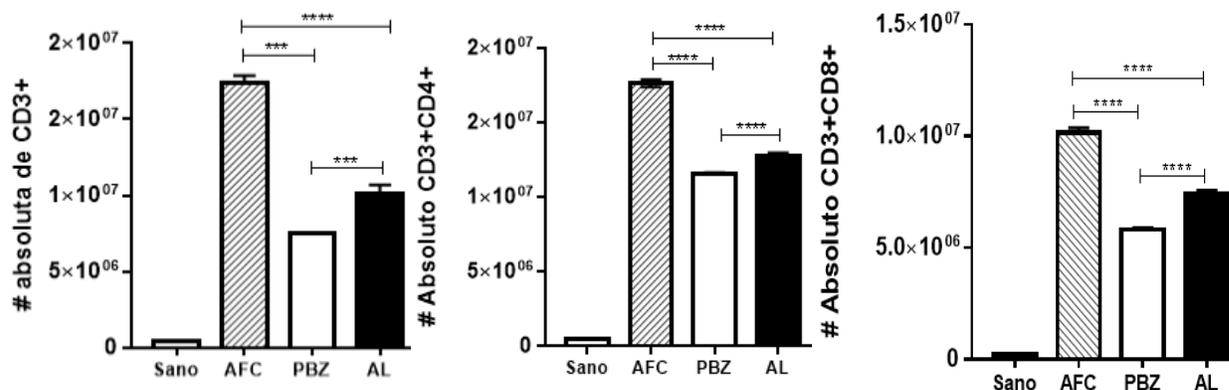
Tratamiento	Ganancia de peso (g) por día						
	1	7	11	15	21	25	28
Sanos	0.4	1.3	1.1	1.8	1.8	2	2.4
AFC	0.8	0.7	0.9	0.2	0.8	1	1.1
FBZ (100 mg/kg)	-0.5	0.2	-0.8	-0.5	0	0	0.6
AL (125 mg/kg)	-0.2	0.4	-0.1	-0.4	-0.1	0.2	0.5



**Figura 32.** Ganancia de peso (g) de AL en modelo de artritis inducido con AFC en ratones Balb/C machos.

### 7.3.6.2 Cuantificación de linfocitos en ganglios poplíteos de ratones tratados con AL

Se determinó el porcentaje de linfocitos CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, así como el número de células absolutas presentes en los tratamientos evaluados sobre la actividad antiartrítica. En la Figura 30 se puede observar que el número total de linfocitos CD3<sup>+</sup> del grupo AR fue mayor que los grupos tratados con AL (125 mg/kg) y FBZ (100 mg/kg). Por otro lado, también se presenta la relación de linfocitos CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figura 33), presentes en el tejido evaluado (ganglio poplíteo) donde se puede observar que el tratamiento de FBZ presentó la menor relación de linfocitos en comparación con el control negativo (AR) y AL (125 mg/kg).



**Figura 33.** Numero de linfocitos absolutos presentes en tejido tratado con AL en modelo de artritis inducido con AFC.

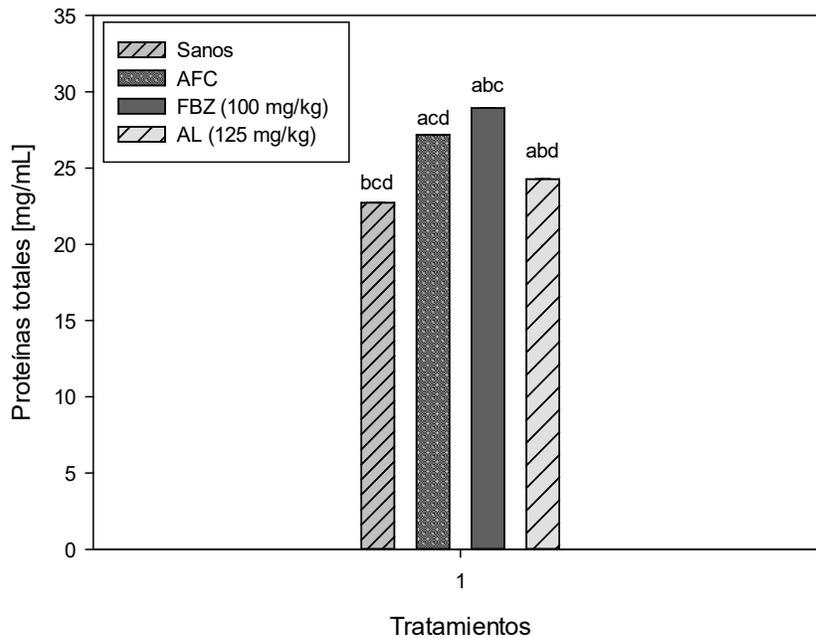
### 7.3.6.3 Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con AL

La concentración de proteínas totales fue calculada a partir de la ecuación de línea recta ( $y = 0.001x + 0.0017$ ,  $r^2 = 0.9635$ ) obtenida a partir de la curva patrón con estándar BSA, los resultados fueron expresados en  $\mu\text{g/mL}$  de proteína presentes en la muestra, donde el grupo de AFC presentó una mayor concentración de proteínas totales en comparación con el grupo tratado con AL (Tabla 16, Figura 34).

**Tabla 16.** Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con AL (modelo de artritis inducido con AFC).

Tratamiento	[mg/mL]
Sanos	$22.73 \pm 0.006^{bcd}$
AFC	$27.18 \pm 0.004^{acd}$
FBZ (100 mg/kg)	$28.93 \pm 0.008^{abc}$
AL (125 mg/kg)	$24.28 \pm 0.012^{abd}$

\*Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs AL 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg,  $n = 4$



**Figura 34.** Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con AL en modelo de artritis inducido con AFC

\*Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs AL 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg, n=4

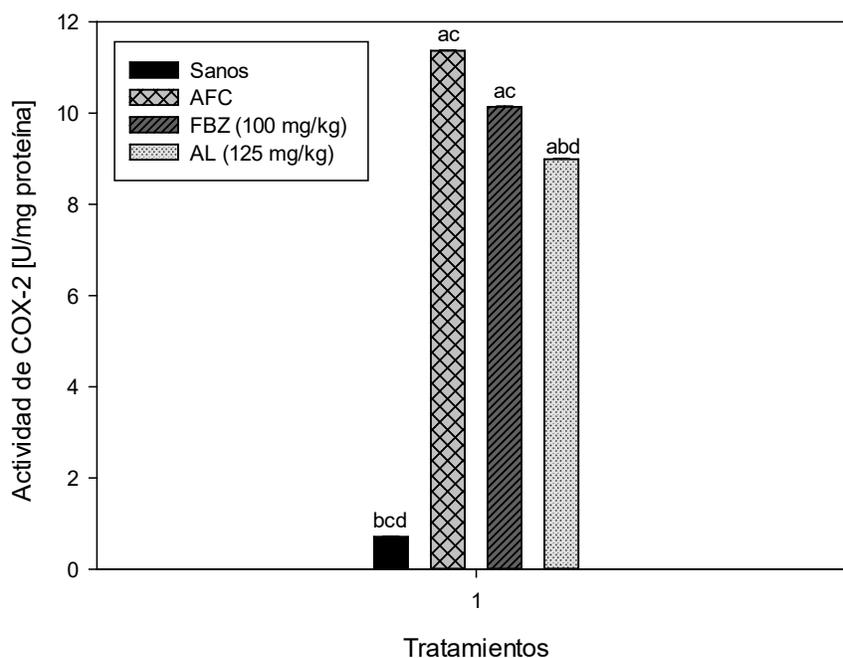
#### 7.3.6.4 AL como inhibidor de enzima COX-2

Mediante la inhibición selectiva de la enzima de COX-2, se pudo observar que AL (125 mg/kg) presentó una disminución significativa de COX-2 en ganglio poplíteo respecto al grupo de animales con AFC, siendo este valor más bajo que el mostrado por el fármaco de referencia (FBZ, 100 mg/kg) como se observa en la Figura 35 y Tabla 17. Las concentraciones de COX-2 presentadas en los diferentes tratamientos fueron expresados en (U/mg proteína) y fueron calculados a partir de la ecuación lineal ( $y=839.36x + 150.85$ ,  $R^2= 0.977$ ) de su respectiva curva patrón.

**Tabla 17.** Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con AL (modelo de artritis inducido con AFC).

Tratamiento	[U/mg proteína]
Sanos	0.71± 0.013 <sup>bcd</sup>
AFC	11.37± 0.012 <sup>ac</sup>
AL (125 mg/kg)	8.99± 0.019 <sup>abd</sup>
FBZ (100 mg/kg)	10.14± 0.030 <sup>ac</sup>

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs AL 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg, n=4



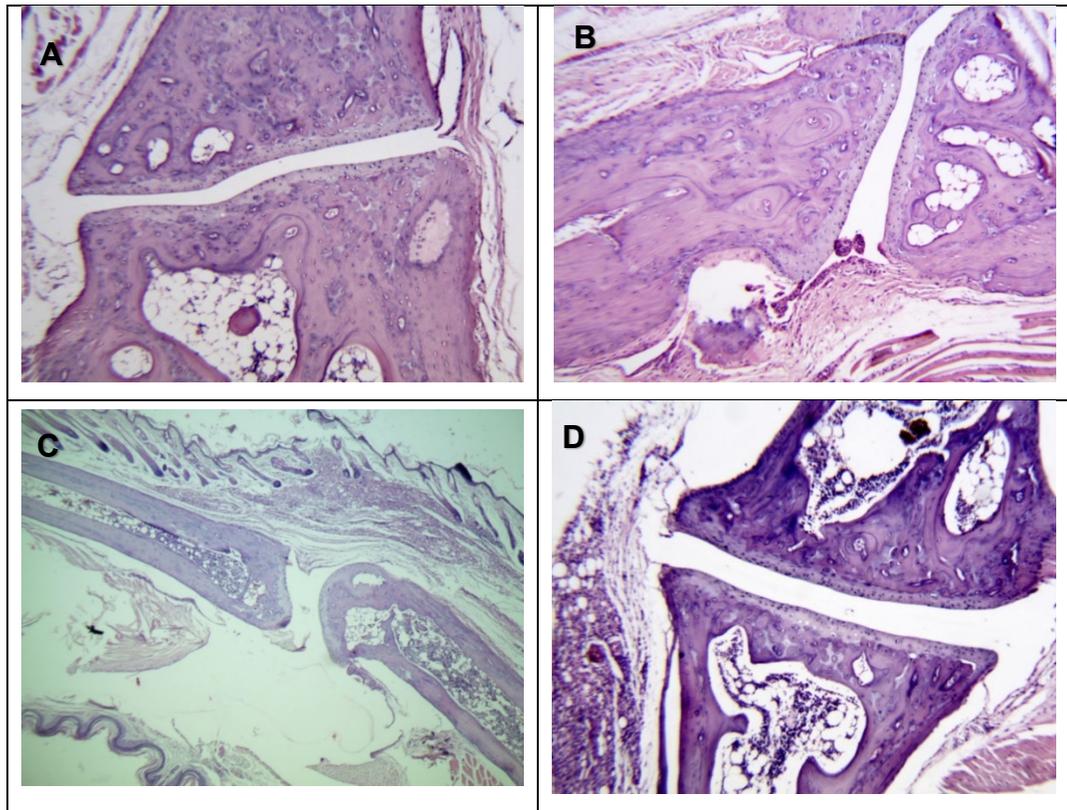
**Figura 35.** Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con AL en modelo de artritis inducido con AFC.

