



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICARERO

**EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD
INMUNOMODULADORA DE *Vitex mollis***

TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

P R E S E N T A:

ALEXIS OMAR OCAMPO GARCÍA

DIRECTOR DE TESIS: DR. DAVID OSVALDO SALINAS SÁNCHEZ

CODIRECTOR: DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

JOJUTLA, MORELOS

MAYO, 2022



El Jicarero, Jojutla, Morelos, 27 de mayo del 2022.

**DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
PRESENTE.**

Por este conducto comunico a Usted, que he revisado el documento de tesis profesional por etapas, que presenta el Pasante de Licenciado en Biología: **C. ALEXIS OMAR OCAMPO GARCÍA**, con el título del trabajo: **EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DE LA ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE *Vitex mollis***.

En calidad de miembro de la comisión revisora, expreso la siguiente decisión:

VOTO A FAVOR: SI

VOTO EN CONTRA: _____

NECESITA ARREGLAR O ELIMINAR ALGO: _____

COMENTARIOS: _____

FIRMA

DR. DANTE AVILÉS MONTES _____

MC. XÓCHITL ATZIMBA FLORES GÓNGORA _____

DR. DAVID OSVALDO SALINAS SÁNCHEZ _____

DRA. MARIBEL LUCILA HERRERA RUÍZ _____

M. EN C. JUAN CARLOS JUÁREZ DELGADO _____



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

DAVID OSVALDO SALINAS SANCHEZ | Fecha:2022-05-27 14:40:03 | Firmante

kQex2Hu/WxaqzjeFXt62NB3eqX/TS46jnih1udl+P7cQW+F6x5L3Gzjh1tZCbM3vGUGFLxpNaD6GwFbsg0T6j4VPKOL/3OkUGXndUepy1yDT9QnoHWF34iRvgxteyX1m9HkE9uf/u3Ln1OdQjftTsMaJFpHiDa1IryCp7tZ8t+ipWu/YbOCyp6rG2EBwkRBOFOeY/KOTv9shI9RshqZyDN9Vku8Z9IGaz3XvM7QJ+d07L8Amn8F0PWg0HE0AnTw/NyWu8tmLp0UT4iMYn9q5msEkLxluETaPQxmXcYEXHsqRrJkJSycBr9J0pAAni776jnYcmj6Q1wt8vQ3n4Q==

JUAN CARLOS JUAREZ DELGADO | Fecha:2022-05-28 07:28:09 | Firmante

TY7rmqx60meDKnlFg01ouijIT2OBV+h7VZT0VASCutg1EJvg8Tay4jsw/SEh6X30WMrRqF+ycE5CIL5P3S9Hu6g28sQVOvpOIdzrX+2WWK+wP9BUswd3CKgdpJcJnKb14SS155T0Uxtm+GHbDYojMzqH+JzeQv6hIvA5kloyKnshZVY0pr2f0LEnPV728IKxhHlqii5G7LbdI8O2xXJaOnyONPoiNBGrCtGm78tUfFKYaYM1wqkt+8dTXJYyYH51ZHQ1mIIAZZmXrGfCyFUX2T5vHnN09ImkoUuGwWkLXlTr9gwx8pEzr3DyCOk0wMgerJlI9+ysajhPb+ej4mQ==

MARIBEL LUCILA HERRERA RUIZ | Fecha:2022-05-30 08:31:07 | Firmante

aqicaWTAUBOrSTyW6pwDwdO9o7EUeVvn/o/vKAJ7fLkh5nCiUxO+xiSAwqZyL21g6ZpUzGJhlfmq8QbY3rhr+7CjF9OQEFxL4GyRtbAolwsYpehUluB7Yp+6NpuBllssbPVE5WXf3GZCqqlNknUMsThHxB2FhxKEoOmbUnZIJ7fP1BMNhnKathzneyt6/qDXjVmQj+al/JluUDlgl/7Kna5cSgaJisAjKn1wV6HQsqm0EzCpQlkjGj2ab5ALdtueyJxQzUce/MTFJlnRg/vld4+r5gls8ZDC+3TerI8I4Vv0mIN2DXOuypan3pYclNHwNABnG6YcesxLU+jg==

XOCHITL ATZIMBA FLORES GONGORA | Fecha:2022-05-30 14:06:29 | Firmante

u+oOdwGI0C4QJzIvVgO2eQYKD9vx4nWgtMCGEL2BDZNFkE2/2xXAEr+dHkgKu5rksu5oYsINKvXm7vkgG3v1Ex0HIArJCTtWX1VVQHW//9JfQzat1+CLZUy+7EyfKRBa3PeX3slW/N203Nj75M7olghEUIJ7qpC3UU0XplQDQWk7gwz1mHh+lhAyJCOSQ0dt8cow6RF4F6jHbywcy9HFF0Zcxiy5hDBzIE6WfQ7OLxOAA5mR7kJIBU0h6Lp+1zrdOhXIVgf+g/se8uu6iYmKz1AvTAE11tMsLIZuzQncCBZCtZQTKxH6PM20Tn+wMf8X0P7/Y6Nsoq5pudFin/EA==

DANTE AVILES MONTES | Fecha:2022-05-31 15:08:42 | Firmante

2a46L8cmwxPSDtywLyXS9yZ6seBXq0F4VNgM4kuomkH70mE4zFuu75QqhuVOKAG1utS+XD9oYAev+AC6prGq3+6JGWq3d7m+uddp7tynL8Q9UH74saNt57KHpaJ93BQBFaw2ndcfUFWtFusvYB3wGY9fZz/SCHEd/6aAjdjxCd8VZZFk72GiD1QTjP92H1FIUWep/H+ZGL50OGCRaih9z0tKagVTVUilayQrFmNJEUYu2eiDUkUPsknTOB2gYX9Vlj0YVCqUcbJcnJba3HhjhIsDwa1WUubV+44fYk4y7/WH/eZ94KWnSLXBG585qARZTFgl7Zcg429DXxhUA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



J4bTHDtdf

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/YYYY7ONwAhUlhzIABHRzXfq6ecDmnTUR>



El presente trabajo se llevó a cabo en:



**Centro de Investigación Biomédica del Sur del
Instituto Mexicano del Seguro Social.
Departamento de Farmacología y
Fitoquímica.
Xochitepec, Morelos.**



**Centro de Investigación en Biodiversidad y
Conservación.
Laboratorio de Fitoquímica y Productos
Naturales. Cuernavaca, Morelos.**

DEDICATORIA

A mis padres, Dolores García y Fernando Ocampo. Mamá, muchas gracias por apoyarme a lo largo de mi vida, todos mis logros son para ti, te amo. Papá, a pesar de que no estás aquí, te agradezco el apoyo que me has brindado. Muchas gracias por todo, los amo.

A mi hermano Oliver, gracias por estar presente en las buenas y en las malas, te quiero.

A mi Canelita, eres mi vida, mi refugio, mi tranquilidad, te amo.

A mi viejito Peter, aunque ya no estas físicamente te agradezco por el tiempo que estuviste siempre apoyándome en mis decisiones y siempre aconsejándome, te quiero y te extraño.

A Tanyita, estuviste de principio a fin en mi proyecto, gracias por siempre escuchar mis ideas, ayudarme, aconsejarme y tranquilizarme en momentos difíciles. Sabes cuánto te agradezco, te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Enrique Jiménez, gracias por sus enseñanzas y por el tiempo brindado durante este proyecto de investigación. Sin duda es un ejemplo a seguir, muchas gracias.

Al Dr. David Salinas, doctor, muchas gracias por guiarme desde el inicio de este proyecto, por todas las enseñanzas, el tiempo y los consejos brindados. Se le aprecia mucho Doctor David.

A la Dra. Maribel Herrera, muchas gracias por todas sus enseñanzas y por impulsar a cada alumno a seguir adelante, es una excelente persona, gracias Dra. Maribel.

Al Dr. Manases y Dra. Dolores, gracias por el apoyo y las enseñanzas durante mi estancia en el CIBIS, se les estima.

Al Dr. Dante Avilés, a la Médica Xóchitl Flores y al Maestro Juan Carlos Juárez, gracias por conformar mi comité sinodal y gracias por los consejos brindados durante todo el proyecto de investigación.

A mis compañeros Raymundo y Félix, gracias por estar durante el proyecto, por el apoyo y por intercambiar ideas siempre con la finalidad de ser mejores estudiantes, se les aprecia. Rayito, gracias por tu amistad dentro y fuera de la universidad, te quiero amigo.

A la UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS y a la ESCUELA DE ESTUDIOS SUPERIORES DEL JICAREO, por ser instituciones de excelencia y por parte de mi formación académica.

Al CENTRO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA DEL SUR y Al CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE BIODIVERSIDAD Y CONSERVACIÓN, por permitirme formar parte y hacer uso de sus instalaciones para crecer académicamente.

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
2	INTRODUCCIÓN.....	2
3	ANTECEDENTES.....	3
3.1	Inflamación.....	3
3.2	Manifestaciones clínicas.....	3
3.3	Inflamación aguda.....	3
3.4	Fase vascular.....	4
3.5	Fase celular.....	4
3.6	Inflamación crónica.....	4
3.7	Inflamación crónica inespecífica.....	5
3.8	Inflamación granulomatosa.....	5
3.9	Fisiopatología.....	5
3.10	Proceso inflamatorio.....	6
3.10.1	Vasodilatación.....	6
3.10.2	Formación de edema.....	7
3.10.3	Migración leucitaria.....	7
3.10.4	Activación de la cascada de coagulación y sistema de complemento.....	9
3.10.5	Sistema inmunitario innato y adquirido.....	9
3.10.6	Mediadores del proceso inflamatorio.....	10
3.10.7	Mediadores derivados de las células.....	11
3.10.8	Mediadores derivados del plasma.....	12
3.10.9	Células que participan en el proceso de inflamación.....	13
3.11	Tratamiento farmacológico.....	14
3.11.1	Analgésicos.....	15
3.11.2	Antiinflamatorios no esteroides (AINE).....	15
3.11.3	Corticoides.....	16
3.12	Medicina tradicional en inflamación.....	16
3.13	Género <i>Vitex</i>	18
3.13.1	Descripción general.....	18
3.13.2	Propiedades y medicina tradicional del género <i>Vitex</i>	18
3.13.3	Fitoquímica del género <i>Vitex</i>	19
3.14	<i>Vitex mollis</i> Kunth.....	25
3.14.1	Clasificación taxonómica.....	25
3.14.2	Descripción.....	25
3.14.3	Hábitat y distribución.....	26
3.14.4	Usos medicinales y propiedades farmacológicas.....	27
3.14.5	Fitoquímica de <i>Vitex mollis</i>	28
3.15	Modelos farmacológicos.....	28
3.15.1	Fundamento de la prueba de inflamación inducida por TPA.....	28
3.15.2	Fundamento del edema plantar por carragenina.....	28

4	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	29
5	HIPÓTESIS	29
6	JUSTIFICACIÓN	29
7	OBJETIVOS	30
7.1	Objetivo general.....	30
7.2	Objetivos particulares.....	30
8	MATERIALES Y REACTIVOS	31
8.1	Colecta de material biológico.....	31
8.2	Animales de experimentación.....	31
9	MÉTODOS	31
9.1	Extracción de hexano y acetato de etilo de <i>V. mollis</i>	31
9.2	Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de <i>V. mollis</i>	32
9.3	Fraccionamiento de la reunión VMC1R13.....	33
9.4	Fraccionamiento de la reunión VMC2R12.....	35
9.5	Fraccionamiento de la reunión VMC2R11.....	36
9.6	Modelos experimentales.....	37
9.6.1	Modelo de inflamación aguda en ratones con TPA.....	37
9.6.2	Modelo de edema plantar inducido por carragenina.....	38
9.7	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	38
9.8	Análisis estadístico utilizado.....	39
10	RESULTADOS	40
10.1	Actividad antiinflamatoria de extractos de hexano y acetato de etilo de <i>Vitex mollis</i> en TPA.....	41
10.2	Actividad antiinflamatoria de las reuniones VMC1R7, VMC1R12 y VMC1R13 en TPA.....	41
10.3	Actividad antiinflamatoria de la reunión VMC3R6 a 1 mg/oreja y a 0.5 mg/oreja en TPA.....	42
10.4	Efecto antiinflamatorio de extractos y reuniones seleccionadas en modelo de edema plantar inducido por carragenina.....	42
10.5	Efecto de extractos y reuniones sobre el bazo de ratones con edema plantar inducido por carragenina.....	47
10.6	Identificación del compuesto ácido cafeico en la sub-fracción VMC3R3.....	47
10.7	Identificación de la mezcla de quercetina y luteolina en la sub-fracción VMC3R6.....	48
10.8	Identificación del compuesto apigenina en la fracción VMC4F31.....	49
11	DISCUSIÓN	51
12	CONCLUSIONES	54
13	REFERENCIAS	55
14	ANEXOS	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Producción de prostaglandinas vasodilatadoras a través de las acciones de las fosfolipasas y ciclooxigenasas.....	7
Figura 2. Mecanismo de migración de neutrófilos en el proceso de inflamación.....	8
Figura 3. Mediadores de la inflamación derivados del plasma y de las células.....	10
Figura 4. Células que participan en el proceso de inflamación.....	14
Figura 5. Curcumina.....	17
Figura 6. Resveratrol.....	17
Figura 7. Ácido boswellico.....	18
Figura 8. Agnucastoside A.....	20
Figura 9. Agnucastoside B.....	20
Figura 10. Agnucastoside C.....	20
Figura 11. Vitexlactama A.....	20
Figura 12. Luteolina.....	20
Figura 13. Artemetina.....	20
Figura 14. Isorhamnetina.....	20
Figura 15. Ácido (3, 4-dimetoxifenilo) acético.....	21
Figura 16. Negundoside.....	21
Figura 17. Agnuside.....	21
Figura 18. Ácido p-hidroxibenzoico.....	21
Figura 19. β -sitosterol.....	21
Figura 20. Ácido betulínico.....	21
Figura 21. Ácido ursólico.....	22
Figura 22. Hidroxiecdisona.....	23
Figura 23. Metil p-hidroxibenzoato.....	23
Figura 24. Vitexilactona.....	23
Figura 25. Casticina.....	23
Figura 26. Orientina.....	23
Figura 27. Isoorientina.....	23
Figura 28. Apigenina.....	24
Figura 29. Vitexina.....	24
Figura 30. 4-hidroxibenzaldehído.....	24
Figura 31. Ácido 4-hidroxibenzoico.....	24
Figura 32. Ácido ferúlico.....	24
Figura 33. Ejemplar de <i>Vitex mollis</i> K. Localidad de Tilzapotla, Puente de Ixtla, Morelos, México.....	25
Figura 34. Partes aéreas de <i>Vitex mollis</i>	26
Figura 35. Agnuside.....	28
Figura 36. Cromatografía en capa fina en fase normal (FN) vista en luz UV de las subfracciones VMC1R7 y VMC1R13 (en círculo rojo). Sistema 6:4 hexano-acetato de etilo.	