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs AL 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg, n=4

### 7.3.6.5 Análisis histológico de animales tratados con AL

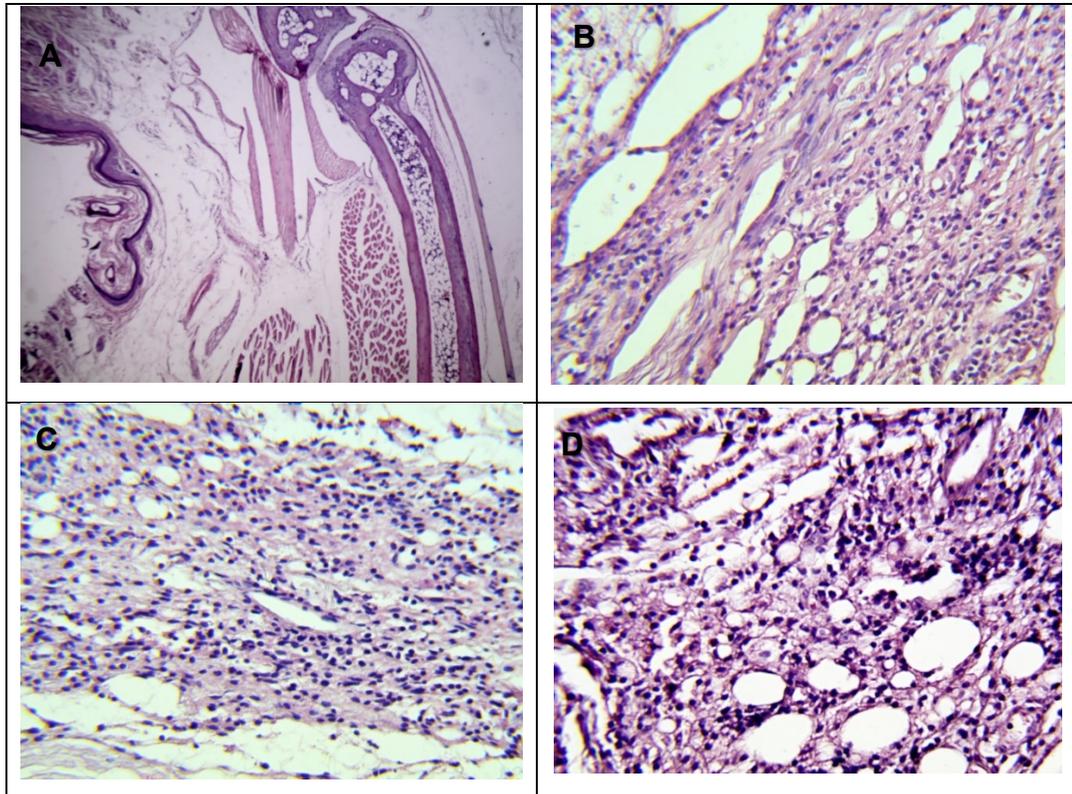
Por último, al finalizar los diferentes tratamientos se realizó el análisis histológico de articulaciones, hígado y ganglios poplíteos de los animales, con el objetivo de determinar las alteraciones o anomalías estructurales a nivel microscópicas sobre la arquitectura de las células. El análisis histológico de las articulaciones y el tejido blando de los animales sanos no presentó ningún tipo de alteración; sin embargo, el grupo que recibió AFC mostró hiperplasia sinovial en la articulación, así como un aumento en el tamaño del tejido blando

ocasionado por el proceso inflamatorio inducido. Los tratamientos no mostraron ninguna alteración sobre la articulación de la pata ni en la membrana sinovial, pero sí se observó un aumento notable de tamaño en el tejido blando en comparación con el grupo sano (Figura 36).



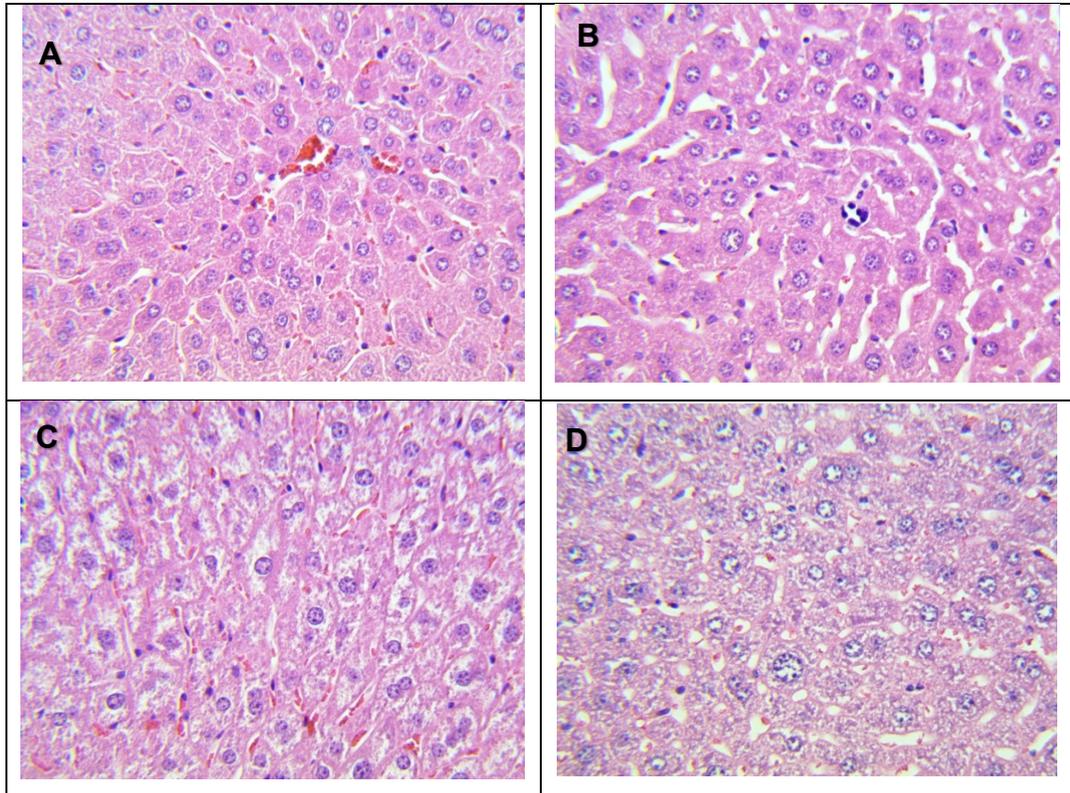
**Figura 36.** Análisis histológico de la articulación de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.

En relación al tejido blando, los ratones sanos no mostraron la presencia de neutrófilos al no existir un proceso de inflamación crónica, sin embargo, el grupo de AFC presentó un notable aumento de infiltración leucocitaria producto del edema generado, los animales tratados con FBZ mostraron una disminución de esta infiltración, al igual que el grupo tratado con AL en comparación con AFC (Figura 37).



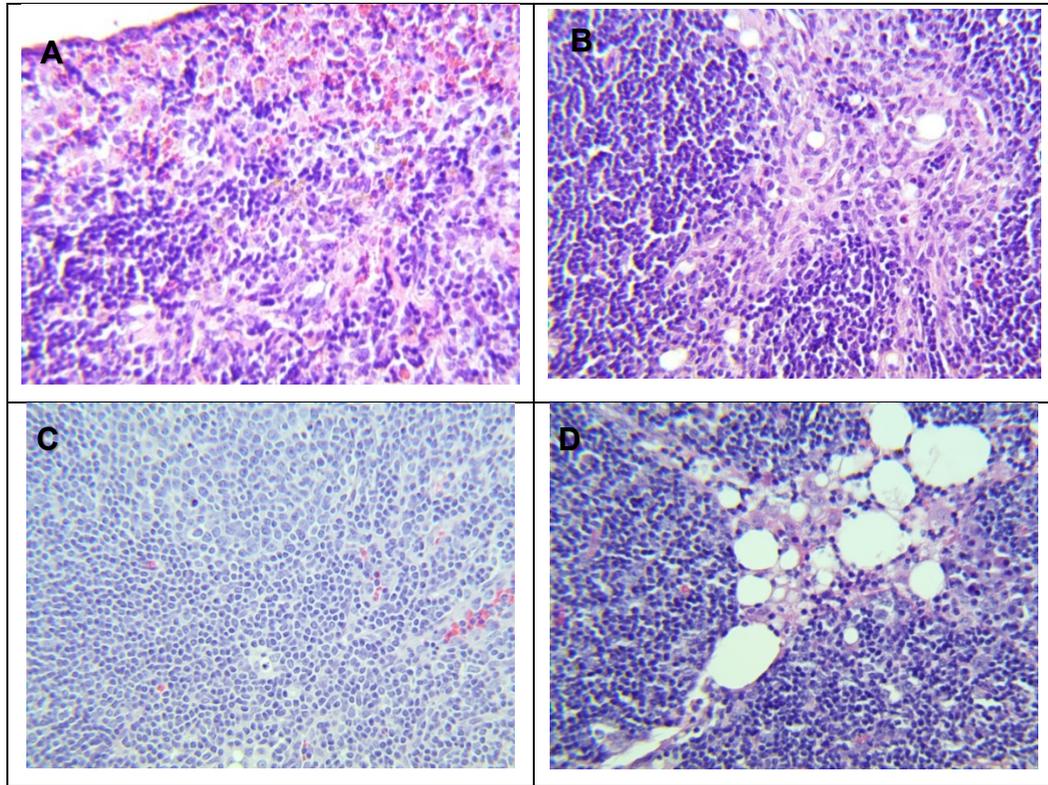
**Figura 37.** Análisis histológico del tejido blando de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.

Situación similar se observó en el análisis histológico del hígado, donde el grupo sano no presentó alteración alguna sobre las células hepáticas, mientras que el grupo AFC mostró microabscesos y mínima hematopoyesis, por el contrario, el control positivo (FBZ) no mostró alteraciones en las células hepáticas, pero si muestra esteatosis, y el AL no mostró ninguna alteración al igual que el grupo sano (Figura 38).



**Figura 38.** Análisis histológico del hígado de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo de inflamación crónica inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.

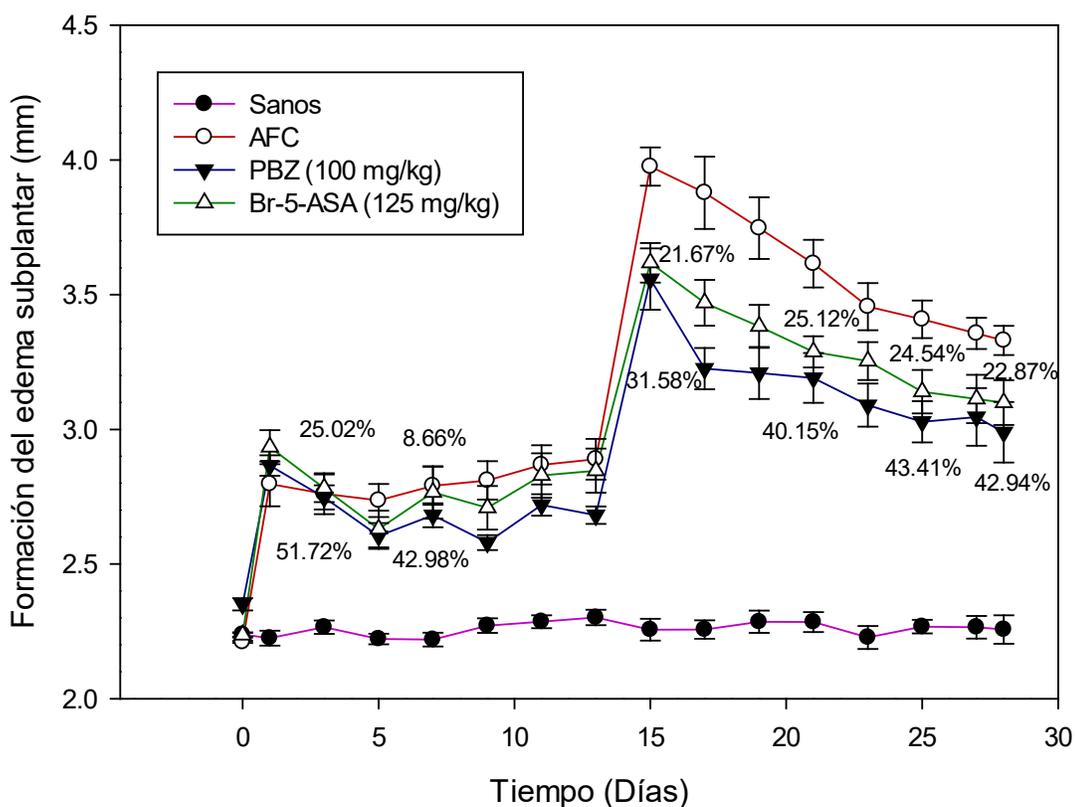
El análisis histológico de ganglios poplíteos de animales sanos no presentó ningún cambio, sin embargo, el grupo AFC presentó hiperplasia sinovial (infiltrado de células en el tejido sinovial), al igual que FBZ (fármaco de referencia), por otro lado, el tratamiento con AL mostró una ligera infiltración leucocitaria (Figura 39).



**Figura 39.** Análisis histológico de ganglios poplíteos de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con AL (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg).

### 7.3.7 Evaluación antiartrítica de Br-5-ASA

Empleando este mismo modelo, se observó que el compuesto Br-5-ASA (125 mg/kg) disminuye la inflamación a partir del día 15 al 21. En este caso el porcentaje de inhibición fue ligeramente menor que la FBZ. Al día 15 se observó una disminución de 21.67 % vs 31.58% (FBZ) y al día 21 el porcentaje de inhibición fue de 25.12 (Br-5-ASA) y para la FBZ fue de 40.15, tendencia que se observó hasta el día 25 y, al día 28 la inhibición fue del 22.87% para el Br-5-ASA y de 42.94% para FBZ (Figura 40 y Tabla 18).



**Figura 40.** Actividad antiartrítica de Br-5-ASA sobre el edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos.

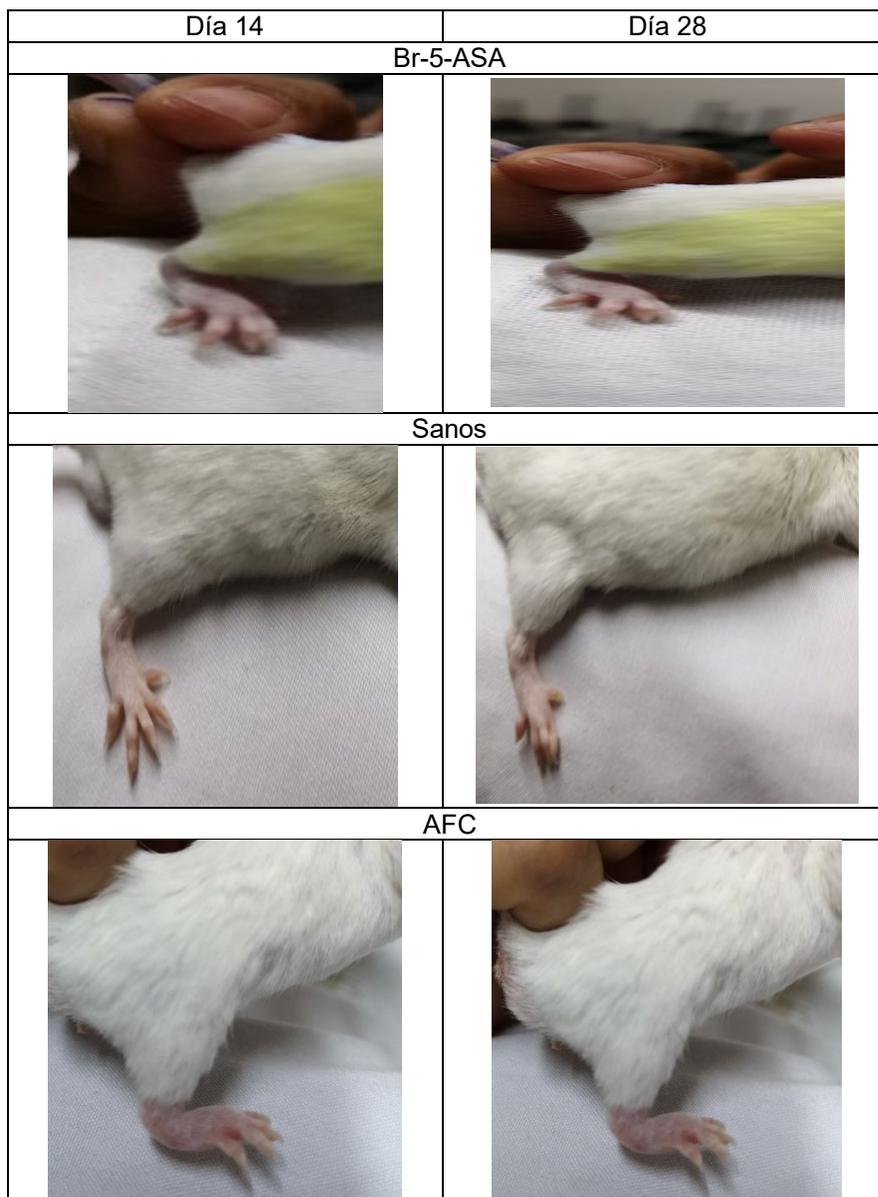
Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ );  $n=10$ .

**Tabla 18.** Actividad antiinflamatoria y porcentaje de inhibición del Br-5-ASA sobre el edema crónico inducido con AFC en ratones Balb/c machos.

Tratamiento	Días de medición					
	T15	T17	T19	T21	T25	T28
AFC	1.76 $\pm$ 0.02 acdghij	1.67 $\pm$ 0.13 acdghij	1.54 $\pm$ 0.11 acdfhij	1.40 $\pm$ 0.09 acdfghij	1.20 $\pm$ 0.07 acdef	1.12 $\pm$ 0.05 acdef
Sanos	----- bcd	----- bcd	----- bcd	----- bcd	----- bcd	----- bcd
Fenilbutazona (100 mg/kg)	1.21 $\pm$ 0.11 (31.58%) abfjhij	0.88 $\pm$ 0.08 (47.52%) abeij	0.86 $\pm$ 0.09 (44.09%) abeij	0.84 $\pm$ 0.09 (40.15%) abeij	0.68 $\pm$ 0.07 (43.41%) abeihhi	0.64 $\pm$ 0.11 (42.94%) abefgh
Br-5-ASA (125 mg/kg)	1.38 $\pm$ 0.07 (21.67%) ababfjhij	1.23 $\pm$ 0.09 (26.01%) abeij	1.15 $\pm$ 0.08 (25.38%) abeij	1.05 $\pm$ 0.06 (25.12%) abeij	0.9 $\pm$ 0.09 (24.54%) abeihhi	0.86 $\pm$ 0.09 (22.87%) abefgh

\*Cada grupo está representado como la media  $\pm$  e.e. Análisis estadístico ANOVA Bifactorial, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs FBZ 100 mg/kg, <sup>d</sup>vs Br-5-ASA 125 mg/kg, <sup>e</sup>vs día 15 mg/kg, <sup>f</sup>vs día 17, <sup>g</sup>vs día 19, <sup>h</sup>vs día 21, <sup>i</sup>vs día 25, <sup>j</sup>vs día 28,  $n=10$ .

El Br-5-ASA mostró una reducción del edema del 22% respecto al grupo que recibió AFC a partir del día posterior a la reinoculación (Figura 41).



**Figura 41.** Reducción del edema suplantar inducido con AFC en ratones Balb/C machos tratados con Br-5-ASA.

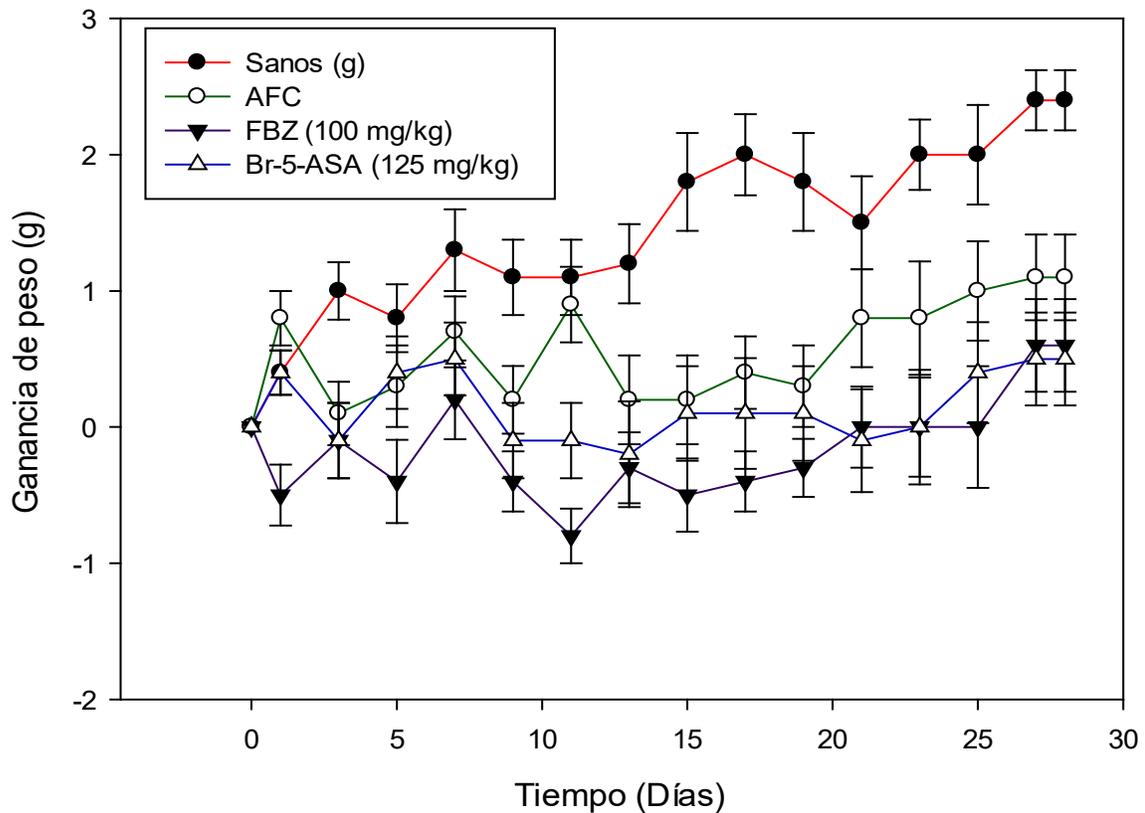
### 7.3.7.1 Ganancia de peso de ratones tratados con Br-5-ASA

El comportamiento en relación a la ganancia de peso se observó que los ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg) mostraron un comportamiento similar al AL (125 mg/kg), donde los ratones sanos durante el transcurso del experimento (28 días) presentaron aumento

constante. al día 15 del experimento presentaron un aumento de 1.8 g en comparación con el día basal (día 0), mientras que el día 28 presentaron la ganancia máxima (2.4 g). Por otro lado, los tratamientos con FBZ (100 mg/kg) y Br-5-ASA (125 mg/kg) mostraron disminución de su peso corporal durante la mayor parte del experimento, el día 15 presentaron -0.5 y -0.2 g de pérdida de peso, respectivamente en comparación con el día 0; sin embargo, la última medición realizada mostró que los ratones tratados con Br-5-ASA (0.5 g) y FBZ (0.6 g) presentaron diferencia de pesos similares al día 1 (0.4 y -0.5 g), respectivamente (Figura 42 y Tabla 19).

**Tabla 19.** Ganancia de peso de animales tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg).

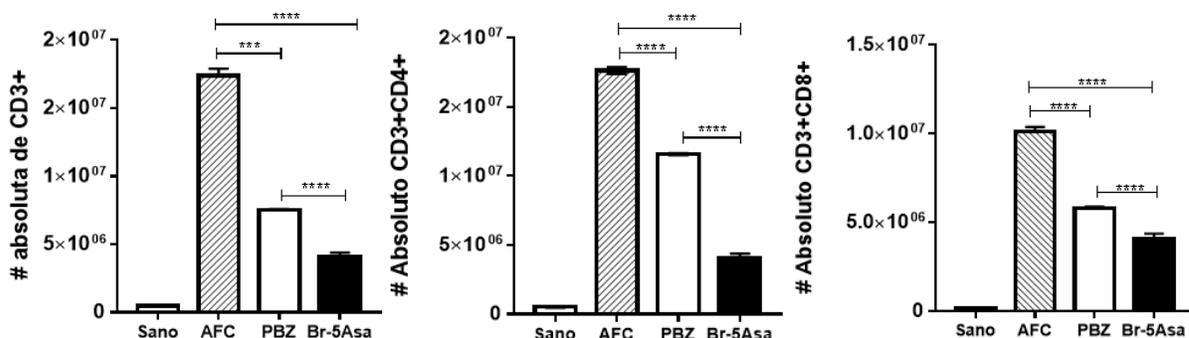
Tratamiento	Ganancia de peso (g) por día						
	1	7	11	15	21	25	28
Sanos	0.4	1.3	1.1	1.8	1.8	2	2.4
AFC	0.8	0.7	0.9	0.2	0.8	1	1.1
FBZ (100 mg/kg)	-0.5	0.2	-0.8	-0.5	0	0	0.6
Br-5-ASA (125 mg/kg)	0.4	0.5	-0.1	0.1	0.1	0.4	0.5



**Figura 42.** Ganancia de peso de Br-5-ASA en modelo de artritis inducido con AFC en ratones Balb/C machos.

### 7.3.7.2 Cuantificación linfocitos en ratones tratados con Br-5-ASA

De la misma manera se determinó el número de células absolutas presentes en el tratamiento con Br-5-ASA evaluado sobre la actividad antiartrítica. Los resultados mostraron que el total de linfocitos CD3<sup>+</sup> del grupo AR fue mayor que los grupos tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg) y FBZ (100 mg/kg); sin embargo, Br-5-ASA fue el tratamiento que presentó el menor número de linfocitos CD3<sup>+</sup> en el tejido. Por otro lado, también se muestra la relación de linfocitos CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> y CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Figura 43), presentes en los ganglios poplíteos donde se puede observar un comportamiento similar al número de linfocitos totales CD3<sup>+</sup>, donde el tratamiento de Br-5-ASA mostró la menor relación de linfocitos en comparación con el control negativo (AR) y FBZ (100 mg/kg).