A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.....	33
Figura 37. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de las fracciones 33-36 (VMC2R12). Sistema 6:4 hexano-acetato de etilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.....	33
Figura 38. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de las sub-fracciones VMC2R11 y VMC2R12. Sistema 8:2 diclorometano-acetona. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.....	34
Figura 39. Cromatografía en capa fina FR vista en luz UV de las sub-fracciones VMC3R3 y VMC3R6. Sistema 5-5 H ₂ O/acetonitrilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.....	36
Figura 40. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de la fracción VMC4F25. Sistema 5-5 hexano-acetato de etilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.....	37
Figura 41. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de la fracción VMC4F31. Sistema 5-5 hexano-acetato de etilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.....	37
Figura 42. Cromatografía en capa fina FR vista en luz UV de la fracción VMC4F31. Sistema 5-5 H ₂ O-acetonitrilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.....	37
Figura 43. Cromatograma de VMC3R3 en HPLC a 300 nm.....	48
Figura 44. Ácido cafeico.....	48
Figura 45. Cromatograma de VMC3R3 en HPLC a 350 nm.....	49
Figura 46. Quercetina.....	49
Figura 47. Luteolina.....	49
Figura 48. Cromatograma de VMC4F31 en HPLC.....	50
Figura 49. Apigenina.....	50

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Fraccionamiento del extracto de hoja de acetato de etilo de <i>Vitex mollis</i> (VMC1).....	32
Tabla 2. Fraccionamiento de la reunión VMC1R13.....	34
Tabla 3. Fraccionamiento de la reunión VMC2R12.....	35
Tabla 4. Fraccionamiento de la reunión VMC2R11.....	36
Tabla 5. Rendimientos de los extractos de <i>Vitex mollis</i>	40
Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de extractos de VmHex y VmAcOEt en un modelo de edema auricular en ratón ICR inducido por TPA.....	41
Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de las reuniones VMC1R7, VMC1R12 y VMC1R13 en un modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA.....	41
Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de la reunión VMC3F6 a 1 mg/oreja y a 0.5 mg/oreja en un modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA.....	42

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo SSF.....	43
Gráfica 2. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo MEL (Meloxicam)....	44
Gráfica 3. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo VmAcOEt.....	44
Gráfica 4. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo R-12.....	45
Gráfica 5. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo R-13.....	45
Gráfica 6. Efecto de los tratamientos sobre la inflamación del cojinete plantar después de la administración de carragenina.....	46
Gráfica 7. Porcentaje de inhibición del edema de los tratamientos utilizados a las 4 h después de la inducción del edema con carragenina al 4 %.....	46
Gráfica 8. Porcentaje del bazo respecto al peso total de ratón con edema plantar inducido con carragenina de los grupos utilizados.....	47

ÍNDICE DE DIAGRAMAS

Diagrama 1. Separación fitoquímica de <i>V. mollis</i>	40
---	-----------

ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
AINE	Antiinflamatorio No Esteroideo
CCF	Cromatografía en Capa Fina
COX	Ciclooxigenasa
COXIBE	Inhibidor Selectivo de la Ciclooxigenasa -2
ET1	Endotelina 1
FAP	Factor Activador de Plaquetas
FN	Fase Normal
FR	Fase Reversa
GMP	Monofosfato Cíclico de Guanosina
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (por sus siglas en inglés <i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
ICAM-1	Molécula de Adhesión Intercelular (por sus siglas en inglés <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>)
IFNγ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
INDO	Indometacina
LO	Lipoxigenasas
MCP	Proteína Quimiotáctica de Macrófagos (por sus siglas en inglés <i>Macrophage Chemotactic Protein</i>)
MELO	Meloxicam
NF-κB	Factor Nuclear <i>Kappa B</i>

NO	Óxido Nítrico
PECAM-1	Molécula de Adhesión de Células Endoteliales de Plaquetas (por sus siglas en inglés <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule 1</i>)
PGD2	Prostaglandina D2
PGE2	Prostaglandina E2
PGF2α	Prostaglandina F2 <i>alfa</i>
PGI1	Prostaglandina I1
PGI2	Prostaciclina I2
PMN	Polimorfonucleares
SIRS	Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica (por sus siglas en inglés <i>Systematic Inflammatory Response Syndrome</i>)
SNC	Sistema Nervioso Central
SRLA	Sustancia de Reacción Lenta de la Anafilaxia
TGP	Glucósidos Totales de Peonia
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	13-acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
TXA2	Tromboxano A2
UV	Ultravioleta
VMAcOEt	Extracto de Acetato de Etilo de <i>Vitex mollis</i>
VMC1R12	<i>Vitex mollis</i> Columna 1 Reunión 12
VMC1R13	<i>Vitex mollis</i> Columna 1 Reunión 13
VMC1R7	<i>Vitex mollis</i> Columna 1 Reunión 7
VMC2R11	<i>Vitex mollis</i> Columna 2 Reunión 11
VMC2R12	<i>Vitex mollis</i> Columna 2 Reunión 12
VMC3R3	<i>Vitex mollis</i> Columna 3 Reunión 3
VMC3R6	<i>Vitex mollis</i> Columna 3 Reunión 6
VMC4F25	<i>Vitex mollis</i> Columna 4 Fracción 25
VMC4F31	<i>Vitex mollis</i> Columna 4 Fracción 31

1. RESUMEN

Vitex mollis se encuentra en el sur del estado de Morelos, en la Reserva de la Biosfera Sierra de Huautla, se le conoce comúnmente como coyotomate, los habitantes de la REBIOSH comentan que posee propiedades antiinflamatorias. El objetivo de este estudio fue el evaluar la capacidad antiinflamatoria de extractos de polaridad ascendente de la especie vegetal *Vitex mollis* Kunth utilizando dos modelos *in vivo*; edema inducido por 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) y edema plantar inducido con carragenina utilizando ratones ICR. El extracto de acetato de etilo (VMAcOEt) presentó el mayor porcentaje de inhibición del edema ($71.41\% \pm 1.22$) a una dosis de 1 mg/oreja. Del fraccionamiento químico de VMAcOEt se obtuvieron las subfracciones VMC1R12 y VMC1R13 las cuales inhibieron el edema en $74.79\% \pm 1.52$ y $75.27\% \pm 1.91$ respectivamente, semejantes a la inhibición del control positivo (indometacina $81.21\% \pm 0.75$). Mientras que en el modelo de edema plantar se administraron los tratamientos de VMAcOEt (500 mg/Kg), VMC1R12 y VMC1R13 a una dosis de 50 mg/kg, de los cuales, las fracciones VMC1R12 y VMC1R13 lograron reducir significativamente ($*p < 0.05$) el edema en comparación con el VEH a las 4 h después de la administración de carragenina (4%), estas dos fracciones mostraron un porcentaje de inhibición del edema mayor (16.8 % y 14.03 %, respectivamente) en comparación al control positivo (meloxicam) que fue administrado a una dosis de 10 mg/kg y tuvo un porcentaje de inhibición del edema de 9.64%. Por otro lado, las sub-fracciones VMC3R3, VMC3R6 y VMC4R6-F31 aisladas de VMC1R13 fueron analizadas en cromatografía líquida de alta resolución, cuyo análisis permitió la identificación de los compuestos de ácido cafeico, una mezcla de quercetina y luteolina, y apigenina, respectivamente. Estos metabolitos son de importancia médica, por lo cual se exhibe a *Vitex mollis* como una alternativa interesante, en la búsqueda de tratamientos para enfermedades que tienen como sustrato fisiopatológico a la inflamación.

2. INTRODUCCIÓN

La inflamación constituye una respuesta natural, en esencia pretende liberar al cuerpo de una lesión celular y de las consecuencias que ésta conlleva. Una vez, determinada la lesión celular se inicia una cascada bioquímica y proliferación de células mediadas por agentes químicos, los cuales provocan cambios en la microvasculatura, así como, un aumento de leucocitos y de este modo se presenta la inflamación aguda (Regal *et al.*, 2015). Pero si la inflamación se transforma en un proceso crónico, se convierte en un problema de salud grave, ya que, forma parte de varias enfermedades de alto impacto como el cáncer, la artritis, o el Alzheimer entre muchas otras (Salinas-Sánchez *et al.*, 2012). Su tratamiento está basado principalmente en antiinflamatorios no esteroideos (AINES) y corticoides (Olsen y Stein, 2004). Sin embargo, muchos de estos fármacos a pesar de ser eficaces y generan efectos colaterales adversos, que van desde molestias gástricas, hepatotoxicidad y toxicidad de la médula ósea entre otros. Todo lo anterior, genera deterioro de los pacientes, que se suma a la condición incapacitante del padecimiento (Saag *et al.*, 2008). La medicina tradicional se ha utilizado para atender las demandas de salud humana y hoy en día podría considerarse como la fuente más importante de nuevos compuestos. Un ejemplo es *Vitex mollis* Kunth (Verbenaceae), la cual se ha utilizado como tratamiento para inflamación, fiebre, diarrea, disentería y cólicos abdominales y en algunos casos el fruto se usa como tratamiento para picadura de escorpiones (Meena *et al.*, 2011; Osuna *et al.*, 2005). Se ha comprobado que esta especie vegetal posee propiedades como antiespasmódicas, antiprotozoarias, analgésicas, antioxidantes, y antiinflamatorias (Morales del Rio *et al.*, 2015; Meena *et al.*, 2011; Pio-León *et al.*, 2014). Además, el género *Vitex* contiene compuestos bioactivos, como iridoides, flavonoides, diterpenoides, y fitosteroides (Meena *et al.*, 2011; Cuevas-Juárez *et al.*, 2014; Padmalatha, *et al.*, 2009). Las plantas que poseen compuestos con actividad farmacológica sobre el sistema inmune son de gran interés por su potencial terapéutico sobre diferentes enfermedades. El objetivo del presente trabajo fue medir el efecto antiinflamatorio de *V. mollis* Kunth en dos ensayos farmacológicos: inducción de edema en el pabellón auricular de ratón por 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) y edema plantar en ratón inducido con carragenina.

3. ANTECEDENTES

3.1 Inflamación

La inflamación es un mecanismo de protección del sistema inmunológico del organismo, ante las agresiones del entorno que provoca una lesión celular o de los tejidos vasculares. Esto se debe a agentes patógenos como lo pueden ser bacterias; de igual forma se puede producir por traumatismos, sustancias químicas, entre otros agentes patológicos (Barreno, 2008). Es un proceso tisular que actúa en defensa frente a dichas agresiones que pretende eliminar la causa inicial de la lesión, eliminar el tejido dañado para así generar tejido nuevo. Es de gran interés debido a que la respuesta inflamatoria se ve involucrada en la patogénesis de muchas enfermedades de importancia médica como lo son el cáncer, diabetes mellitus, hipertensión arterial, entre otras (Grossman & Porth 2013).

La inflamación se divide en aguda y crónica. La inflamación aguda se caracteriza por ser de duración corta, puede durar de minutos a días, mientras que la inflamación crónica puede durar de meses hasta años.

3.2 Manifestaciones clínicas

Existen signos o síntomas cardinales que caracterizan la inflamación los cuales son: rubor (eritema), tumor (tumefacción), calor (aumento de la temperatura) y dolor, aunque recientemente se agregó un quinto signo cardinal; *fuctio laesa* o pérdida de la función (Barreno, 2008). En algunos casos se pueden presentar manifestaciones sistémicas como puede ser fiebre.

Entre las causas de los signos mencionados pueden ser por la acumulación leucocitaria y proteínas plasmáticas en el sitio de la lesión o de la infección (González-Costa, 2018).