**Figura 43.** Numero de linfocitos absolutos presentes en ganglio poplíteo. tratado con Br-5-ASA en modelo de artritis inducido con AFC.

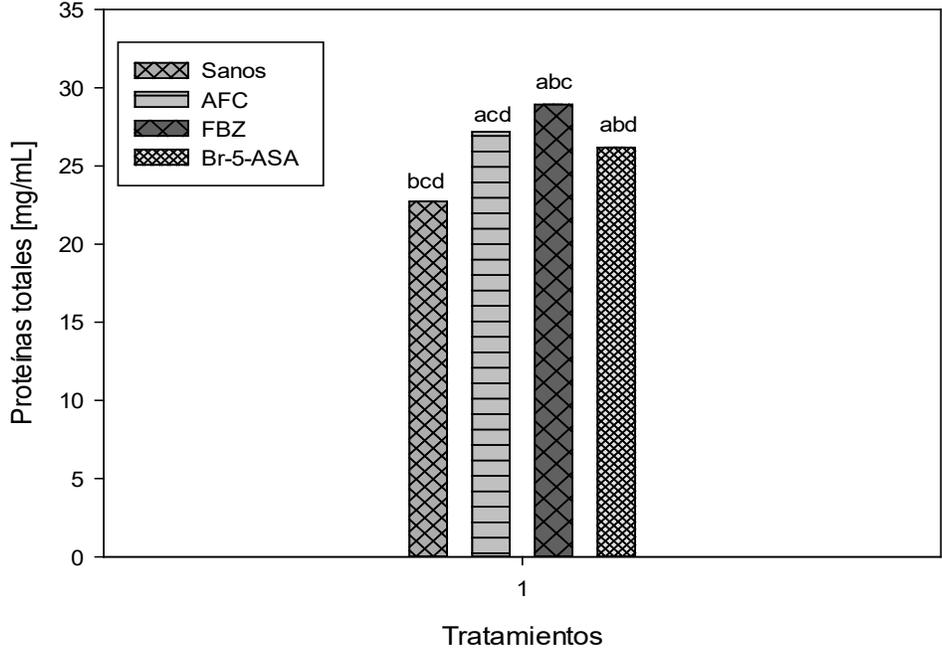
### 7.3.7.3 Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA.

La concentración de proteínas totales fue calculada a partir de la ecuación de línea recta ( $y = 0.001x + 0.0017$ ,  $r^2 = 0.9635$ ) obtenida a partir de la curva patrón con estándar BSA, los resultados fueron expresados en mg/mL de proteína presentes en la muestra, donde el grupo de AFC presentó una mayor concentración de proteínas totales en comparación con el grupo tratado con Br-5-ASA (Tabla 20, Figura 44).

**Tabla 20.** Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA (modelo de artritis inducido con AFC).

Tratamiento	[mg/mL]
Sanos	22.73 ± 0.006 <sup>bcd</sup>
AFC	27.18 ± 0.004 <sup>acd</sup>
FBZ (100 mg/kg)	28.93 ± 0.008 <sup>abc</sup>
Br-5-ASA (125 mg/kg)	26.18 ± 0.012 <sup>abd</sup>

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs AL 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg, n=4



**Figura 44.** Concentración de proteínas totales en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA en modelo de artritis inducido con AFC.

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs Br-5-ASA 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg, n=4

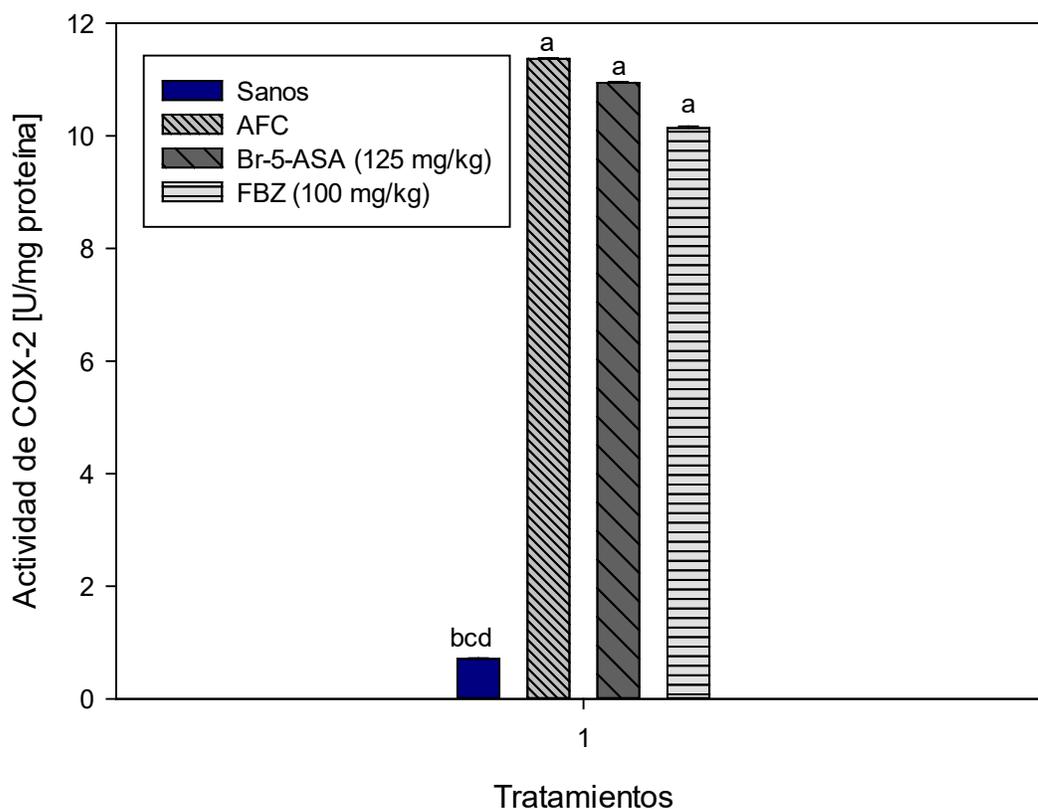
**7.3.7.4 Br-5-ASA como inhibidor de enzima COX-2**

El derivado sintético Br-5-ASA (125 mg/kg) mostró actividad similar que el fármaco de referencia (FBZ, 100 mg/kg) sobre COX-2; sin embargo, la inhibición sobre esta enzima no fue significativa respecto al grupo de AFC como se observa en la Figura 44. La concentración de COX-2 presente en los tratamientos se puede observar en la Tabla 21. Las concentraciones de COX-2 observadas con los diferentes tratamientos fueron expresadas en (U/mg proteína) y fueron calculadas a partir de la ecuación lineal ( $y=839.36x + 150.85$ ,  $R^2= 0.977$ ) con su respectiva curva patrón.

**Tabla 21.** Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA (modelo de artritis inducido con AFC).

Tratamiento	[U/mg proteína]
Sanos	0.71± 0.013 <sup>bcd</sup>
AFC	11.37± 0.012 <sup>ac</sup>
Br-5-ASA (125 mg/kg)	10.94± 0.019 <sup>abd</sup>
FBZ (100 mg/kg)	10.14± 0.030 <sup>ac</sup>

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs Br-5-ASA 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg, n=4

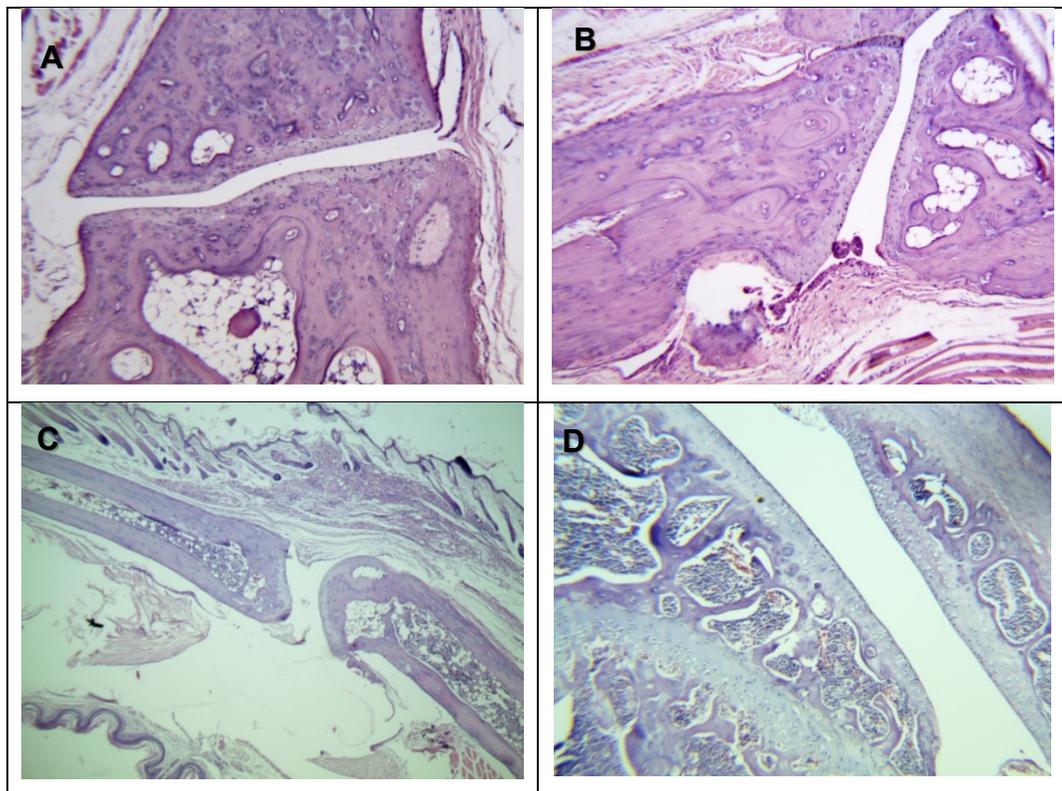


**Figura 45.** Cuantificación de COX-2 en ganglios poplíteos de animales tratados con Br-5-ASA (modelo de artritis inducido con AFC).