3.3 Inflamación aguda

Nos referimos a una inflamación aguda cuando el proceso se lleva a cabo en minutos o hasta varios días, en donde diversos mecanismos de respuesta inmune innata activan la respuesta inmune adquirida. En esta inflamación hay una migración de leucocitos (principalmente neutrófilos) hacia los tejidos extravasculares, de igual forma se caracteriza por el exudado de fluido y los componentes del plasma (Regal *et al.*, 2015). Esta inflamación se puede producir por distintos factores ya sean infecciosos, por disparos autoinmunes, por traumatismos y por agentes físicos o químicos. Consta de dos fases: la fase vascular y la fase celular.

3.4 Fase vascular

Está caracterizada por modificaciones en la estructura de los vasos sanguíneos pequeños que se encuentran en el sitio de la lesión. Primero se da una vasoconstricción momentánea seguida rápidamente de una vasodilatación, esta última modifica la función de las arteriolas y las venas, provocando un incremento del flujo sanguíneo capilar, lo que conlleva a generar 2 de los signos cardinales previamente mencionados; calor y eritema. También existe un escape de fluido rico en proteínas (exudado) hacia los espacios extravasculares, esto se debe a un aumento de la permeabilidad vascular y ocasiona una reducción de la presión osmótica capilar y a su vez incrementa la presión osmótica intersticial; lo que conlleva a generar un flujo de salida intenso del exudado y su acumulación en espacios tisulares. Este fenómeno produce otros signos cardinales: tumefacción y dolor (Grossman & Porth, 2013).

3.5 Fase celular

En esta fase, el sitio de lesión se ve infestado de leucocitos, principalmente de neutrófilos, los cuales actúan en defensa del hospedero. Los leucocitos siguen un proceso de adhesión y marginación (acumulación leucocitaria), en el cual participan moléculas complementarias como selectinas e integrinas y permiten el paso al espacio vascular hacia el tejido extravascular en las superficies de leucocitos y el endotelio; después sigue la migración de los leucocitos por los tejidos hasta el sitio de lesión mediante la quimiotaxis o también llamada locomoción orientada.

Después de la lesión tisular, se desencadenan respuestas leucocitarias, fagocitosis y de eliminación celular. Primero se lleva a cabo el recubrimiento de un antígeno con anticuerpo para la facilitación de unión (opsonización), para después activar a los receptores que realizan la señalización intracelular y el ensamblaje de actina en el neutrófilo, esto forma pseudópodos que rodean al microbio al interior de un fagosoma, este último se funde con un lisosoma intracelular para dar forma a un fagolisosoma el cual liberará enzimas lisosómicas y radicales de oxígeno para culminar con el proceso de eliminar al microbio (Grossman & Porth, 2013).

3.6 Inflamación crónica

A lo contrario de la inflamación aguda, la inflamación crónica puede durar semanas, meses e incluso años (Regal *et al.*, 2015). Puede ser originada por distintas razones, por ejemplo, como consecuencia de una inflamación aguda persistente, o por respuestas

súbitas incapaces de controlar un proceso inflamatorio agudo (Villalba, 2014). La característica principal de la inflamación crónica es la infiltración por macrófagos y linfocitos, en comparación de la inflamación aguda, donde los neutrófilos son los protagonistas. También hay proliferación de fibroblastos, en lugar de exudados. Todos los agentes que participan en esta inflamación son persistentes de bajo grado, incapaces de penetrar a profundidad y no se dispersan con rapidez, como resultado, el riesgo de cicatrización y deformidad es mayor que en la inflamación aguda. Existen diversas causas para la inflamación crónica, algunos pueden ser agentes extraños al organismo, al igual que virus y bacterias, sin olvidar que existe la posibilidad de que los propios mecanismos inmunitarios desempeñen un papel importante en esta inflamación. Existen dos tipos; inflamación crónica inespecífica y la inflamación granulomatosa.

3.7 Inflamación crónica inespecífica

En esta existe un exceso de macrófagos y linfocitos en el sitio de lesión. A su vez, se producirá una proliferación de fibroblastos, con formación subsecuente de una cicatriz, que en muchas ocasiones va a sustituir al tejido conectivo normal o a los tejidos parenquimatosos funcionales en las estructuras dañadas.

3.8 Inflamación granulomatosa

Un granuloma, es una lesión pequeña en la que existe una acumulación de macrófagos circundados por linfocitos. Los macrófagos modificados, actúa de forma similar a las células epiteliales y denominándose de células epitelioides. Estas células, derivan de los monocitos de la sangre, que se transforman en macrófagos en el sitio de la lesión. Este tipo de inflamación se ve implicada por cuerpos extraños al igual que por microorganismos, los cuales tienen la similitud de digerirse de manera deficiente y no suelen controlarse con facilidad mediante otros mecanismos inflamatorios. Las células epitelioides al acumularse forman una gran célula multinucleada que circunda al agente extraño; denominadas células gigantes de cuerpo extraño.

3.9 Fisiopatología

Como se mencionó anteriormente, la inflamación es una respuesta rápida y que involucra procesos humorales y celulares; es una respuesta benéfica siempre y cuando exista una homeostasis entre células y mediadores. Consta de diversos procesos como vasodilatación, que además del incremento de la permeabilidad microvascular, aumentan

la disponibilidad de nutrientes y de oxígeno en el sitio de inflamación; esto acompañado de cambios hemodinámicos que producen los 5 signos cardinales de la inflamación.

Cuando es producida la respuesta ante la lesión, el organismo presentará cambios en distintos sistemas; por ejemplo, en el sistema cardiovascular provocara taquicardia, aumento de contractilidad y aumento del gasto cardiaco; de igual forma se presentan cambios neuroendocrinos; liberación de catecolaminas, insulina, hormona de crecimiento, entre otras. La intensidad o la repetición de la lesión llegan a provocar la pérdida del control local, provocando una inflamación sistémica denominada SIRS. Esta puede ser causada por infecciones (por virus, bacterias, etc.) o por causas no infecciosas como traumatismos, o propias del sistema inmune. El SIRS comprende 3 fases para su desarrollo. En la fase 1 después de la lesión, son liberadas citocinas que dan inicio a la respuesta inflamatoria, estas se encargan de reparar los tejidos dañados y reclutan células retículoendoteliales. En la fase 2, pequeñas cantidades de citocinas son liberadas en la circulación para reforzar la respuesta local. Además, otras células inflamatorias (macrófagos y trombocitos) para generar factores de crecimiento. Hay una disminución de los mediadores proinflamatorios y se liberan los antagonistas endógenos, dando paso a una respuesta de fase aguda. Manteniendo el proceso, se completa la cicatrización, la infección es resuelta y nuevamente entra en homeostasis. Cuando este equilibrio no se restablece, se da la fase 3, que también es conocida como reacción sistémica masiva. Citocinas activan cascadas humorales de mediadores inflamatorios que perpetúan la activación del sistema retículo endotelial lo que provoca perdida de la integridad micro-circulatoria y una diseminación de la lesión en órganos cercanos.

3.10 Proceso inflamatorio

3.10.1 Vasodilatación

El inicio de la respuesta inflamatoria se da con una vasodilatación, la cual es una característica del proceso, que se manifiesta con los signos cardinales de eritema, y calor en el sitio afectado. Gracias a la vasodilatación los mediadores y células inflamatorias actúan más fácilmente. El óxido nítrico (NO) y las prostaglandinas vasodilatadoras son las que regulan la vasodilatación. El NO provoca la relajación muscular lisa a través de la formación de Monofosfato cíclico de Guanosin (GMPc). Otro de los productos que se generan durante el proceso inflamatorio, es el ácido araquidónico (AA), que a través de la enzima ciclooxigenasa generan algunas de las prostaglandinas vasodilatadoras, como: prostaciclina (PGI₂), PGD₂, PGE₂ Y PGF₂ α (García de Lorenzo *et al.*, 2000). La

vasodilatación involucra inicialmente arteriolas seguida de aperturas microvasculares, sin embargo, en casos de inflamación sistémica grave la vasodilatación puede provocar daños severos como hipotensión sistémica y shock (Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

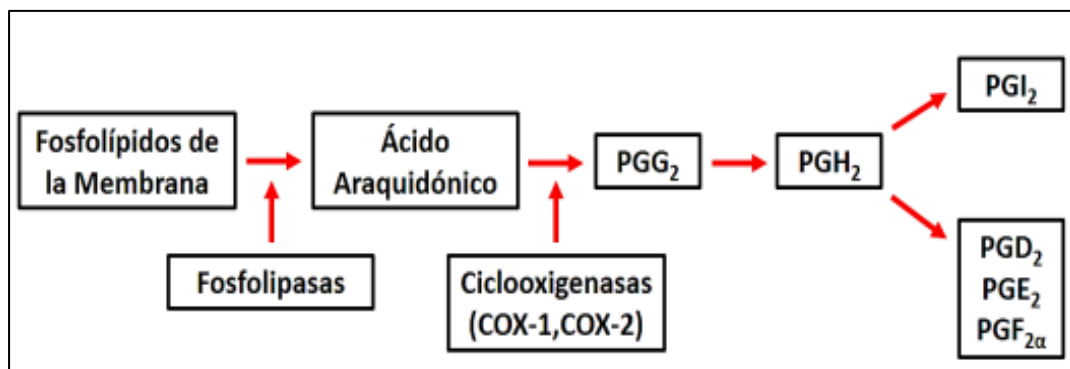


Figura 1. Producción de prostaglandinas vasodilatadoras a través de las acciones de las fosfolipasas y ciclooxigenasas. COX: ciclooxigenasa; PG: prostaglandina. (Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

3.10.2 Formación de edema

Al igual que la vasodilatación, el edema es formado en las primeras etapas del proceso de inflamación. Es causado por el flujo rico en proteínas a través de los vasculares, y es el resultado de mediadores como la histamina, bradicinina, leucotrienos, entre otros. Además, estos mediadores alteran la función de los vasos sanguíneos y aumentan la permeabilidad de capilares y vénulas para el agua y proteínas (Regal *et al.*, 2015).

3.10.3 Migración leucocitaria

Ante la respuesta a la lesión, los neutrófilos son los primeros y más abundantes leucocitos en llegar a la zona o el área afectada. Viajan desde el espacio intravascular hacia el intersticio inflamado (Gonzales *et al.*, 1994).

La migración está dividida por las fases de marginación, rodamiento, adhesión, diapédesis y quimiotaxis. En la primera fase se lleva a cabo el movimiento de neutrófilos desde el torrente sanguíneo hasta la periferia del vaso, para que después se desarrolle una adhesión débil de los neutrófilos hacia las células endoteliales vasculares, de tal manera que los neutrófilos permanezcan cerca del endotelio vascular. La fase de rodamiento se lleva a cabo gracias a estas interacciones adhesivas, y es facilitada por selectinas y ligandos. Una vez culminada el rodamiento se establece un proceso de fijación por adherencia. La adherencia se da gracias a integrinas y sus respectivos ligandos, de las cuales algunas

interactúan con los neutrófilos y les permiten adherirse al endotelio fácilmente, para de igual forma facilitar la diapédesis y la quimiotaxis. Una vez adherido, el neutrófilo debe penetrar el endotelio y la membrana basal para poder llegar al sitio inflamatorio extravascular. Las plaquetas dan paso a la diapédesis, que es el paso de elementos de la sangre como lo son los leucocitos, a través de los vasos capilares para dirigirse a la zona de afección sin que se desencadene alguna alteración capilar. La unión de la molécula de adhesión celular plaquetaria endotelial 1 (PECAM-1) provoca una disminución de la adhesión de los neutrófilos a la ICAM-1, lo que resulta en la inhibición de la adherencia y la promoción de la diapédesis. Estas fases culminan gracias a las interacciones entre moléculas de adhesión en los neutrófilos y las células endoteliales (Lajo-Flores, 2018). Además de los neutrófilos, otros leucocitos involucrados en procesos inflamatorios también requieren la ayuda de quimioatrayentes para de igual forma facilitar su llegada a la zona de lesión. Estos son moléculas solubles que funcionan para atraer a los leucocitos necesarios a los tejidos afectados. Las quimiocinas son un ejemplo de estos, y también sirven como mediadores en la respuesta proinflamatoria de una lesión, entre las cuales destacan la IL-8, que es un potente quimioatrayente de neutrófilos.