\*Cada grupo está representado como la media ± e.e. Análisis estadístico ANOVA una vía, prueba post hoc SNK ( $p \leq 0.05$ ); <sup>a</sup>vs Sanos, <sup>b</sup>vs AFC, <sup>c</sup>vs Br-5-ASA 125 mg/kg, <sup>d</sup>vs FBZ 100 mg/kg, n=4

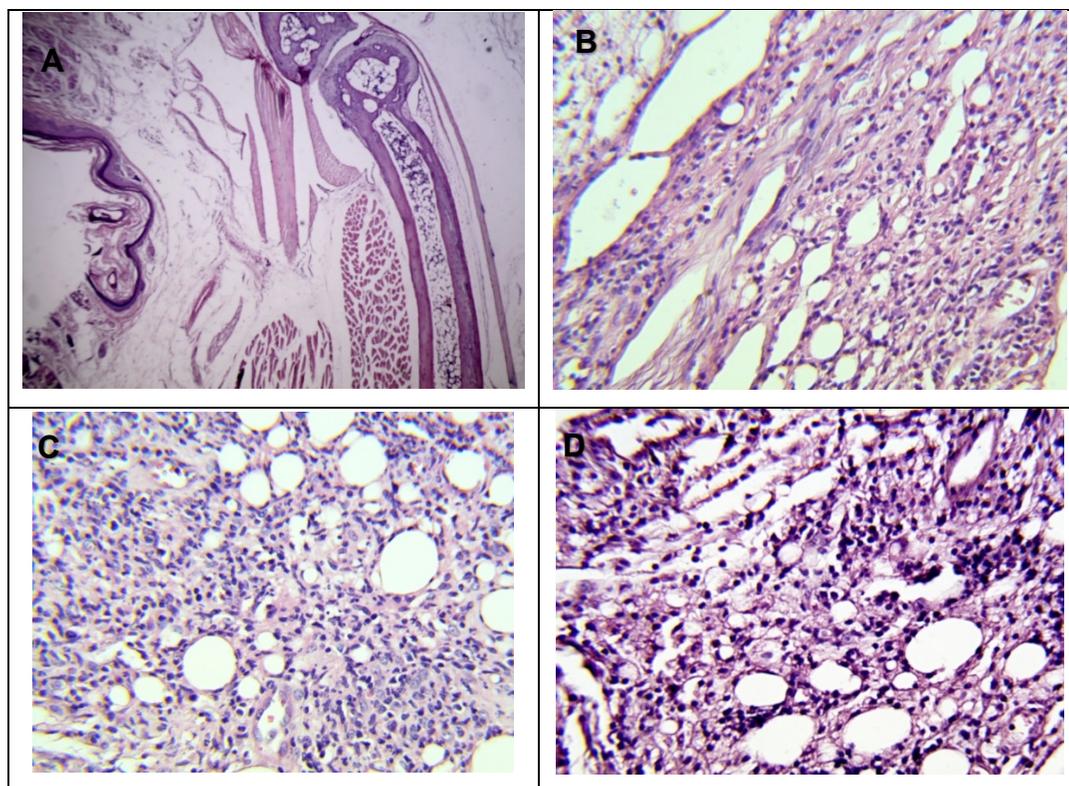
### 7.3.7.5 Análisis histológico de animales tratados con Br-5-ASA

En relación a la histología de articulaciones, hígado y ganglios poplíteos de los animales tratados con Br-5-ASA de igual manera se buscó conocer algún tipo de anomalía estructural microscópica de la célula, el análisis histológico de los tratamientos sobre articulaciones y el tejido blando de los animales sanos no presentó ningún tipo de alteración, los animales inoculados sólo con AFC mostraron hiperplasia sinovial en la articulación así como un aumento en el tamaño del tejido blando ocasionado por el proceso inflamatorio inducido, en cambio los tratamientos (FBZ, Br-5-ASA) no mostraron ninguna alteración sobre la articulación de la pata ni en la membrana sinovial, pero si se observó un aumento notable de tamaño en el tejido blando en comparación con el grupo sano (Figura 46).



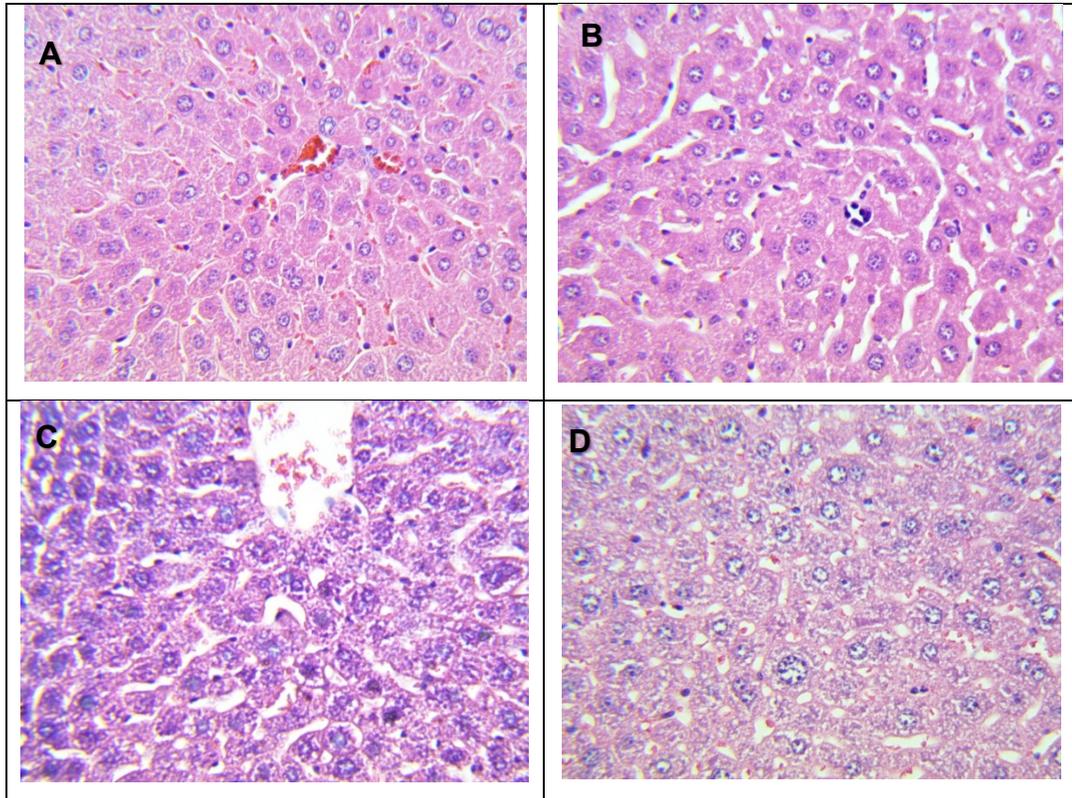
**Figura 46.** Análisis histológico de la articulación de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.

El análisis histológico correspondiente al tejido blando en ratones sanos no mostró la presencia de inflamación crónica, sin embargo, el grupo de AFC presentó un notable aumento de infiltración leucocitaria producto del edema generado, los animales tratados con FBZ mostraron una disminución de esta infiltración, al igual que el grupo tratado con Br-5-ASA (Figura 47).



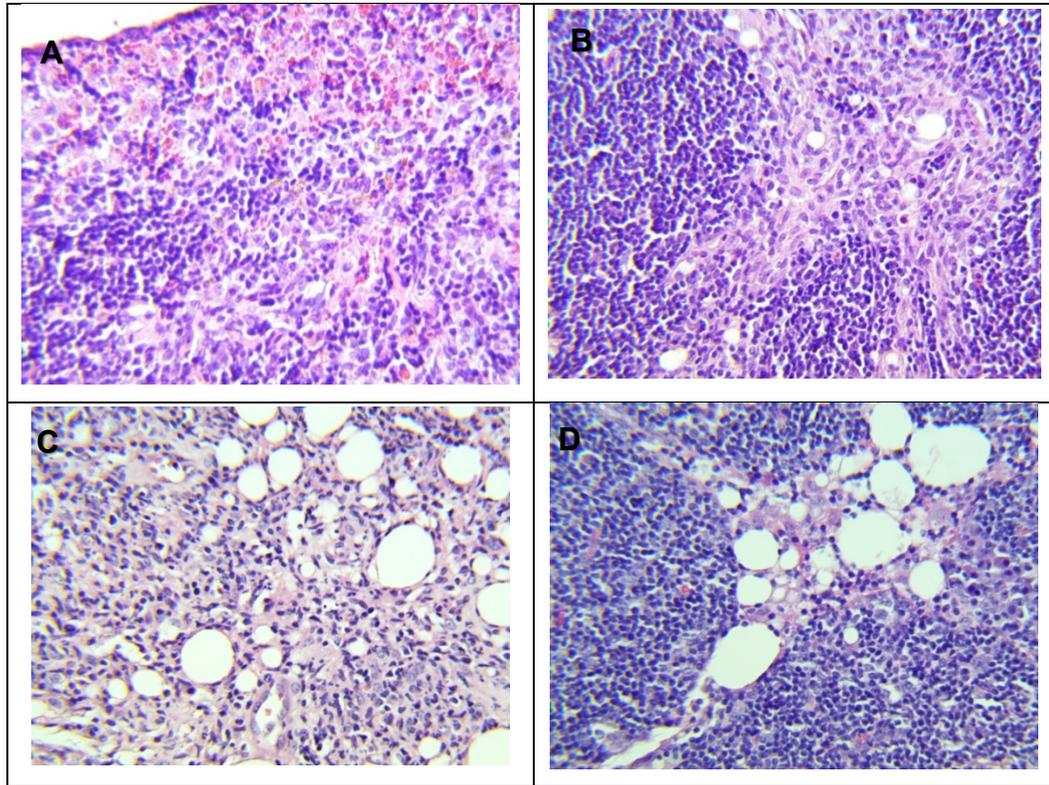
**Figura 47.** Análisis histológico del tejido blando de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) ratones con AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.

En el análisis histológico del hígado, se observó que el grupo sano no presentó alteración alguna sobre las células hepáticas, caso contrario al grupo tratado con AFC el cual presentó microabscesos y mínima hematopoyesis, por el contrario, el control positivo (FBZ) no mostró alteraciones en las células hepáticas pero una ligera generación de esteatosis, y el Br-5-ASA presentó microabscesos aislados y esteatosis ligera (Figura 48).



**Figura 48.** Análisis histológico del hígado de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.

El análisis histológico de ganglios poplíteos de animales sanos no presentó ningún cambio, sin embargo, el grupo AFC mostró hiperplasia sinovial (infiltrado de células en el tejido sinovial), al igual que FBZ (fármaco de referencia) y el tratamiento Br-5-ASA, se observó una reducción en la infiltración leucocitaria de la membrana sinovial (Figura 49).



**Figura 49.** Análisis histológico de ganglios poplíteos de ratones Balb/C administrados vía intragástrica con AL en modelo crónico inducido con AFC. A) Ratones sanos; B) Control negativo AFC; C) Ratones tratados con Br-5-ASA (125 mg/kg); D) Ratones tratados con FBZ (100 mg/kg); Objetivo 40X.

## 8 DISCUSIÓN

### 8.1 Actividad antiinflamatoria tópica de AL

Akihisha et al. aisló de diversos triterpenos a partir de un extracto hexánico de *Viterellia paradoxa* (cromatografía en placas preparativas), entre ellos el AL. Este compuesto fue evaluado en el modelo de edema auricular utilizando TPA como agente inflamatorio, los autores reportan una  $DE_{50} = 0.54 \mu\text{mol/oreja}$  (100). En el caso de nuestra investigación encontramos que la  $DE_{50} = 7.10 \text{ mM/oreja}$  ( $0.91 \text{ mg/oreja}$ ) del AL (aislado del extracto hexánico de *C. tehuacanensis*). Cabe señalar que el compuesto puro resultó más activo que el extracto, el cual presentó una  $DE_{50} = 1.79 \text{ mg/oreja}$  (90).

Se ha descrito que los triterpenos inhiben la inflamación inducida con TPA, debido a la capacidad de suprimir los niveles de  $PGE_2$  de la piel; donde el AL suprime la actividad COX-2 mediante la inhibición de las proteínas cinasas, la regulación extracelular de vías de señalización como la proteína cinasa C (PKC) o mediante el bloqueo de la vía NF- $\kappa$ B. Sin embargo, también se ha reportado que el AL es capaz de reducir los niveles de iNOS ayudando a reducir el edema formado durante el proceso inflamatorio (100,101).

### 8.2 Actividad antiinflamatoria tópica de Br-5-ASA

A la fecha, sólo existe un estudio donde se reportó la actividad de este compuesto en el modelo de TPA. Cabrera-Pérez et al. reportó que el derivado Br-5-ASA presentó buen efecto antiinflamatorio en este modelo, siendo muy similar al del fármaco de referencia (Ind), ambos presentaron una  $DE_{50} = 0.46 \text{ mg/oreja}$ , ensayo realizado en ratones CD-1; así mismo, determinaron la inhibición de la MPO, en esta última prueba el Br-5-ASA presentó una  $CI_{50} = 301 \mu\text{M}$ , mientras que Ind presentó una  $CI_{50} = 122 \mu\text{M}$  (62).