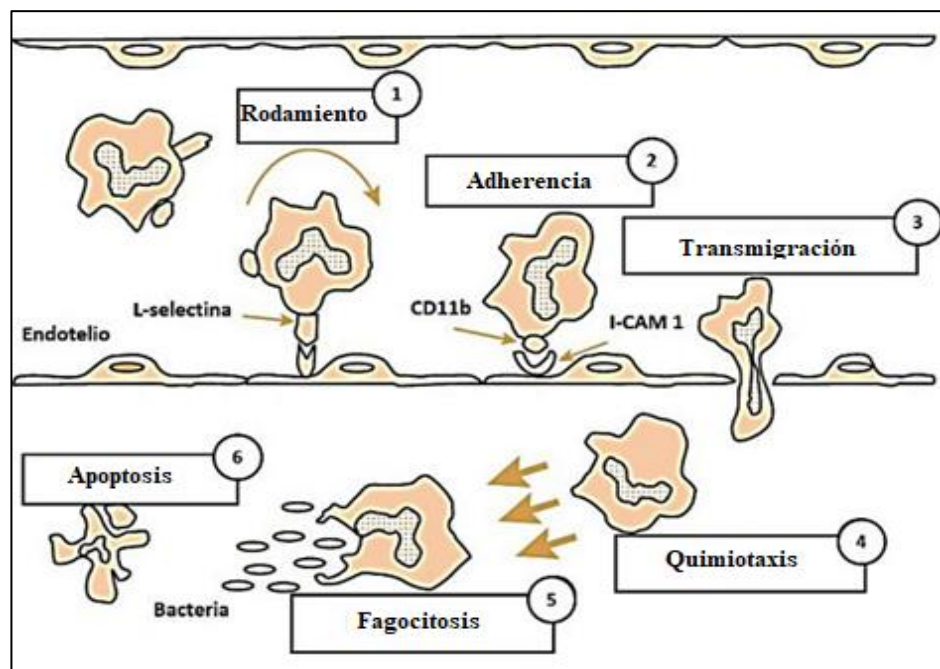


Figura 2. Mecanismo de migración de neutrófilos en el proceso de inflamación. (Lajo- Flores, 2018).

3.10.4 Activación de la cascada de coagulación y sistema de complemento

Muchos de los procesos se activan durante la lesión tisular o la infección, lo mismo ocurre con la cascada de coagulación, la cual se divide en dos vías que como último paso tienen la activación de la trombina con la subsecuente división del fibrinógeno en fibrina. El factor Hageman (factor XII) es una proteína que se sintetiza en el hígado y es el estelar en una activación de una cascada de proteínas, teniendo como resultado la formación de trombina. También se encarga de activar a la vía intrínseca, que es una serie de proteínas plasmáticas que se encarga de ser la vía de coagulación primaria durante la inflamación sistémica. El factor tisular es el producto de las células endoteliales y los monocitos que se da durante los periodos de inflamación en respuesta al factor de necrosis tumoral α (TNF α), IL-1, IL-6 y la proteína C-reactiva. EL factor tisular junto con la activación del factor VII provocan la formación de trombina; esta última junto con el complejo del factor tisular VII pueden inducir la producción de citocinas proinflamatorias como el TNF α por células endoteliales.

La activación de la cascada de coagulación es importante en la formación de coágulos de fibrina, además de que puede potenciar aún más la respuesta inflamatoria (Medzhitov, 2008).

El sistema del complemento entra en activación en respuesta ante un agente patógeno (microbios) y su principal función es la de promover la inflamación y destruir a los mismos agentes. Este sistema se ve asociado con traumatismos y quemaduras mayores, y la cascada del mismo se activa por: 1) los anticuerpos IgM o IgG que están unidos a la superficie de microbios activan la vía clásica; las moléculas que se encuentran en la superficie microbiana se unen al componente C3 del complemento y activan la vía alternativa; y por último la vía lectina es activada por la lectina de unión a manosa (Lajo-Flores, 2018).

3.10.5 Sistema inmunitario innato y adquirido

Este sistema es el primero en accionar ante la respuesta a la invasión de tejido. Las células que intervienen en la inflamación pueden ser de la inmunidad innata como lo son los neutrófilos, macrófagos, mastocitos y células dendríticas a nivel del epitelio; de igual forma las fases de vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular e infiltración celular pertenecen a la respuesta inmune innata (González-Costa, 2018). Mientras que las proteínas como el complemento y la cascada de coagulación están involucradas en la inmunidad innata.

Las citocinas son polipéptidos que son producidos por las células del sistema inmunitario en respuesta a la lesión tisular y determinan la magnitud de la respuesta innata. Además, sirven para regular las reacciones inmunitarias e inflamatorias. Algunas de estas como el $TNF\alpha$ y la IL-1 están encargadas de inducir fiebre y activan células endoteliales.

Por otro lado, la inmunidad adquirida se activa y amplifica por la respuesta inmune innata, y este efecto es mediado por la IL-12. La respuesta inmune adaptativa se activa por la presentación de antígenos extraños a las células T CD4+ y CD8+; y esto provoca que otras citocinas se activen. El interferón gamma ($IFN\gamma$) es la principal célula producida por las células T y este amplifica la respuesta proinflamatoria activando a macrófagos y estimulando funciones citolíticas de las células T CD8+.

3.10.6 Mediadores del proceso inflamatorio

Durante todo el proceso inflamatorio se ven involucrados mediadores que son productos de las células que intervienen en el proceso inflamatorio, o bien, productos del plasma, los cuales son liberados durante la lesión tisular. Se encargan de desactivar la respuesta y permiten que el proceso se resuelva. Los derivados de células son liberados en el sitio de inflamación y algunos de ellos son la histamina, la serotonina, productos del ácido araquidónico (prostaglandinas y leucotrienos) y el factor activador de plaquetas; mientras que los derivados del plasma viajan a través del plasma y son generados principalmente en el hígado (González *et al.*, 1994).

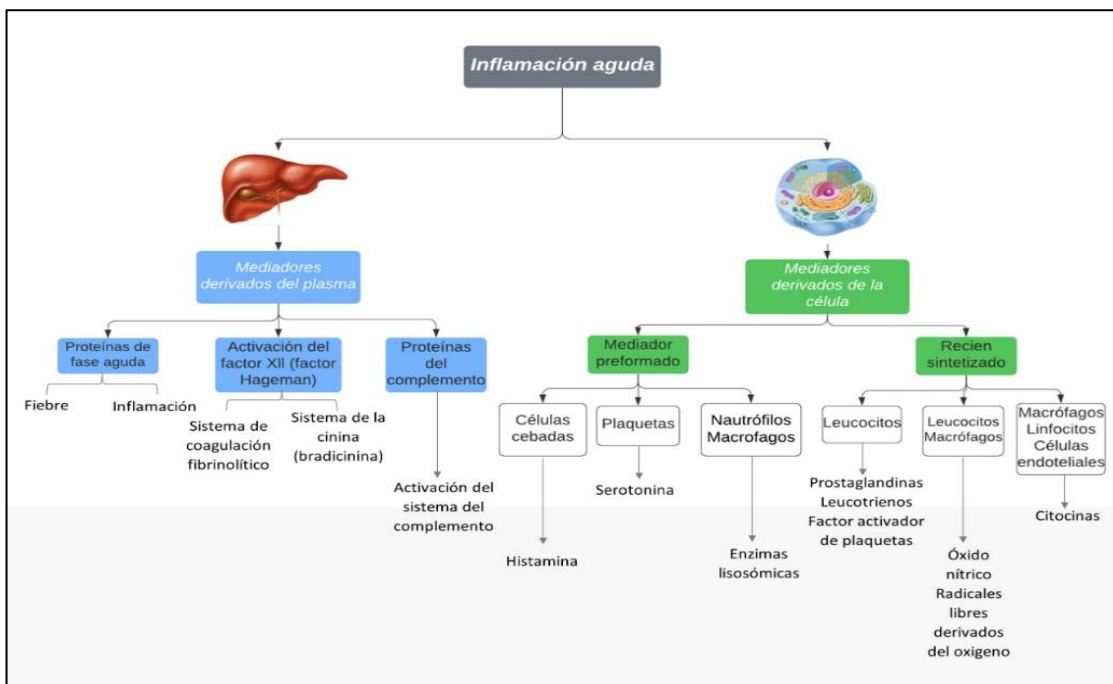


Figura 3. Mediadores de la inflamación derivados del plasma y de las células. (Grossman & Porth, 2013).

3.10.7 Mediadores derivados de las células

- **Histamina:** es una amina biogénica producto de la descarboxilación del aminoácido histidina, que es distribuida ampliamente en el organismo y que se almacena principalmente en el mastocito y basófilo. También está presente en trombocitos y en los gránulos de células cebadas (Grossman & Porth, 2013). Su liberación se da por un aumento de Ca^{+2} citosólico y produce vasodilatación e incrementa la permeabilidad y la formación de las vénulas. Además, la histamina libera citocinas como la IL-1 y el TNF α por los macrófagos. Produce efectos inhibitorios o reguladores al actuar sobre determinados receptores.
- **Serotonina:** es un producto de la descarboxilación del aminoácido triptófano y se almacena en gránulos secretores. Se deriva de mastocitos y forma después de la coagulación de sangre. Funciona como neurotransmisor y como hormona del sistema vascular periférico. Está presente en plaquetas en altas concentraciones. Provoca un aumento de motilidad gastrointestinal, contracción del músculo liso y la agregación plaquetaria la excitación o inhibición del SNC.
- **Adenosina:** es un nucleósido de purina que actúa provocando vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria y libera mediadores de mastocitos e inhibe la migración de eosinófilos (Lajo-Flores, 2018).
- **Metabolitos del ácido araquidónico:** el ácido araquidónico es liberado por la acción de las fosfolipasas y esto desencadena la síntesis de mediadores inflamatorios de la familia de eicosanoides (prostaglandinas, leucotrienos y metabolitos relacionados). Esta síntesis de eicosanoides sigue dos vías: la vía de la ciclooxigenasa, que culmina con la síntesis de prostaglandinas; y la vía de la lipooxigenasa, que su producto final son los leucotrienos (García de Lorenzo *et al.*, 2000).
- **Prostaglandinas:** inducen inflamación y amplían los efectos de la histamina y de otros mediadores inflamatorios. Por ejemplo, el tromboxano A₂ promueve la agregación plaquetaria y vasoconstricción. La prostaglandina E₂ (PGE₂) es la más importante en el proceso inflamatorio pues produce vasodilatación y dolor. Además, contrae los músculos lisos bronquiales, intestinales e inhibe la secreción de ácido gástrico. Las prostaglandinas D₂ (PGD₂) e I₁ (PGI₁) provocan también vasodilatación y la inhibición de la agregación plaquetaria (González *et al.*, 1994).

- **Leucotrienos:** afectan la permeabilidad de vasos capilares, las propiedades de adhesión de las células endoteliales, y la extravasación y la quimiotaxis de neutrófilos, eosinófilos, monocitos y mastocitos. Los leucotrienos C4, D4 y E4 en conjunto se les conoce como sustancia de reacción lenta de la anafilaxia (SRLA) y producen una constricción lenta de los bronquiolos y son mediadores importantes en el asma bronquial y la anafilaxis (Grossman & Porth, 2013).
- **Factor activador de plaquetas (FAP):** es un lípido biológicamente activo que afecta a distintos tipos de células e induce la agregación plaquetaria. También produce vasodilatación, aumento de permeabilidad vascular, activa a los neutrófilos y es un quimioatrayente potente para los eosinófilos (Yost & Zimmerman, 2010).
- **Endotelinas:** son péptidos que actúan como vasoconstrictores y aumentan la liberación de mediadores inflamatorios de una gran variedad de células. La principal es la endotelina 1 (ET1) aumenta la formación de superóxido y libera TNF α en los macrófagos alveolares.

3.10.8 Mediadores derivados del plasma

- **Bradicinina:** son péptidos activos que tienen dos receptores B1 y B2. La bradicinina causa vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Además, actúa como un potente productor de dolor y se ve potenciada por las prostaglandinas.
- **Citocinas:** son proteínas producidas por muchos tipos de célula, principalmente por macrófagos y linfocitos activados y modulan la función de otras células. Las citocinas están divididas en interleucinas, quimiocinas, interferones, factores estimulantes de colonias, factores de crecimiento y factores de crecimiento tumoral (White, 1999) Además de tener un papel importante en las respuestas inmunitarias también desempeñan un papel importante en procesos inflamatorios ya sean agudos o crónicos. Las citocinas inflamatorias más importantes son el TNF α y la IL-1, además participan en la reparación y resolución. Y su fuente celular son los macrófagos activados. La IL-1 también se produce en neutrófilos y en células endoteliales y epiteliales. EL TNF α y la IL-1 son estimuladas por endotoxinas, agentes patógenos, células inmunitarias, la lesión y por distintos estímulos inflamatorios (Grossman & Porth, 2013). Su función, es activar a las

células endoteliales para producir moléculas de adhesión y liberar quimiocinas, especies reactivas de oxígeno y otras citocinas como IL-6, IL-8 y la proteína quimiotáctica de macrófagos (MCP). Las IL-8 y el MCP son altamente quimiotácticos para granulocitos y monocitos. El TNF α y la IL-1 también inducen la liberación de eicosanoides, FAP y óxido nítrico (NO); también liberan citocinas antiinflamatorias como IL-4, IL-10 e IL-13. Estas citocinas se encargan de disminuir la producción de TNF α y de la IL-1 en los monocitos como respuesta a la agresión (García de Lorenzo *et al.*, 2000).

3.10.9 Células que participan en el proceso de inflamación

Las células que intervienen en la inflamación pueden ser de la inmunidad innata como lo son los neutrófilos, macrófagos, mastocitos y células dendríticas a nivel del epitelio. Mientras que los linfocitos T y B son los efectores de la inmunidad adquirida (González-Costa, 2018).

- **Mastocitos:** son una importante fuente de mediadores proinflamatorios y citocinas que promueven la inflamación y cambios vasculares. Se encargan de liberar mediadores como histamina, heparina, leucotrienos, FAP y algunas interleucinas. Se considera que estas células intervienen con la reparación de tejidos (Davis & Rothenberg, 2016).
- **Leucocitos polimorfonucleares (PMN):** los neutrófilos, eosinófilos y basófilos integran este grupo de leucocitos. Los neutrófilos son los más abundantes y los primeros en llegar al sitio de inflamación; actúan como fagocitos de microorganismos y generan productos de oxígeno y nitrógeno que facilitan la destrucción de detritos endocitados. Una vez liberados sus productos químicos, los neutrófilos sufren apoptosis. Los eosinófilos parecen tener cierta función reguladora dentro del proceso inflamatorio mientras que los basófilos, en función con los mastocitos se encargan de liberar mediadores inflamatorios (González *et al.*, 1994).
- **Monocitos y macrófagos:** los monocitos son los precursores circulantes de los macrófagos. Sintetizan mediadores vasoactivos, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas inflamatorias, entre otras. Además, atraen a otros leucocitos a la zona de inflamación, mientras que los macrófagos endocitan porciones y cantidades mayores de detrito en comparación a los neutrófilos y también ayudan a destruir el agente causal.

- **Linfocitos:** generan respuestas inmunes adquiridas y desarrollan un compartimento de memoria para futuras respuestas. Promueven la liberación inmediata de citocinas que ayudan a formar la respuesta adquirida. También ayudan a combatir a los agentes patógenos (González-Costa, 2018).
- **Células endoteliales vasculares:** se encargan de producir agentes antiplaquetarios y antitrombóticos los cuales le dan fluidez al líquido plasmático, además regulan el flujo sanguíneo a través de vasodilatadores y vasoconstrictores (Grossman & Porth, 2013).
- **Trombocitos:** también llamadas plaquetas, son otro tipo de fragmentos celulares que participan en los mecanismos celulares de hemostasia. También incrementan la permeabilidad vascular y alteran las propiedades quimiotácticas, adhesivas y proteolíticas de las células endoteliales, esto a través de mediadores inflamatorios. Pueden generar radicales libres y proteínas catiónicas proinflamatorias, además de tromboxano A2 y FAP (Davis & Rothenberg, 2016).

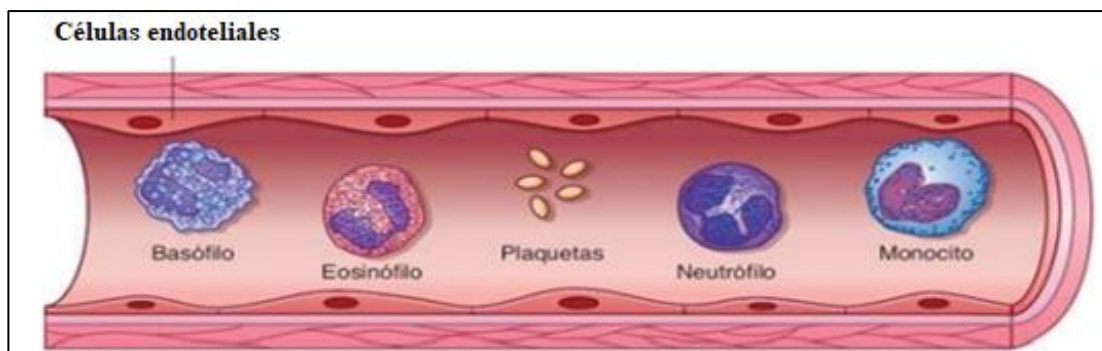


Figura 4. Células que participan en el proceso de inflamación. (Grossman & Porth, 2013).

3.11 Tratamiento farmacológico

Es importante considerar que existe una amplia gama de medicamentos para la inflamación. Debido a que el dolor es el signo cardinal que más impacto presenta durante la inflamación, los medicamentos constan de aliviar tanto el dolor como la inflamación en sí. El objetivo de este pretende disminuir el dolor y la inflamación y prevenir daños severos a la lesión tisular.

Los analgésicos y antiinflamatorios son los principales medicamentos debido a que disminuyen el dolor y la inflamación; los antiinflamatorios no esteroides (AINEs) y corticoides son los más utilizados.

Se deben considerar distintos puntos para aplicar un tratamiento farmacológico, debido a que este debe ajustarse a la evolución del proceso, a las condiciones del paciente, a la respuesta a tratamientos previos y a efectos adversos que se pudieran presentar.

3.11.1 Analgésicos

Actúan para disminuir el dolor y la fiebre, en caso de presentarla. Se utilizan analgésicos simples como el paracetamol, naproxeno, entre otros. Estos fármacos no se consideran como parte del tratamiento básico debido a que no intervienen en el proceso de inflamación y pueden alterar la actividad de otros fármacos (Cabo de Villa, 2020; Rodríguez, 2015).

3.11.2 Antiinflamatorios no esteroides (AINE)

Los AINEs son indicados para controlar o reducir la inflamación y aliviar el dolor por sobre los analgésicos, es decir, proporcionan efectos antiinflamatorios y analgésicos. Pueden reducir la inflamación, pero para algunas enfermedades que son de fondo inflamatorio son incapaces de actuar a fondo, además de que pueden llegar a causar efectos adversos en los pacientes, pero puede ser muy eficaz para aliviar la inflamación en dosis elevadas (Oscanoa-Espinoza, 2015). Estos fármacos tienen como mecanismo de acción el inhibir la síntesis de prostaglandinas mediadas por COX. Antes de iniciar un tratamiento con un AINE se debe tomar en consideración que no debe usarse como fármaco único, además de considerar efectos colaterales, eficacia, costo y horarios de dosificación, además de evaluar el riesgo individual gastrointestinal, cardiovascular y renal del paciente, esto se debe a que pueden llegar a generar daños intestinales como irritación o sangrado y daños renales (Prozzi, 2018).

Existen AINEs no selectivos y selectivos, pero ambos son muy eficaces para aliviar el dolor y reducir la inflamación. Los no selectivos son más antiguos y son considerados como tradicionales, tienen como mecanismo de acción el inhibir a las prostaglandinas, además de que reducen la producción plaquetaria de tromboxano A₂ (TXA₂), que intervienen en procesos inflamatorios; entre los que destacan el ácido acetilsalicílico (aspirina), indometacina, ibuprofeno, entre otros. Por su parte, los AINEs selectivos llevan el nombre porque actúan específicamente sobre una enzima llamada ciclooxigenasa-2, que de igual forma interviene en el proceso inflamatorio. Son designados como COXIBs y destacan el celecoxib, el rofecoxib y el etoricoxib (Rodríguez, 2015; Dowling, 2011).

A pesar de que son fármacos muy utilizados a nivel mundial, pueden llegar a desarrollar una gran cifra de efectos adversos en los pacientes, que pueden llegar a ser desde muy irrelevantes hasta muy graves. Algunos de estos son problemas gastrointestinales, retención de líquidos, hipertensión arterial, enfermedad renal, hipersensibilidad y reacciones alérgicas (Oscanoa-Espinoza, 2015).

3.11.3 Corticoides

Son utilizados por presentar un efecto antiinflamatorio e inmunomodulador de mayor potencia. Estos fármacos funcionan inhibiendo la acción de mediadores proinflamatorios y estimulando la acción de mediadores antiinflamatorios; por lo cual se verá reflejado en células que intervienen en el proceso inflamatorio como macrófagos, mastocitos y granulocitos. Entre los corticoides más utilizados destacan la prednisona, la metilprednisona, el deflacort y la hexacetonida de triamcinolona. Pueden llegar a presentar efectos adversos como retención de líquidos, aumento de peso corporal, entre otros; esto si el tratamiento es prolongado o las dosis son elevadas (Rodríguez, 2015; Barnes, 2006).

3.12 Medicina tradicional en inflamación

La medicina tradicional se ha utilizado con eficacia en el tratamiento de enfermedades crónicas no transmisibles (Solís *et al.*, 2019); muchas de estas presentan inflamación como parte del cuadro fisiopatológico de la enfermedad.

La medicina de origen natural tiene un largo historial en la inflamación y se han investigado especies que han presentado o pueden llegar a presentar un gran potencial para controlar o restaurar la inflamación. Muchas de estas se cree que actúan bloqueando la actividad de las citocinas que intervienen en el proceso inflamatorio, sin embargo, no se tienen registros claros de todas las plantas estudiadas sobre los efectos adversos que puedan llegar a presentar (Cameron, 2011). Estudios preclínicos demuestran efectos inmunosupresores y antiinflamatorios.

Compuestos derivados de las plantas como flavonoides, terpenos, quinonas, catequinas, alcaloides, antocianinas y antoxantinas son de gran importancia debido a los efectos antiinflamatorios que presentan (Khanna *et al.*, 2007). El aceite de plantas como *Oenothera biennis* y *Borago officinalis* se ha comprobado que posee propiedades analgésicas (Cameron, 2011); *Tripterygium wilfordii*, es una planta muy relacionada con inflamación debido a que presenta efectos inmunosupresores y reduce signos y síntomas

de la enfermedad, sin embargo, se cree que los efectos adversos que puede llegar a producir sean graves (Cameron, 2011; Canter *et al.*, 2006). *Curcuma longa* produce un agente llamado curcumina (Figura 5), el cual regula la activación del factor de transcripción NF- κ B, lo que ocasiona la regulación de TNF- α , COX-2 y otros intermedios inflamatorios (Khanna *et al.*, 2007). El resveratrol (Figura 6), agente derivado de plantas como *Vitis vinífera*, *Vaccinium myrtillus* y *Arachis hypogaea* actúa suprimiendo la activación del complejo NF- κ B y regula agentes inflamatorios como COX-2, IL-1 β y la IL-6 (Khanna *et al.*, 2007). El esteroide guggulsterona, presente en la planta *Commiphora wightii* inhibe la activación de NF- κ B y regula la COX-2 (Khanna *et al.*, 2007).

Lin Huang y colaboradores (2016), realizaron una combinación de nueve plantas (*Cinnamomum cassia*, *Paeonia lactiflora*, *Ephedra sínica*, *Anemarrhena asphodeloides*, *Radix glycyrrhizae*, *Saposhnikovia divaricata*, *Aconitum carmichaelii*, *Zingiber officinale* y *Atractylodes macrocephala*) para lograr obtener efectos antiinflamatorios y analgésicos, sin embargo, cada una de estas especies contienen ya sea un efecto antiinflamatorio o analgésico que por sí solas podrían funcionar. Por ejemplo, compuestos de *Cinnamomum cassia* y *Anemarrhena asphodeloides* afectan la vía NK- κ B, *Paeonia lactiflora* posee un compuesto TGP (glucósidos totales de peonía) que actúa como hepatoprotector e inmunoregulator, la *Ephedra sinica* y *Aconitum carmichaelii* intervienen como analgésicos y compuestos de *Zingiber officinale* inhibe la COX-2 y, por lo tanto, reduce la inflamación (Lin Huang *et al.*, 2016).

Otra especie es *Boswellia serrata*, de la familia de Burseras (Burseraceae), de la cual se han obtenido ácidos boswellicos (Figura 7) alfa y beta, los cuales pueden inhibir vías proinflamatorias de la lipooxigenasa o de la ciclooxigenasa (Patel & Savjani, 2015).

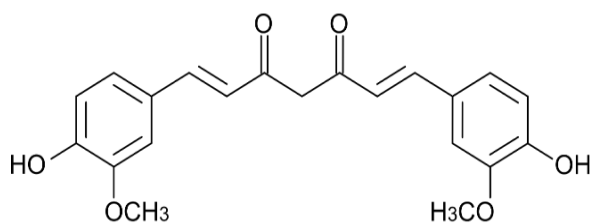


Figura 5. Curcumina.

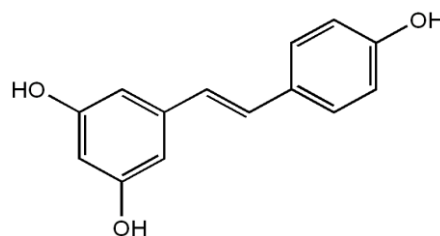


Figura 6. Resveratrol.

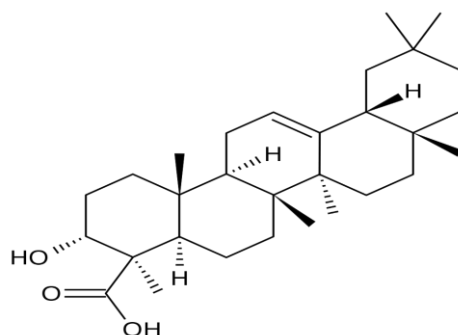


Figura 7. Ácido boswellico.

3.13 Género *Vitex*

3.13.1 Descripción general

El género *Vitex* perteneciente a la familia Lamiaceae (Cantino *et al.*, 1992); anteriormente a la familia Verbenaceae (Moldenke, 1955), incluye aproximadamente 250 especies de árboles y arbustos, y presenta una distribución principalmente en zonas tropicales, subtropicales y templadas en el mundo (Martínez- Gordillo *et al.*, 2013; Williams 2011; Mabberley, 1997). Algunas nativas en zonas templadas de Europa y Asia (Moldenke, 1955); en México se encuentran 4 especies de las cuales 2 son endémicas (Martínez- Gordillo *et al.*, 2013).