Al igual que el AL, el Br-5ASA puede estar inhibiendo la actividad de la COX-2; sin embargo, en un estudio comparativo donde se evaluó el 5-ASA, describen que el efecto antiinflamatorio se debe no sólo a la inhibición de la COX-2 sino que también suprime la producción de iNOS y/o por reducción de la infiltración leucocitaria en el sitio de la lesión en un modelo de colitis en ratas (102).

El compuesto Br-5-ASA presentó efecto antiinflamatorio tópico con una  $DE_{50} = 2.15$  mg/oreja (2.17 mM/oreja) menor al observado por el fármaco de referencia (Ind,  $DE_{50} = 1.76$  mg/oreja (19.39 mM/oreja); un factor que puede afectar esta actividad es la baja solubilidad del compuesto a las dosis evaluadas (0.5, 1 y 2 mg/oreja) lo que incide en la la pobre biodisponibilidad. En un estudio previo describen que el 5-ASA, mostró baja solubilidad en solución acuosa saturada con pH 4.1, otro factor que puede influir en su actividad antiinflamatoria tópica es su liposolubilidad, ya que el Br-5-ASA posee un  $\log p = 1.255$ , mostrando una baja afinidad en tejidos grasos y de acuerdo a los resultados mostrados el Br-5-ASA a la dosis de 2 mg/oreja solo presentó un 46.48% de inhibición del edema auricular (56,62).

### **8.3 Actividad antiinflamatoria sistémica de AL**

Existen diversos reportes donde han descrito la actividad antiinflamatoria sistémica de AL en modelo murino. Lucetti et al., evaluó el AL en tres modelos *in vivo* de inflamación aguda (dextran, formalina y carragenina), donde a las dosis de 10 y 20 mg/kg el AL mostró 51 y 49% de inhibición a la 4<sup>ta</sup> hora (modelo carragenina), mientras que en los modelos de dextran y formalina presentó 50 y 61.3 % de inhibición, respectivamente; valores similares al encontrado en el modelo de carragenina (92). En estos trabajos, el AL fue administrado vía i.p.; al comparar los datos previamente reportados con lo encontrado en este trabajo podemos mencionar que, en el presente estudio, AL mostró buena actividad antiinflamatoria (modelo de carragenina); sin embargo el 50% de inhibición se logró a una dosis de 243.9 mg/kg (204.13 mM/kg) a la 5<sup>ta</sup> hora del estudio, cabe destacar que la administración del AL en este estudio se llevó a cabo por vía i.g. Esta vía de administración quizás sea un factor que altera el efecto farmacológico del AL, debido a que al metabolizarse este triterpeno genera derivados menos activos. Algunos autores han reportado una pobre biodisponibilidad del cinamato de lupeol en modelos murinos por su baja solubilidad (92,100).

Con relación al posible mecanismo de acción, se ha reportado que el AL tiene la capacidad de disminuir la producción de iNOS, lo que sugiere la participación de citoquinas proinflamatorias y el sistema NO determinado mediante análisis de inmunohistoquímica y en cultivo celular de macrófagos RAW 264.7 (92,93)

Por otro lado, se ha descrito que el mecanismo de acción de un compuesto que presenta efecto antiinflamatorio máximo a la 5<sup>ta</sup> hora (formación máxima del edema plantar) en el modelo de carragenina, el efecto se debe a la regulación de la enzima COX-2, y de acuerdo a los resultados presentados en el modelo sistémico, el AL presentó a la 5<sup>ta</sup> hora su máximo efecto antiinflamatorio a las diferentes dosis evaluadas (95,103).

#### **8.4 Actividad antiinflamatoria sistémica de Br-5-ASA**

No existen reportes previos que describan la actividad antiinflamatoria sistémica del Br-5-ASA pero sí se ha reportado el posible mecanismo de acción del 5-ASA (precursor). En un modelo de carragenina (proceso inflamatorio agudo), el 5-ASA mostró actividad similar a los AINEs mediante la inhibición de la actividad de la vía NF- $\kappa$ B, actúa modulando mediadores inflamatorios como PG<sub>2</sub> y posee efectos sobre el receptor PPAR- $\gamma$ , el cual modula la producción de citocinas proinflamatorias (57).

El efecto antiinflamatorio similar a los AINEs se puede corroborar de acuerdo a los resultados obtenidos, donde sí un compuesto presenta a la 5<sup>ta</sup> hora (formación máxima del edema plantar) su máximo efecto antiinflamatorio en el modelo de carragenina es debido principalmente a la inhibición de la enzima COX-2, comportamiento que presentó el Br-5-ASA al ser avaluado a las 5 distintas dosis (20-250 mg/kg) (95,103). Sin embargo, la reducción del proceso inflamatorio puede deberse a la capacidad de los compuestos sintetizados a partir del 5-ASA de evitar la formación de radicales libres, donde el Br-5-ASA presentó actividad antioxidante de los radicales ABTS y DPPH (21 y 16%) a una concentración de 0.012 mM (62).

#### **8.5 Actividad antiartrítica de AL**

También existen reportes sobre el efecto antiartrítico de AL en modelos murinos, Wang et al., 2016 llevó a cabo la evaluación de la AR inducida con colágeno en ratones DBA1/J, donde se evaluó el AL (50 mg/kg vía i.p.) presentando una reducción del 80% de AR en

comparación con el control negativo (grupo AR), resultado corroborado con la reducción del grosor de pata y su puntuación clínica evaluada, por otro lado, determinaron los niveles de citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 en macrófagos activados obtenidos a partir de la inmunización con colágeno, donde AL mostró una reducción significativa de estas citocinas proinflamatorias mediante un ensayo de Elisa, siendo el día 32 del estudio donde presentaron su máxima expresión. Otros resultados mostraron que AL tiene la capacidad de llevar a cabo la migración de macrófagos (RAW 264.7) así como evitar la formación y activación de osteoclastogénesis de macrófagos de manera dosis-dependiente (10-80  $\mu$ M) (91,103).

También ha sido reportado la capacidad del AL de inhibir la generación de COX-2 y MCP-1, además de las citocinas proinflamatorias mencionadas, ayudando a mejorar la inflamación en las articulaciones, hinchazón y reducción de resorción ósea. Al comparar los resultados obtenidos con los ya reportados, se puede observar que efectivamente el AL posee la capacidad de llevar a cabo la reducción del edema generado en la pata en los dos modelos (AFC vs Colágeno), este triterpeno así mismo mostró también un efecto significativo sobre la generación de la enzima COX-2 en ganglios poplíteos en comparación con el control negativo (AFC) y el fármaco de referencia (FBZ), resultados que se corroboran con lo reportado previamente. De manera general el AL presentó una inhibición no sólo de la actividad de COX-2 o iNOS, los cuales se generan principalmente en un modelo de inflamación aguda, sino también su capacidad de reducir citocinas proinflamatorias generadas en una inflamación crónica (AR), ayudando no sólo a reducir la formación del edema en la pata si no también evitando la formación y activación de osteoclastogénesis en modelo murino (92,103,104).

Los análisis histológicos, son otra herramienta que permitió conocer si el AL (125 mg/kg) generaba algún cambio morfológico en los tejidos evaluados, de acuerdo a lo observado, este triterpeno mostró la capacidad de reducir la infiltración leucocitaria y no generó daño en el cartílago de los animales evaluados, así como no generó ningún tipo de daño en hígado, el cual es uno de los principales efectos adversos provocados por fármacos incluyendo FBZ, del cual existen reportes de que tiene la capacidad de generar esteatosis en pacientes (106)

## 8.6 Actividad antiartrítica de Br-5-ASA

El 5-ASA, molécula precursora de este derivado, es parte de numerosos agentes farmacológicos con diversas actividades biológicas como antimicrobianos, antitumorales, neuroprotectores y antiinflamatorios (58,105). De este último grupo se han desarrollado agentes para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales (CU y enfermedad de Chron), sin embargo, solo la Sulfasalazina ha sido utilizada en la terapia contra AR, esto debido a que la mayoría de estos fármacos poseen una baja biodisponibilidad en el organismo, por otro lado, estudios in vivo e in vitro han demostrado la actividad de derivados de 5-ASA sobre la inhibición de COX-1 y COX-2 (56,62,101).

Los antecedentes o reportes sobre la actividad antiartrítica de derivados 5-ASA es escasa, sin embargo, los resultados obtenidos durante este estudio, mostraron que el Br-5-ASA redujo la formación del edema plantar generada por la inoculación de AFC, así como una inhibición de la actividad de COX-2, aunque esta no resultó ser significativa, por lo que es necesario seguir llevando a cabo estudios que permitan describir su mecanismo de acción.

En relación al análisis histológico realizado a los animales tratados con Br-5-ASA, éstos al igual que AL mostraron una reducción del proceso inflamatorio generado, sin embargo, el Br-5-ASA generó esteatosis en hígado, mismo efecto adverso que el ya reportado por FBZ en pacientes, por lo que es necesario llevar a cabo una evaluación más completa en lo que se refiere a su posible actividad hepatotóxica (106)

## 9 CONCLUSIÓN

El AL presentó buena actividad antiinflamatoria tópica (modelo de TPA), mientras que el Br-5-ASA mostró una moderada actividad antiinflamatoria tópica, respecto a la evaluación antiinflamatoria sistémica, tanto el Br-5-ASA como AL presentaron actividad a las diferentes dosis y se determinó su respectiva  $DE_{50}$ .

En la actividad antiartrítica (modelo AFC), el AL (125 mg/kg) presentó una reducción del proceso inflamatorio significativa al ser comparado con su control FBZ (100 mg/kg), respecto al Br-5-ASA, éste presentó nuevamente una moderada actividad en este modelo. Sin embargo cabe destacar que este es el primer trabajo que se llevó a cabo sobre la evaluación de este compuesto en modelo antiinflamatorio sistémico y crónico.

## 10 PERSPECTIVAS

- Determinación del mecanismo de acción mediante el uso de herramientas como modelos *In silico* (acoplamiento molecular), modelos *Ex Vivo* o el uso de cultivos *In vitro*.
- Búsqueda de un posible sinergismo a partir de la actividad antiartrítica mostrada por los compuestos de interés (Br-5-ASA y AL).
- Generar nuevos derivados de 5-ASA o de AL.
- Realizar el estudio de biotransformación del derivado de Br-5-ASA

## 11 BIBLIOGRAFÍA

1. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*. 2015;517(7534):311–20.
2. Franceschi C, Campisi J. Chronic inflammation (Inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2014;69:S4–9.
3. Krishnan K, Mathew LE, Vijayalakshmi NR, Helen A. Anti-inflammatory potential of  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. *Inflammopharmacology*. 2014;22(6):373–85.
4. van Walsem A, Pandhi S, Nixon RM, Guyot P, Karabis A, Moore RA. Relative benefit-risk comparing diclofenac to other traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs and cyclooxygenase-2 inhibitors in patients with osteoarthritis or rheumatoid arthritis: A network meta-analysis. *Arthritis Res Ther*. 2015;17(1):1–18.
5. León M, Alvarado A, de Armas J, Miranda L, Varens J, Cuesta del Sol J. Inflammatory Acute Response. Biochemical and Cellular Considerations. *Rev Finlay*. 2016;5(1):47–62.
6. Smolen JS, Aletaha D, McInnes IB. Rheumatoid arthritis. *Lancet*. 2016;388(10055):2023–38. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30173-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30173-8)
7. Rubin E, Reisner H. Inflammation. In: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, editor. *Essentials of Rubin's Pathology*. Philadelphia; 2014. p. 648.
8. Siebert S, Tsoukas A, Robertson J, McInnes I. Cytokines as Therapeutic Targets in Rheumatoid Arthritis and Other Inflammatory Diseases. *Pharmacol Rev*. 2015;67(2):280–309. <http://pharmrev.aspetjournals.org/cgi/doi/10.1124/pr.114.009639>
9. Isailovic N, Daigo K, Mantovani A, Selmi C. Interleukin-17 and innate immunity in infections and chronic inflammation. *J Autoimmun*. 2015;60:1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaut.2015.04.006>

10. Cisneros Caballero ÁF, Felgueres Planells MJ, Vela Jarquín E, Gómez Martín D. Estrategias terapéuticas para la artritis reumatoide: hacia las terapias biotecnológicas. *Investig y Discapac*. 2017;6(2):69–87.
11. Boardman C, Chachi L, Gavrilu A, Keenan CR, Perry MM, Xia YC, et al. Mechanisms of glucocorticoid action and insensitivity in airways disease. *Pulm Pharmacol Ther*. 2014;29(2):129–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pupt.2014.08.008>
12. Barnes PJ, Adcock IM. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet*. 2009;373(9678):1905–17.
13. Cruz-Topete D, Cidlowski JA. One hormone, two actions: Anti- And pro-inflammatory effects of glucocorticoids. *Neuroimmunomodulation*. 2014;22(1–2):20–32.
14. Newton R. Anti-inflammatory glucocorticoids: Changing concepts. *Eur J Pharmacol*. 2014;724(1):231–6.
15. Strehl C, van der Goes MC, Bijlsma JWJ, Jacobs JWG, Buttgerit F. Glucocorticoid-targeted therapies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2017;26(2):187–95.