Son árboles o arbustos, glabros o pubescentes; con hojas morfológicamente palmado-compuestas con entre 3 a 8 folíolos, unifoliadas, decusadas o verticiladas con peciolo presente; tricomas simples; márgenes enteros o dentados. Presenta inflorescencias axilares o terminales, solitarias o dispuestas en panículas; brácteas similares a las hojas, persistentes y bractéolas generalmente deciduas. Flores pediceladas; el cáliz puede ser actinomorfo a zigomorfo y ligeramente bilabiado, campanulado o tubular, 3-5 lobado o truncado, acrescente; corola zigomorfa y puede ser azul, amarilla, blanca o púrpura; bilabiada, infundibuliforme, 4-5 lobada, tubo recto o curvo; 4 estambres, didínamos unidos cercanamente a base del tubo; por lo general exsertos, tecas dorsifijas, divergentes; ovario 4-locular, globoso, glabro; estilo terminal; estigma bífido; ramas estigmáticas cortas, iguales; fruto en forma de drupa, globosa; pirenos duros; 1-4 semillas oblongas. (Martínez- Gordillo *et al.*, 2013; Moldenke, 1955).

3.13.2 Propiedades y medicina tradicional del género *Vitex*

Muchas de las especies del género *Vitex* se utilizan en la medicina tradicional para combatir enfermedades antiinflamatorias, analgésicas, antimicrobianas, antioxidantes, hepatoprotectoras, antihistamínicas y antiasmáticas es por ello que algunas de estas se

han investigado a fondo para corroborar dichos usos. Algunas de las especies más investigadas son *V. negundo* Linnaeus, *V. trifolia* Linnaeus, *V. doniana* Sweet y *V. cymosa* Bertero, y sus metabolitos secundarios pudiesen ser utilizados como alternativas farmacológicas naturales.

V. negundo L se ha utilizado en la medicina tradicional como tratamiento para el dolor y la inflamación (Tiwari, 2005); además de que se ha demostrado que sus hojas y semillas poseen efectos anticancerígenos y hepatoprotectores, respectivamente (Gacche *et al.*, 2008). Se ha demostrado la presencia de compuestos polifenólicos, terpenoides, iridoides glucosídicos y alcaloides. Debido a la presencia de compuestos polifenólicos, Prakash Tiwari (2005), realizó un estudio para investigar el potencial antioxidante en ensayos *in vitro* de éstos. Además, de ser usado para tratar el reumatismo y para afecciones inflamatorias de las articulaciones. *V. trifolia* L se ha utilizado como terapia para la inflamación, fiebre, tos y como antihelmíntico (Rajan *et al.*, 2012; Chong, 2012). En un estudio se demostró la presencia de constituyentes como flavonoides, taninos, fitosteroles, saponinas y diterpenos (Rajan *et al.*, 2012). Un extracto acuoso de *V. doniana* S fue utilizado en un modelo experimental en hígado de ratas albinas para proteger el daño hepático inducido por CCL₄, donde los resultados sugieren que este extracto puede ser utilizado como hepatoprotector (Ladeji, 1996).

Por otra parte, especies como *V. mollis* K, *V. pyramidata* B.L Rob, *V. pubescens* Valh, *V. agnus-castus* Linnaeus y *V. gaumeri* Greenm se ha demostrado que poseen efectos antidisentéricos, analgésicos, antiinflamatorios y antitumorales, además de ser utilizadas en la medicina tradicional para el tratamiento de picaduras de escorpiones y trastornos gastrointestinales; mientras que especies como *V. glabrata* R.Br, *V. leucoxyton* Linnaeus, *V. penduncularis* Wall, *V. pinnata* Linnaeus y *V. trifolia* L son utilizadas en la India como insecticidas (Kumar *et al.*, 2011).

3.13.3 Fitoquímica del género *Vitex*

V. agnus-castus Linnaeus

Se ha demostrado que *V. agnus-castus* L contiene iridoides, flavonoides, diterpenos y cetosteroides. Extractos metanólicos del tallo de esta especie dieron con 3 nuevos iridoides: agnucastoside A (Figura 8), agnucastoside B (Figura 9) y agnucastoside C (Figura 10) (Kuruuzum *et al.*, 2003). Mientras que del fruto se aisló un nuevo alcaloide de diterpeno de labdano, el vitexlactama A (Figura 11) (Sun *et al.*, 2002). De la corteza de la raíz se han identificado compuestos como la luteolina (Figura 12), la artemetina

(Figura 13) y la isorhamnetina (Figura 14), además de la identificación de 4 nuevos flavonoides: luteolina 6-C- (4''-metil-6'' -O-trans-cafeoylglucoside), luteolin 6-C- (6''-O-trans-cafeoylglucoside), luteolin 6-C- (2'' -O- trans-cafeoylglucoside) y luteolin 7-O- (6''-p-benzoylglucoside) (Lin *et al.*, 2009).

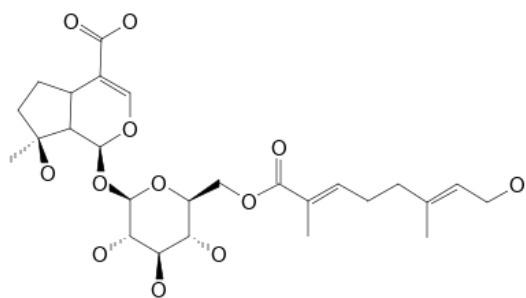


Figura 8. Agnucastoside A.

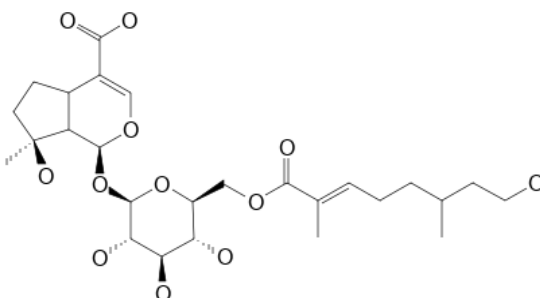


Figura 9. Agnucastoside B.

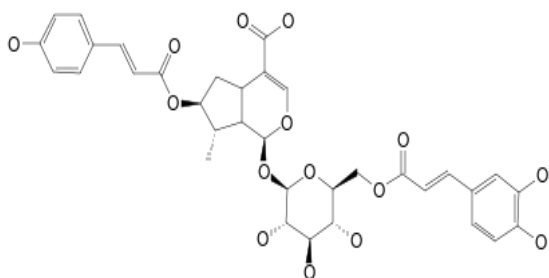


Figura 10. Agnucastoside C.

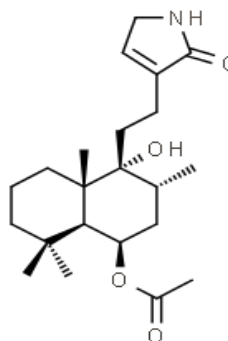


Figura 11. Vitexlactama A.

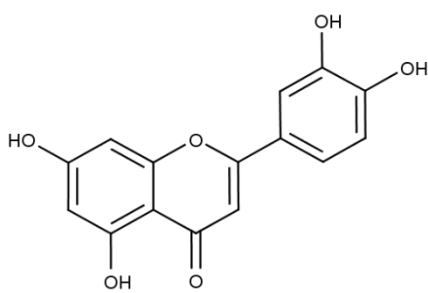


Figura 12. Luteolina.

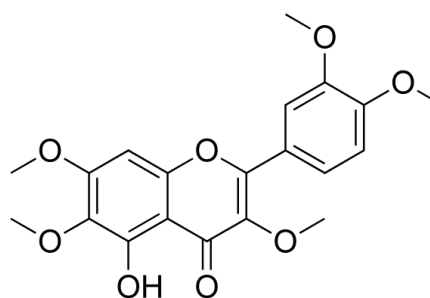


Figura 13. Artemetina.

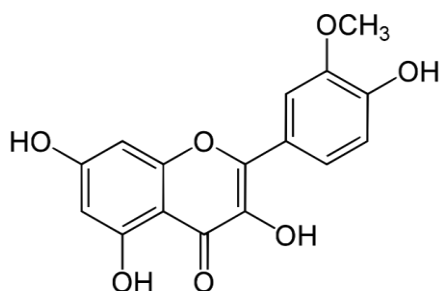


Figura 14. Isorhamnetina.

Vitex negundo Linnaeus

Esta especie está ampliamente estudiada por las propiedades que posee. El extracto etanólico de sus hojas posee ácido (3, 4-dimetoxifenilo) acético (Figura 15), que es utilizado para la elaboración de fármacos, insecticidas y aditivos alimentarios. El extracto metanólico contiene negundoside (Figura 16), agnuside (Figura 17) y vitegnuside; mientras que de extractos metanólicos y hexánicos de la corteza se han aislado ácido p-hidroxibenzoico (Figura 18) y β -sitosterol (Figura 19) (Meena *et al.*, 2011).

Además, se han aislado dos triterpenoides de extractos metanólicos las hojas de *V. negundo*: ácido betulínico (Figura 20) y ácido ursólico (Figura 21) y han sido evaluados contra *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* teniendo resultados leves de la actividad antibacteriana (Chandramu *et al.*, 2003).

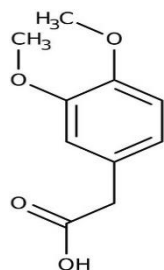


Figura 15. Ácido (3, 4-dimetoxifenilo) acético.

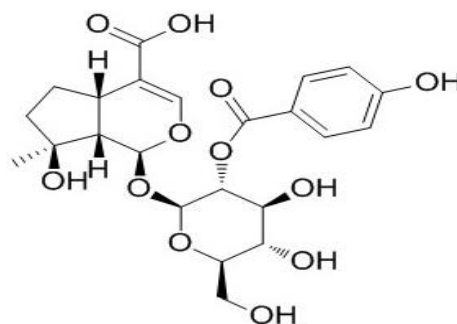


Figura 16. Negundoside.

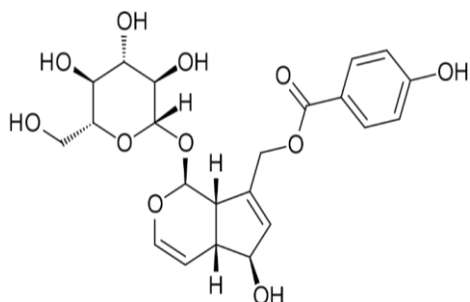


Figura 17. Agnuside.

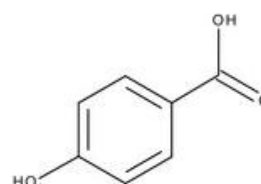


Figura 18. Ácido p-hidroxibenzoico.

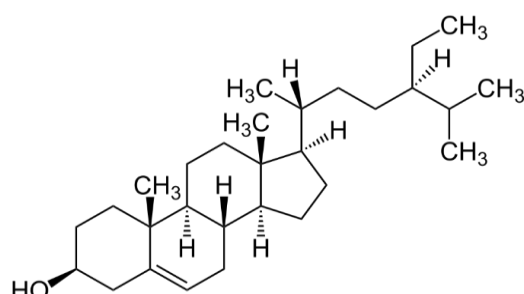


Figura 19. β -sitosterol.

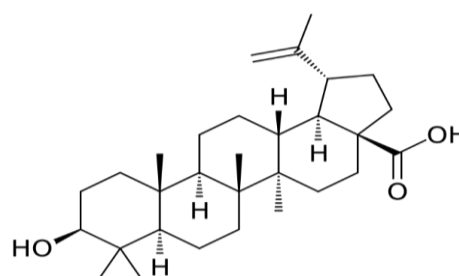


Figura 20. Ácido betulínico.

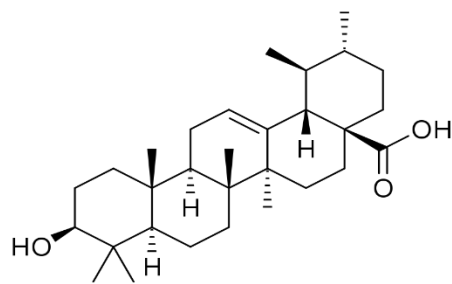


Figura 21. Ácido ursólico.

***Vitex doniana* Sweet**

Posee propiedades antiinflamatorias y analgésicas, y se le da uso para trastornos intestinales, los metabolitos secundarios que se han detectado para esta planta son ecdisteroides conocidos como shidasterona, ajugasterona C, hidroxiecdisona (Figura 22) y 11β , 24 hidroxiecdisona en extractos de metanol de la corteza del tallo; además de tres nuevos fitoecdisteroides 21 hidroxishidasterona, 11β -hidroxio-20-desoxishidasterona y 2,3-acetonido-24-hidroxiecdisona. Todos estos compuestos tienen un efecto inhibidor del edema plantar de ratón inducido por carragenina (Ochieng *et al.*, 2013).

***Vitex trifolia* Linnaeus**

En un estudio se demostró que el compuesto metil-fidroxibenzoato (Figura 23), aislado del extracto metanólico de las hojas de esta planta, tiene posee efecto larvicida sobre especies de moscos (*Culex quinquefasciatus* y *Aedes aegypti*) (Kannathasan *et al.*, 2011). Otros compuestos aislados de extractos de acetona de los frutos de *V. trifolia* como vitexifolina E, vitexifolina F, vitexilactona (Figura 24), 6-acetoxi-9 -hidroxi-13 (14) -labden-16,15-olido y previtexilactona resultaron letales contra epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*, siendo componentes tripanocidas (Kiuchi *et al.*, 2004). Mientras que, en otro estudio se identificó en el extracto de acetona de los frutos, algunos compuestos diterpénicos de tipo abietano, denominado vitetrefolina A, y dos de tipo labdano, denominados vitetrefolinas B y C, junto con tres diterpenos conocidos, rotundifurano dihidrosolidagenona y abietatrieno 3β -ol y el flavonoide casticina (Figura 25). Las estructuras de estos compuestos se aclararon sobre la base de análisis espectroscópico, análisis cristalográfico de rayos X y evidencia química (Ono *et al.*, 2000).

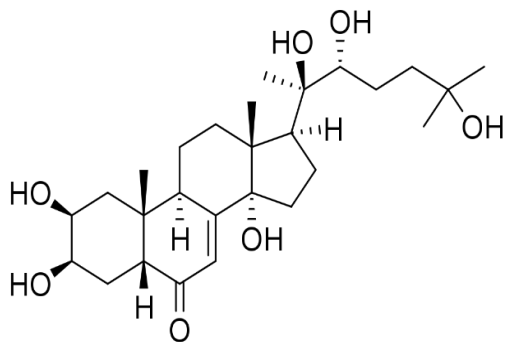


Figura 22. Hidroxicedrona.

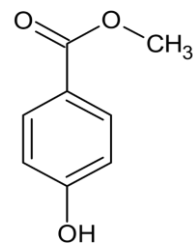


Figura 23. Metil p-hidroxibenzoato.

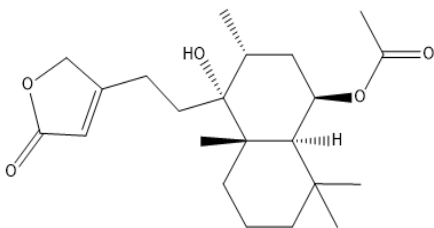


Figura 24. Vitexilactona.

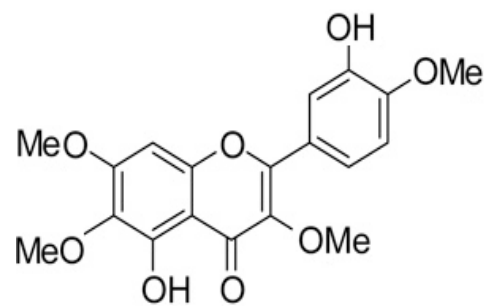


Figura 25. Casticina.

Vitex polygama Cham

Se han descritos compuestos activos aislados mediante extractos hidroalcohólicos de hojas de *V. polígama*. La orientina (Figura 26), isoorientina (Figura 27), schaftósido y carlinósido fueron aislados de dicha especie y son conocidos por sus potentes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes (Gallo *et al.*, 2008).

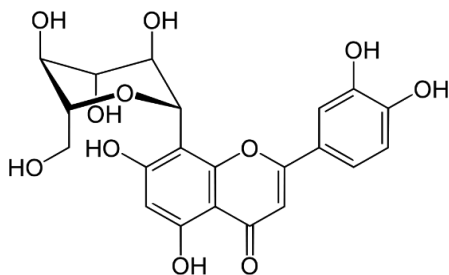


Figura 26. Orientina.

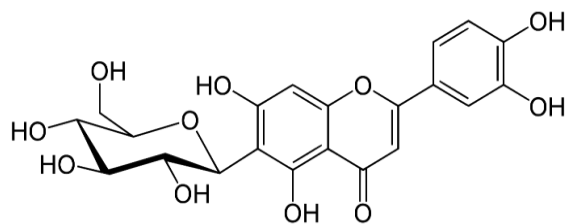


Figura 27. Isoorientina.

Vitex pinnata Linnaeus

Se han aislado del extracto etanólico de la corteza de *V. pinnata* flavonoides conocidos como luteolina, la apigenina (Figura 28) y la vitexina (Figura 29). Además, se logró aislar un glucósido iridoide nuevo, pinnatoside. Este compuesto mostró una modesta actividad antifúngica contra *Candida albicans*. Se ha informado que estos flavonoides y glucósidos iridoide tienen actividad antibacteriana y antifúngica (Ata *et al.*, 2009).

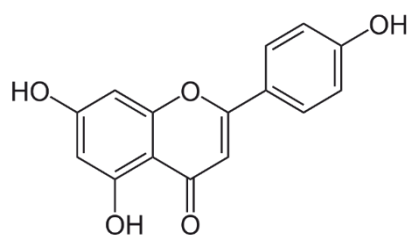


Figura 28. Apigenina.

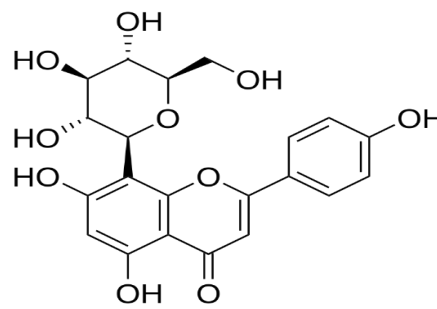


Figura 29. Vitexina.

***Vitex rotundifolia* Linnaeus**

En un estudio se logró identificar una serie de compuestos activos de *V. rotundifolia*, los cuales fueron aislados de extracto de metanol de los frutos y hojas; como el éster metílico del ácido 4-hidroxibenzoico, éster metílico del ácido vainílico, 4-hidroxibenzaldehído (Figura 30), ácido 4-hidroxibenzoico (Figura 31) y ácido ferúlico (Figura 32); también estuvieron presentes los flavonoides 5,5 -dihidroxi-4, 6,7-trimetoxiflavanona, luteolina, vitexicarpina (casticina) y artemetina (Yoshioka *et al.*, 2004); además de reportarse la actividad antioxidante de algunos de éstos (Lee *et al.*, 2013) y también la inhibición del óxido nítrico (Ono *et al.*, 1999).

***Vitex cymosa* Bertero**

Mientras que de *V. cymosa* se ha logrado aislar e identificar una aglicona iridoide con posible efecto hepático y biliar denominada tarumal (Santos *et al.*, 2001).

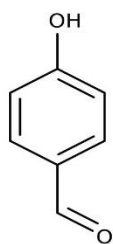


Figura 30. 4-hidroxibenzaldehído.

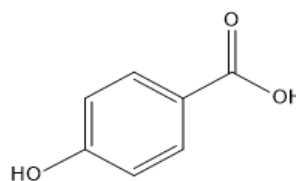


Figura 31. Ácido 4-hidroxibenzoico.

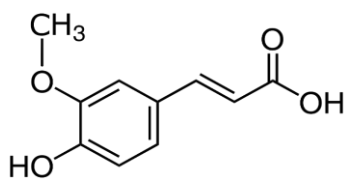


Figura 32. Ácido ferúlico.

3.14 *Vitex mollis* Kunth

3.14.1 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Filo: Tracheophyta

Subfilo: Angiospermae

Clase: Magnoliopsida

Orden: Lamiales

Familia: Lamiaceae

Subfamilia: Viticoideae

Género: *Vitex*

Especie: *Vitex mollis* Kunth



Figura 33. Ejemplar de *Vitex mollis* K. Localidad de Tilzapotla, Puente de Ixtla, Morelos, México. Fotografía tomada por Alexis Ocampo, 2020.

13.14 Descripción

V. mollis Kunth fue descrita por Carl Sigismund Kunth en 1818 y es conocido comúnmente como coyotomate, capulincillo, nanche de perro, uvalama, igualama, taruma y aguilote.

Es un árbol que puede llegar a alcanzar hasta los 18 metros de altura. Posee hojas trifoliadas, decusadas, de hasta 21.5 cm de largo, densamente pubescentes y de color amarillo ferruginoso. Foliolos elípticos y angostamente obovados. Las flores son de hasta 5 cm de largo, pubescentes, fragantes, bilabiadas, labio superior blanco e inferiores lila pálido, el central es más grande lila y con una mancha amarilla con líneas lila en el cuello. Frutos en forma de drupa carnosa, globosa, con base cóncava y morado oscuro (Naturalista, 2021)

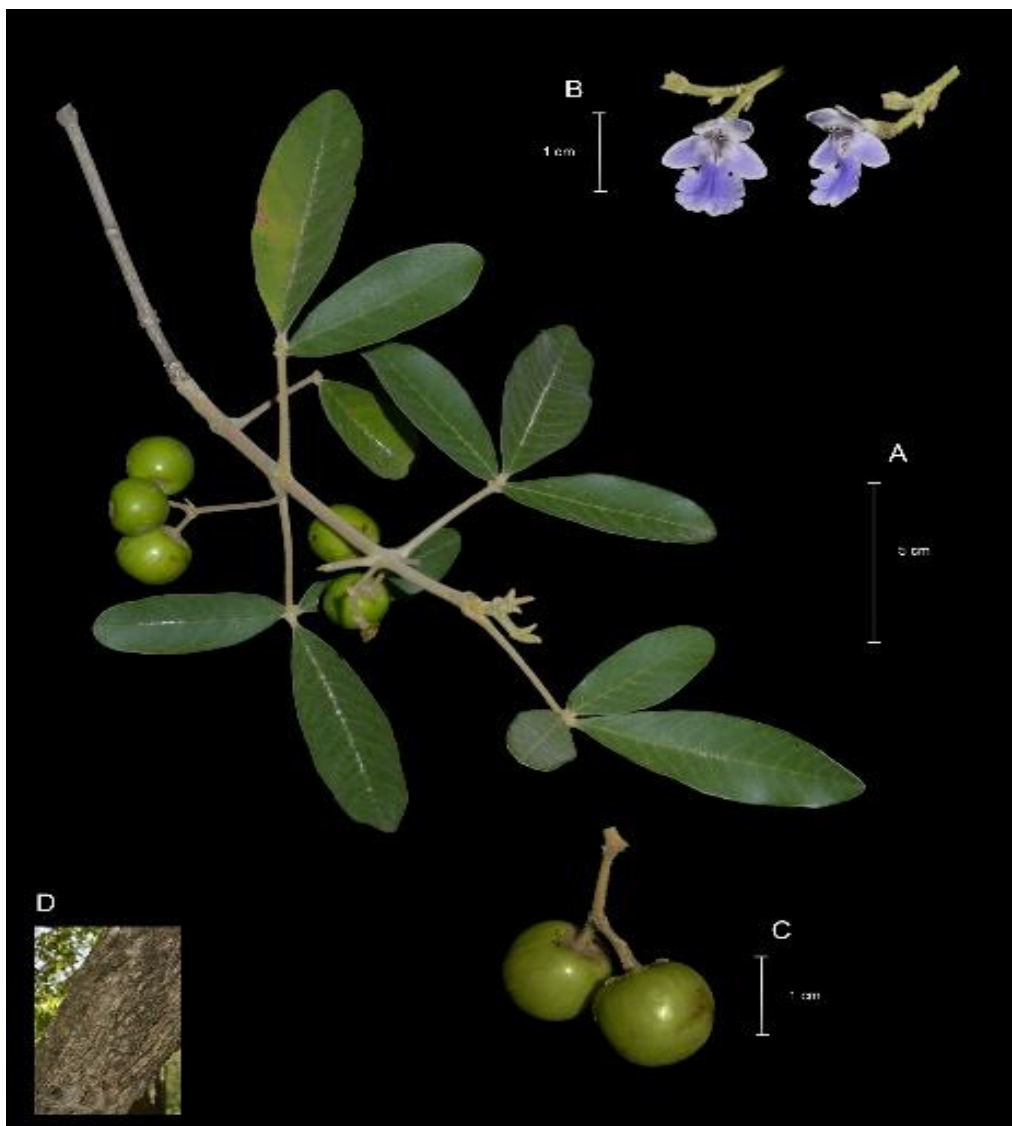


Figura 34. Partes aéreas de *Vitex mollis*. (Dorado y Cuevas, 2021).

3.14.3 Hábitat y distribución

Habita en selva mediana subcaducifolia y caducifolia, en climas cálidos y semicálidos y puede crecer en zonas montañosas, a orillas de arroyos y riachuelos. Se distribuye desde

centro América (México) por toda la vertiente del pacífico desde Sonora y Chihuahua hasta Oaxaca, incluyendo la cuenca del Río Balsas y la zona seca de Oaxaca, hasta la parte norte de Sudamérica (Naturalista, 2021).

3.14.4 Usos medicinales y propiedades farmacológicas

Se ha utilizado *V. mollis* en la medicina tradicional como tratamiento para diarrea, fiebre, disentería y cólico abdominal; además de que su fruto es utilizado en algunos pueblos indígenas como tratamiento para picaduras de escorpiones y trastornos gastrointestinales (Meena *et al.*, 2011, Montiel-Herrera *et al.*, 2004).

Se ha demostrado que posee propiedades antiinflamatorias y analgésicas (Morales del Río *et al.*, 2015; Meena *et al.*, 2011); antitumorales (Pío-León *et al.*, 2014; Meena *et al.*, 2011), antioxidantes (Montes-Ávila *et al.*, 2018; Morales del Río *et al.*, 2015; Pío-León *et al.*, 2014; Cuevas-Juárez *et al.*, 2014); antiprotozoarias (Tapia-Pérez *et al.*, 2003), antiespasmódicas (Osuna *et al.*, 2005); antibacterianas (Valencia-Botín *et al.*, 2018; Osuna *et al.*, 2005; Pío-León *et al.*, 2014) e inmunomoduladoras (Montes-Ávila *et al.*, 2018).

Morales del Río y col. (2015) midieron la actividad antiinflamatoria y antioxidante en extractos de *V. mollis*, obteniendo como resultado una actividad antiinflamatoria en compuestos hexánicos (de hojas y tallo); mientras que extractos metanólicos presentaron altas propiedades antioxidantes. Por otro lado, un estudio demostró que con poca cantidad de extracto (metanólico, acetónico y hexánico) de hoja y tallo se pueden inhibir bacterias como *E. Coli*, *Salmonella entérica* y especies de hongo *Fusarium* que son de gran importancia médica y en agricultura. Por tal motivo, esta especie tiene un gran potencial para combatir enfermedades bacterianas y ser de utilidad para la industria agrícola (Valencia-Botín *et al.*, 2018). También se han tratado infecciones gastrointestinales por *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia* obteniendo resultados positivos, por lo cual, posee actividad antiprotozoaria (Tapia-Pérez, 2003).

Otras investigaciones, señalan que el fruto preparado como melaninas acuosas solubles y parcialmente purificadas a partir de la pulpa comestible del fruto, se analizaron para determinar el contenido total de fenoles, las actividades como antioxidante y la inhibición de la α -glucosidasa y acarbosa (importantes enzimas en el control de la obesidad) (Cuevas-Juárez *et al.*, 2018). Recientes investigaciones enfocadas también en las melaninas del fruto se han enfocado en las propiedades fisicoquímicas, antioxidantes e inmunomoduladoras de estas. Los resultados demuestran que las melaninas se

biosintetizan a partir de la tirosina y tienen potencial como agentes fotoprotectores y podrían considerarse para el tratamiento de enfermedades crónico-degenerativas (Montes-Ávila *et al.*, 2018).

3.14.5 Fitoquímica de *Vitex mollis*

En cuanto a los compuestos aislados no se tienen muchos registros. Del extracto metanólico de las hojas de *V. mollis* se pudo aislar un iridoide ya descrito, la agnuside (Figura 35) (Hansel & Winde, 1959); que se ha demostrado que tiene un efecto inhibitor de COX-2 en el proceso inflamatorio (Ramírez- Cisneros *et al.*, 2015).

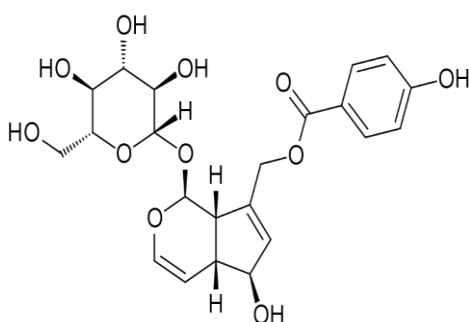


Figura 35. Agnuside.

3.15 Modelos farmacológicos

3.15.1 Fundamento de la prueba de inflamación por TPA

Una administración tópica de TPA está caracterizado por inflamación, edema y la infiltración de leucocitos (Bralley *et al.*, 2008). El TPA es un agente que promueve tumores y es un activador de proteína quinasa C y es muy utilizado para la inducción inflamatoria cutánea en animales de experimentación (Rao *et al.*, 1993); liberando ácido araquidónico, cuyos metabolitos son capaces de actuar como mediadores en procesos inflamatorios. La inflamación se atribuye a COX y lipoxigenasas (LO), esto se debe a que las LO contienen ácido 5-hidroxieicosatetraenoico (ácido 5-HETE) que es un quimiotáctico que promueve la agregación y adhesión de leucocitos al endotelio vascular y esto provoca la liberación de enzimas lisosomales (Carlson *et al.*, 1985; Bralley *et al.*, 2008).

3.15.3 Fundamento del edema plantar por carragenina

El edema planta por carragenina es una de las técnicas más utilizadas para evaluar el efecto antiinflamatorio de algún compuesto bioactivo, el cual está basado en medir la

inhibición del edema producido en la pata de las ratas (Lajo-Flores, 2018). La carragenina es un polisacárido sulfatado formado por unidades de galactosa y anhidrogalactosa, y es un producto que deriva de especies de rodófitas o algas rojas (Rhodophyta) (Ou *et al.*, 2019). Los signos cardinales de inflamación (edema, hiperalgesia y eritema) se desarrollan inmediatamente después de la inyección subcutánea (Morris, 2003). Este agente produce una respuesta que desencadena distintas vías inmunitarias innatas de la inflamación, además de que estimula la producción de mediadores inflamatorios como lo son las prostaglandinas, tromboxanos, histamina, entre otros (Vázquez *et al.*, 2015). Durante la primera fase (0-1 h) el proceso inflamatorio da inicio por la liberación de algunos mediadores inflamatorios como lo son la histamina, bradicinina y serotonina; mientras que en una segunda fase (1-4 h) existe una liberación de prostaglandinas y hay una infiltración de neutrófilos, lo cual desencadena la activación de otros mediadores que potencian la respuesta inflamatoria, tal es el caso de los radicales libres. Se estima que el mayor pico de inflamación se da aproximadamente a las 3 horas después de inyectar el agente irritante (Yueqin, Z, 2006).

4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Extractos y fracciones de las hojas de *V. mollis* inhibirán el crecimiento del edema en oreja de ratón y plantar inducidos químicamente?

5. HIPÓTESIS

Especies del género *Vitex* han demostrado actividad antiinflamatoria, por lo tanto, *Vitex mollis* presentará dicho efecto en alguno de los dos modelos propuestos en este trabajo de investigación.

6. JUSTIFICACIÓN

La inflamación es un conjunto de eventos celulares con los que cuentan los organismos para contrarrestar el daño derivado de las agresiones del entorno. Sin embargo, cuando ésta se sale de control se convierte en uno de los puntos clave que perpetúan el deterioro y es la base de una gran variedad de enfermedades crónico-degenerativas. Las principales drogas antiinflamatorias son los AINEs y corticoides, desafortunadamente este tipo de compuestos, pueden generar importantes efectos adversos, que afectan la condición del paciente. Debido a esto, la búsqueda de mejores tratamientos sigue vigente, y son las

plantas medicinales uno de los primeros objetos de estudio en dicha exploración para llegar al desarrollo de novedosos fitomedicamentos. Dentro del género *Vitex*, diferentes especies han sido evaluadas con buenos resultados sobre sus propiedades antiinflamatorias, por lo que en el presente proyecto se propuso trabajar con una especie de dicho género, la cual se encuentra ampliamente distribuida en México y en el Estado de Morelos.

El conjunto de eventos celulares asociados a la inflamación, pueden ser reproducidos por diversos agentes químicos que causan irritación, edema, rubor, comezón local, y que han sido ampliamente validados en laboratorios a nivel internacional. Dos de estas sustancias son el 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol que de manera aguda es usado para generar inflamación en la oreja de ratón; y la carragenina que al ser aplicada en el cojinete plantar de un roedor inicia el edema, cuya gravedad es dependiente del tiempo.

Ambos, fueron utilizados en este trabajo para evaluar la capacidad antiinflamatoria de extractos y fracciones químicamente menos complejas, provenientes de *Vitex mollis*. Para posteriormente, realizar una caracterización química de la fracción más activa, utilizando métodos cromatográficos.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad antiinflamatoria de los extractos de diferente polaridad de *Vitex mollis*, utilizando los modelos de edema de pabellón auricular y de edema plantar en ratón.

7.2 Objetivos particulares

- Obtener dos extractos de *Vitex mollis*, que sean diferentes en su composición basado en la polaridad del disolvente de extracción.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de extractos orgánicos y fracciones de *Vitex mollis*, en el bioensayo de edema del pabellón auricular de ratón inducido con TPA.
- Evaluar el efecto antiinflamatorio de extractos orgánicos y fracciones de *Vitex mollis*, en el bioensayo de edema plantar inducido con carragenina.
- Determinar el grupo de metabolitos secundarios presentes, mediante técnicas de cromatografía en capa fina y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

8. MATERIALES Y REACTIVOS

8.1 Colecta de material biológico

La especie fue colectada el mes de julio del 2020 en la localidad de Tilzapotla en Puente de Ixtla, Morelos, de la cual una muestra se depositó en el herbario de la Universidad Autónoma de Estado de Morelos (CIByC-UAEM). La identificación taxonómica estuvo a cargo del M en C Gabriel Franco Flores, botánico e investigador del Centro de Investigación en Biodiversidad y Conservación (CIByC) con número de registro 39812 (Anexo a). Fueron colectados 3.500 kg de hoja fresca para al final obtener 1.200 kg de hoja seca.

8.2 Animales de experimentación

Se utilizaron ratones macho de la cepa Balb-C con un peso aproximado de 25-30 g proporcionados por el bioterio Centro Médico Nacional-Siglo XXI. Los experimentos se realizaron bajo la Norma Oficial Mexicana: Pautas NOM-062-ZOO-1999 (Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio) y pautas éticas internacionales para el cuidado y uso de animales experimentales. El protocolo experimental fue autorizado por el Comité Local de Investigación en Salud (IMSS, número de registro: R-2010-1701-33). Los ratones se mantuvieron a una temperatura de $22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$, $70\% \pm 5\%$ de humedad con ciclos de luz/oscuridad de 12 h y comida /agua.

9. METODOS

9.1 Extracción de hexano y acetato de etilo de *V. mollis*

El material vegetal (hojas) fue secado a la sombra, para posteriormente ser triturado en un molino. Con el producto obtenido (0.0 g) se realizó la maceración con dos disolventes (hexano y acetato de etilo) por 24 horas cada uno (uno después del otro). Una vez concentrado el disolvente con el material biológico se evaporó a presión reducida en un evaporador rotatorio marca BUCHI 205. Esta técnica se llevó a cabo con cada uno de los disolventes previamente dejando secar el material biológico. Cabe mencionar que este proceso se realizó cuidando la polaridad de cada disolvente, comenzando de baja (hexano) a media (acetato de etilo) polaridad. Obteniendo 13.9 g de extracto de hexano y 20.1 g de extracto de acetato de etilo.

9.2 Fraccionamiento del extracto de acetato de etilo de *V. mollis*

El extracto en hoja de acetato de etilo mostró una mayor inhibición en el modelo de edema de oreja de ratón inducido por TPA, por tal motivo se realizó el fraccionamiento químico del mismo. Se tomaron 17 g de VMaCOEt para ser absorbidos en 20 g de sílice para posteriormente ser separados en una columna cromatográfica abierta, la cual se empaquetó con 80 g de sílice en 100 % de hexano; para después, eluir con gradientes de hexano- acetato de etilo 95%-5% respectivamente; después se prosiguió la elución con hexano- acetato de etilo 90%-10% y así seguir el patrón (10 en 10) hasta llegar a hexano- acetato de etilo 50%-50%. Por último, la columna cromatográfica se limpió primero con acetato de etilo (100%); después con acetona (100%); para finalizar con metanol (100%). De este proceso se obtuvieron 43 fracciones de 100 ml de las cuales las que mostraron patrones similares en Cromatografía en Capa Fina (CCF) fueron agrupadas de acuerdo con su contenido químico obteniendo 14 sub-fracciones (Tabla 1). El proceso de separación fue comprobado por medio de CCF la cual utilizo TLC sílica gel 60 F254 (Merck, Alemania) así como los disolventes hexano, acetato de etilo y metanol. Las placas fueron reveladas con sulfato cérico amoniacal en H₂SO₄ 2N y 2-aminoetildifenilborinato (Flavonoides).

Tabla 1. Fraccionamiento del extracto de hoja de acetato de etilo de *Vitex mollis* (VMC1).

Polaridad del sistema	Fracciones	Sub-fracciones	Clave	
Hexano (100%)	1-5	1	1-2	VMC1R1
Hexano-AcOEt (95%:5%)	6-10	2	3-6	VMC1R2
Hexano-AcOEt (90%:10%)	11-15	3	7-8	VMC1R3
Hexano-AcOEt (80%:20%)	16-20	4	9-12	VMC1R4
Hexano-AcOEt (70%:30%)	21-25	5	13-14	VMC1R5
Hexano-AcOEt (60%:40%)	26-30	6	15-16	VMC1R6
Hexano-AcOEt (50%:50%)	31-35	7	17-19	VMC1R7
AcOEt (100%)	36-37	8	20-22	VMC1R8
Acetona (100%)	38	9	23-25	VMC1R9
Metanol (100 %)	39-43	10	26-27	VMC1R10
		11	28-32	VMC1R11
		12	33-36	VMC1R12
		13	37-39	VMC1R13
		14	40-43	VMC1R14

El análisis cromatográfico en capa fina de las sub-fracciones VMC1R7, VMC1R12 Y VMC1R13 en un sistema hexano-acetato de etilo (6:4) reveladas con 2-aminoetildifenilborinato dio positiva para flavonoides (Figura 36 y 37) (Billeter *et al.*, 1990). Estas sub-fracciones fueron probadas en el modelo de TPA, siendo la sub-fracción VMC1R13 la que presentó una mayor actividad antiinflamatoria, por tal motivo se sometió a HPLC para poder identificar algún compuesto activo. Para un segundo fraccionamiento químico se utilizaron 3 g de VMC1R13 y 500 mg fueron almacenados a 4 °C para su uso en las pruebas biológicas.