<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/13543784.2017.1276562>

16. Daley-Yates PT. Inhaled corticosteroids: Potency, dose equivalence and therapeutic index. *Br J Clin Pharmacol*. 2015;80(3):372–80.
17. Bijlsma JWJ, Jacobs JWG, Buttgerit F. Glucocorticoids in the treatment of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2015;33(4 Suppl 92):34-39
18. van Vollenhoven RF. Treatment of rheumatoid arthritis: State of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5(10):531–41.

<http://dx.doi.org/10.1038/nrrheum.2009.182>

19. Singh JA, Cameron C, Noorbaloochi S, Cullis T, Tucker M, Christensen R, et al. Risk of serious infection in biological treatment of patients with rheumatoid arthritis: A systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2015;386(9990):258–65.
20. Hartman L, Rasch LA, Klausch T, Bijlsma HWJ, Christensen R, Smulders YM, et al.

Harm, benefit and costs associated with low-dose glucocorticoids added to the treatment strategies for rheumatoid arthritis in elderly patients (GLORIA trial): study protocol for a randomised controlled trial. *Trials*. 2018;19(1):1–12.

21. Boers M, Buttgerit F. A simple model that suggests possible cost savings when modified-release prednisone 5 mg/day is added to current treatment in patients with active rheumatoid arthritis. *Rheumatol (Oxford)*. 2013;52(8):1435–7.
22. Gutiérrez GA. Evaluación farmacológica y toxicológica de *Moussonia deppeana* [Doctorado]. Instituto Politécnico Nacional "Escuela Nacional Ciencias Biológicas"; 2016: (1-159)
23. van der Goes MC, Jacobs JW, Bijlsma JW. The value of glucocorticoid co-therapy in different rheumatic diseases - positive and adverse effects. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(2):1–13.
24. Süleyman H, Demircan B, Karagöz Y. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. *Pharmacol Reports*. 2007;59(3):247–58.
25. Al-Saeed A. Gastrointestinal and Cardiovascular Risk of Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs. *Oman Med J*. 2011;26(6):385–91.
26. Díaz-González F, Sánchez-Madrid F. NSAIDs: Learning new tricks from old drugs. *Eur J Immunol*. 2015;45(3):679–86.
27. Regulski M, Regulska K, Prukała W, Piotrowska H, Stanisiz B, Murias M. COX-2 inhibitors: A novel strategy in the management of breast cancer. *Drug Discov Today*. 2016;21(4):598–615. <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2015.12.003>
28. Bessone F, Hernandez N, Roma MG, Ridruejo E, Mendizabal M, Medina-Cáliz I, et al. Hepatotoxicity induced by coxibs: how concerned should we be?. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15(11):1463–75.
29. Oscanoa-Espinoza TJ. Seguridad de los antiinflamatorios no esteroideos. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53(511):172–9.
30. Smolen JS, Van Der Heijde D, MacHold KP, Aletaha D, Landewé R. Proposal for a

new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. *Ann Rheum Dis.* 2014;73(1):3–5.

31. Chen Y-F, Jobanputra P, Barton P, Jowett S, Bryan S, Clark W, et al. A systematic review of the effectiveness of adalimumab, etanercept and infliximab for the treatment of rheumatoid arthritis in adults and an economic evaluation of their cost-effectiveness. *Health Technol Assess.* 2006;10(42):1-229.
32. Cardiel MH, Díaz-Borjón A, Vázquez del Mercado Espinosa M, Gámez-Nava JI, Barile Fabris LA, Pacheco Tena C, et al. Actualización de la Guía Mexicana para el Tratamiento Farmacológico de la Artritis Reumatoide del Colegio Mexicano de Reumatología. *Reumatol Clin.* 2014;10(4):227–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2013.10.006>
33. Danza Á, Graña D, Goñi M, Vargas A, Ruiz-irastorza G. Hidroxicloroquina en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes sistémicas. *Rev Med Chile.* 2016;144:232–40.
34. Rainsford KD, Parke AL, Clifford-Rashotte M, Kean WF. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology.* 2015;23(5):231–69.
35. Sykes L, Thomson KR, Boyce EJ, Lee YS, Rasheed ZBM, Macintyre DA, et al. Sulfasalazine augments a pro-inflammatory response in interleukin-1 $\beta$ -stimulated amniocytes and myocytes. *Immunology.* 2015;146(4):630–44.
36. Meier F, Frerix M, Hermmann W, Müller-Lander U. Current immunotherapy in rheumatoid arthritis. *Immunotherapy.* 2013;5(9):955–74.
37. Mazouyès A, Clay M, Bernard AC, Gaudin P, Baillet A. Efficacy of triple association methotrexate, sulfasalazine and hydroxychloroquine in early treatment of rheumatoid arthritis with insufficient response to methotrexate: Meta-analysis of randomized controlled trials. *Jt Bone Spine.* 2016;84(5):563–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbspin.2016.10.010>

38. Ramiro S, Gaujoux-Viala C, Nam JL, Smolen JS, Buch M, Gossec L, et al. Safety of synthetic and biological DMARDs: A systematic literature review informing the 2013 update of the EULAR recommendations for management of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(3):529–35.
39. Leon L, Gomez A, Vadillo C, Pato E, Rodriguez-Rodriguez L, Jover JA, et al. Severe adverse drug reactions to biological disease-modifying anti-rheumatic drugs in elderly patients with rheumatoid arthritis in clinical practice. *Clin Exp Rheumatol*. 2018;36(1):29–35.
40. Cantini F, Nannini C, Niccoli L, Petrone L, Ippolito G, Goletti D. Risk of Tuberculosis Reactivation in Patients with Rheumatoid Arthritis, Ankylosing Spondylitis, and Psoriatic Arthritis Receiving Non-Anti-TNF-Targeted Biologics. *Mediators Inflamm*. 2017;2017(PG-8909834). <https://doi.org/10.1155/2017/8909834>
41. Byng-Maddick R, Ehrenstein MR. The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2015;54(5):768–75.
42. Edwards CJ, Arden NK, Fisher D, Saperia JC, Reading I, Van Staa TP, et al. The changing use of disease-modifying anti-rheumatic drugs in individuals with rheumatoid arthritis from the United Kingdom General Practice Research Database. *Rheumatology*. 2005;44(11):1394–8.
43. Damjanov N, Nurmohamed MT, Szekanecz Z. Biologics, cardiovascular effects and cancer. *BMC Med*. 2014;12(1):1-3.
44. María Delgado-Vega A, Martín J, Granados J, Manuel Anaya J. Epidemiología genética de la artritis reumatoide: ¿qué esperar de América Latina?. *Biomédica*. 2006;26(4):562–84. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i4.326>
45. Hecht C, Englbrecht M, Rech J, Schmidt S, Araujo E, Engelke K, et al. Additive effect of anti-citrullinated protein antibodies and rheumatoid factor on bone erosions in patients with RA. *Ann Rheum Dis*. 2015;74(12):2151–6.
46. Secretaría de Salud. Guía de práctica clínica: Diagnóstico y Tratamiento de Artritis Reumatoride del Adulto. Vol. 3, Guía de práctica clínica. 2010. 1-98 p.

47. Alamgeer, Ultra AM, Hasan UH. Anti-arthritic activity of aqueous-methanolic extract and various fractions of *Berberis orthobotrys* Bien ex Aitch. *BMC Complement Altern Med*. 2017;17(1):1–16.
48. Smolen JS, Landewé R, Bijlsma J, Burmester G, Chatzidionysiou K, Dougados M, et al. Eular Recommendations for the Management of Rheumatoid Arthritis With Synthetic and Biological Disease-Modifying Antirheumatic Drugs: 2016 Update. *Ann Rheum Dis*. 2016;76(6):960–77.
49. van den Hoek J, Boshuizen HC, Roorda LD, Tijhuis GJ, Nurmohamed MT, van den Bos GAM, et al. Mortality in patients with rheumatoid arthritis: a 15-year prospective cohort study. *Rheumatol Int*. 2017;37(4):487–93.
50. Widdifield J, Paterson JM, Bernatsky S, Tu K, Tomlinson G, Kuriya B, et al. The epidemiology of rheumatoid arthritis in Ontario, Canada. *Arthritis Rheumatol*. 2014;66(4):786–93.
51. Cross M, Smith E, Hoy D, Carmona L, Wolfe F, Vos T, et al. The global burden of rheumatoid arthritis: Estimates from the Global Burden of Disease 2010 study. *Ann Rheum Dis*. 2014;73(7):1316–22.
52. Stevenson M, Archer R, Tosh J, Simpson E, Everson-Hock E, Stevens J, et al. Adalimumab, etanercept, infliximab, certolizumab pegol, golimumab, tocilizumab and abatacept for the treatment of rheumatoid arthritis not previously treated with disease-modifying antirheumatic drugs and after the failure of conventional disease-modifying antirheumatic drugs only: systematic review and economic evaluation. *Health Technol Assess*. 2016;20(35):1-610.doi: 10.3310/hta20350.
53. Román Ivorra JA, Ivorra J, Monte-Boquet E, Canal C, Oyagüez I, Gómez-Barrera M. Análisis de costes de la utilización de fármacos biológicos para la artritis reumatoide en primera línea de tratamiento tras respuesta inadecuada a metotrexato en función del peso de los pacientes. *Reumatol Clin*. 2016;12(3):123–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.reuma.2015.07.008>
54. Neogi T. Joint Pain Epidemiology. *International Association for the Study of Pain Fact Sheet*. 2016;(11):18–20.

55. Klotz U. The role of aminosalicylates at the beginning of the new millennium in the treatment of chronic inflammatory bowel disease. *Eur J Clin Pharmacol.* 2000;56(5):353–62.
56. Abdu-Allah HH, A El-Shorbagi ANA, Abdel-Moty SG, El-Awady R, Abdel-Alim AAM. 5-Aminosalicylic Acid (5-ASA): A Unique Anti-Inflammatory Salicylate. *Med Chem.* 2016;6(5):1–11. <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0444.1000361>
57. Desreumaux P, Ghosh S. Review article: mode of action and delivery of 5-aminosalicylic acid - new evidence. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(Suppl 1):2–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2006.03069.x>
58. Bergman R, Parkes M. Systematic review: The use of mesalazine in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;23(7):841–55.
59. Loftus E V., Kane S V, Bjorkman D. Systematic review: short-term adverse effects of 5-aminosalicylic acid agents in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2004;19(2):179–89.
60. Metzler KD, Fuchs TA, Nauseef WM, Reumaux D, Roesler J, Schulze I, et al. Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: Implications for innate immunity. *Blood.* 2011;117(3):953–9.
61. Mariani F, Sena P, Roncucci L. Inflammatory pathways in the early steps of colorectal cancer development. *World J Gastroenterol.* 2014;20(29):9716–31.
62. Cabrera Pérez LC, Gutiérrez Sánchez M, Mendieta Wejebe JE, Hernández Rodríguez M, Frago Vázquez MJ, Rodrigo Salazar J, et al. Novel 5-aminosalicylic derivatives as anti-inflammatories and myeloperoxidase inhibitors evaluated in silico, in vitro and ex vivo. *Arab J Chem.* 2017;1–14.
63. García-Rodríguez RV, Chamorro Cevallos G, Siordia G, Jiménez-Arellanes MA, Chávez-Soto MA, Meckes-Fischer M. *Sphaeralcea angustifolia* ( Cav .) G . Don extract, a potential phytomedicine to treat chronic inflammation. *BLACPMA* 2012;11(5):454–63.
64. Pérez-Hernández J, González-Cortazar M, Marquina S, Herrera-Ruiz M, Meckes-

- Fischer M, Tortoriello J, et al. Sphaeralcic acid and tomentin, anti-inflammatory compounds produced in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia*. *Planta Med.* 2014;80(2–3):209–14.
65. del Pilar Nicasio-Torres M, Pérez-Hernández J, González-Cortazar M, Meckes-Fischer M, Tortoriello J, Cruz-Sosa F. Production of potential anti-inflammatory compounds in cell suspension cultures of *Sphaeralcea angustifolia* (Cav.) G. Don. *Acta Physiol Plant.* 2016;38(8).
66. Lin B, Zhao Y, Han P, Yue W, Ma XQ, Rahman K, et al. Anti-arthritic activity of *Xanthium strumarium* L. Extract on complete Freund's adjuvant induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol.* 2014;155(1):248–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.023>
67. Li Z, Geng Y-N, Jiang J-D, Kong W-J. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Berberine in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;2014:1–12. doi: 10.1155/2014/289264
68. David B, Wolfender J-L, Dias DA. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. *Phytochem Rev.* 2015;14(2):299–315. [doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z](http://dx.doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z)
69. Bitto A, Minutoli L, David A, Irrera N, Rinaldi M, Venuti FS, et al. Flavocoxid, a dual inhibitor of COX-2 and 5-LOX of natural origin, attenuates the inflammatory response and protects mice from sepsis. *Crit Care.* 2012;16(1):1–12. doi: 10.1186/1364-8535-16-R32.
70. Bitto A, Squadrito F, Irrera N, Pizzino G, Pallio G, Mecchio A, et al. Flavocoxid , a Nutraceutical Approach to Blunt Inflammatory Conditions. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:1–9. [doi.org/10.1155/2014/790851](http://dx.doi.org/10.1155/2014/790851)
71. Zhang H, Tsao R. Dietary polyphenols, oxidative stress and antioxidant and anti-inflammatory effects. *Curr Opin Food Sci.* 2016;8:33–42. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2016.02.002>
72. Fechtner S, Singh A, Chourasia M, Ahmed S. Molecular insights into the differences

in anti-inflammatory activities of green tea catechins on IL-1 $\beta$  signaling in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2017;329:112–20.

73. Leong DJ, Choudhury M, Hanstein R, Hirsh DM, Kim JJ, Majeska RJ, et al. Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse posttraumatic osteoarthritis model. *Arthritis Res Ther*. 2014;16(1):1–11.
74. Lee W, Ku S-K, Bae J-S. Anti-inflammatory Effects of Baicalin, Baicalein, and Wogonin In Vitro and In Vivo. *Inflammation*. 2014;4(1):110–25.
75. Wang H-Z, Wang H-H, Huang S-S, Zhao H, Cao Y-G, Wang G-Z, et al. Inhibitory Effect of Baicalin on Collagen-Induced Arthritis in Rats through the Nuclear Factor- $\kappa$ B Pathway. *J Pharmacol Exp Ther*. 2014;350(2):435–43.
76. Li X, Han Y, Zhou Q, Jie H, He Y, Han J, et al. Apigenin, a potent suppressor of dendritic cell maturation and migration, protects against collagen-induced arthritis. *J Cell Mol Med*. 2016;20(1):170–80.
77. Chang X, He H, Zhu L, Gao J, Wei T, Ma Z, et al. Protective effect of apigenin on Freund's complete adjuvant-induced arthritis in rats via inhibiting P2X7/NF- $\kappa$ B pathway. *Chem Biol Interact*. 2015;236:41–6.
78. Lomholt S, Mellemkjaer A, Iversen MB, Pedersen SB, Kragstrup TW. Resveratrol displays anti-inflammatory properties in an ex vivo model of immune mediated inflammatory arthritis. *BMC Rheumatology*. 2018;2(27):1–10.
79. Ali N, Rashid S, Nafees S, Hasan SK, Shahid A, Majed F, et al. Protective effect of Chlorogenic acid against methotrexate induced oxidative stress, inflammation and apoptosis in rat liver: An experimental approach. *Chem Biol Interact*. 2017;272:80–91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.05.002>
80. Luczkiewicz P, Kokotkiewicz A, Dampc A, Luczkiewicz M. Mangiferin: A promising therapeutic agent for rheumatoid arthritis treatment. *Med Hypotheses*. 2014;83(5):570–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2014.08.021>
81. López Mantecón AM, Garrido G, Delgado-Hernández R, Garrido-Suárez BB. Combination of *Mangifera indica* L. Extract Supplementation Plus Methotrexate in

- Rheumatoid Arthritis Patients: A Pilot Study. *Phyther Res.* 2014;28(8):1163–72. doi: 10.1002/ptr.5108
82. Doringhello GG, Inada NM, Paim BA, Pardo-Andreu GL, Vercesi AE, Oliveira HCF. *Mangifera indica* L. extract (Vimang®) reduces plasma and liver cholesterol and leucocyte oxidative stress in hypercholesterolemic LDL receptor deficient mice. *Cell Biol Int.* 2018;42(6): :747-753. doi: 10.1002/cbin.10950.
  83. Rambod M, Nazarinia MA, Raieskarimian F. The prevalence and predictors of herbal medicines usage among adult rheumatoid arthritis patients: A case-control study. *Complement Ther Med.* 2018;1–18. <https://doi.org/10.1016/j.ctim.2018.10.004>
  84. Geetha T, Varalakshmi P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. *J Ethnopharmacol.* 2001;76(1):77–80.
  85. Abboud R, Charcosset C, Greige-Gerges H. Interaction of triterpenoids with human serum albumin: A review. *Chem Phys Lipids.* 2017;207:260–70. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2017.05.011>
  86. Tolstikova TG, Sorokina I V., Tolstikov GA, Tolstikov AG, Flekhter OB. Biological activity and pharmacological prospects of lupane terpenoids: II. Semisynthetic lupane derivatives. *Russ J Bioorganic Chem.* 2006;32(3):261–76.
  87. Gallo MBC, Sarachine MJ. Biological activities of lupeol. *Int J Biomed Pharm Sci.* 2006;3(1):46–66.
  88. Hwang JJ, Wang WH. Combination of Lupeol Acetate and Curcumin used for the treatment or prevention of osteoporosis. United States; 2017. p. 1–19.
  89. Fatsiami R, Yusuf S. Isolation of Triterpenoid from Katemas (*Euphorbia geniculata* Ortega) Stem Extracted using Methanol and Its Toxicity Test. *Indones J Fundam Appl Chem.* 2016;19–23.
  90. Zambrano-Vásquez OR, Carrasco-Gamboa A, Jiménez-Arellanes MA. Actividad antioxidante , antimicrobiana y antiinflamatoria del extracto orgánico de *Cnidocolus tehuacanensis* Breckon y fraccionamiento químico. *Rev Mex Ciencias Farm.* 2017;48(3):1–6.

91. Kweifio-Okai G, Carroll AR. Antiarthritic effect of lupeol acetate. *Phyther Res.* 1993;7(2):213–5.
92. Lucetti DL, Lucetti ECP, Bandeira MAM, Veras HNH, Silva AH, Leal LKAM, et al. Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. *J Inflamm.* 2010;7:1–11.
93. Chen YF, Ching C, Wu TS, Wu CR, Hsieh WT, Tsai HY. *Balanophora spicata* and lupeol acetate possess antinociceptive and anti-inflammatory activities in vivo and in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012;2012:1–11. doi: 10.1155/2012/371273.
94. Domínguez-Ortiz MÁ, Muñoz-Muñiz OD, García-Rodríguez RV, Vázquez-Hernández M, Gallegos-Estudillo J, Cruz-Sánchez JS. Antioxidant and anti-inflammatory activity of *Moussonia deppeana*. *BLCPM.* 2010;9(1):13–9.
95. García-Rodríguez RV, Gutiérrez-Rebolledo GA, Méndez-Bolaina E, Sánchez-Medina A, Maldonado-Saavedra O, Domínguez-Ortiz MÁ, et al. *Cnidocolus chayamansa* Mc Vaugh, an important antioxidant, anti-inflammatory and cardioprotective plant used in Mexico. *J Ethnopharmacol.* 2014;151(2):937–43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.12.004>
96. Perazzo FF, Rodrigues I V, Maistro EL, Souza SM, Nanaykkara NPD, Bastos JK, et al. Anti-inflammatory and analgesic evaluation of hydroalcoholic extract and fractions from seeds of *Piper cubeba* L. (Piperaceae). *Pharmacogn J.* 2013;5(1):13–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phcgj.2012.12.001>
97. Rasool M, Sabina EP, Lavanya B. Anti-inflammatory Effect of *Spirulina fusiformis* on Adjuvant-Induced Arthritis in Mice. *Biol Pharm Bull.* 2006;29(12):2483–7.
98. Gutiérrez-Rebolledo GA, Garduño-Siciliano L, Chávez-Rueda AK, Siordia-Reyes AG, Zamilpa A, Jiménez-Arellanes MA. In vivo anti-arthritic and antioxidant effects from the standardized ethanolic extract of *Moussonia deppeana*. *Brazilian J Pharmacogn.* 2018;28(2):198–206. doi.org/10.1016/j.bjp.2018.02.004
99. Akihisa T, Kojima N, Kikuchi T, Yasukawa K, Tokuda H, T. Masters E, et al. Anti-

Inflammatory and Chemopreventive Effects of Triterpene Cinnamates and Acetates from Shea Fat. *J Oleo Sci.* 2010;59(6):273–80.

100. Khan MJ, Saraf S, Saraf S. Anti-inflammatory and associated analgesic activities of HPLC standardized alcoholic extract of known ayurvedic plant *Schleichera oleosa*. *J Ethnopharmacol.* 2017;197:257–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.08.021>
101. Pereira SR, Pereira R, Figueiredo I, Freitas V, Dinis TCP, Almeida LM. Comparison of anti-inflammatory activities of an anthocyanin-rich fraction from Portuguese blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) and 5-aminosalicylic acid in a TNBS-induced colitis rat model. *PLoS One.* 2017;12(3):1–16.doi: 10.1371/journal.pone.0174116.
102. Deliorman Orhan D, Hartevioğlu A, Küpeli E, Yesilada E. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *J Ethnopharmacol.* 2007;112(2):394–400.
- 103 Wang WH, Chuang HY, Chen CH, Chen WK, Hwang JJ. Lupeol acetate ameliorates collagen-induced arthritis and osteoclastogenesis of mice through improvement of microenvironment. *Biomed Pharmacother.* 2016;79(155):231–40. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.02.010>
104. Jiménez-Arellanes MA, Carrasco-Gamboa A, Zambrano-Vásquez OR, Meckes-Fischer M, Hernández-portilla LB, Zamilpa A. Phytochemistry of *Cnidoscolus tehuacanensis* Breckon ( Euphorbiaceae ), an Endemic Mexican Plant with Potential Therapeutic Benefits. *Am J Ethnomedicine.* 2018;5(1):1–9.
105. Margagnoni G, Pagnini C, Menasci F, Festa S, Fave G. Critical review of the evidence on 5-aminosalicylate for chemoprevention of colorectal cancer in ulcerative colitis: A methodological question. *Curr Clin Pharmacol.* 2014;9(1):84–90.
- 106 Goodman Z. Phenotypes and Pathology of Drug-Induced Liver Disease. *Clinics in Liver Disease.* 2017;21(1):89-101.





INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación en Salud 3601 con número de registro 17 CI 09 015 034 ante COFEPRIS y número de registro ante CONBIOÉTICA CONBIOÉTICA 09 CEI 023 2017082,  
HOSPITAL DE ESPECIALIDADES DR. BERNARDO SEPULVEDA GUTIERREZ, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

FECHA Lunes, 28 de mayo de 2018.

**DRA. MARIA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES**  
**P R E S E N T E**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**Evaluación de la actividad antiartrítica del acetato de Lupeol y del Derivado de Br-5-asa en un modelo murino**

que sometió a consideración para evaluación de este Comité Local de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es A\_U\_T\_O\_R\_I\_Z\_A\_D\_O con el número de registro institucional:

No. de Registro  
R-2018-3601-056

ATENTAMENTE

**DR. CARLOS FREDY CUEVAS GARCÍA**  
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3601

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL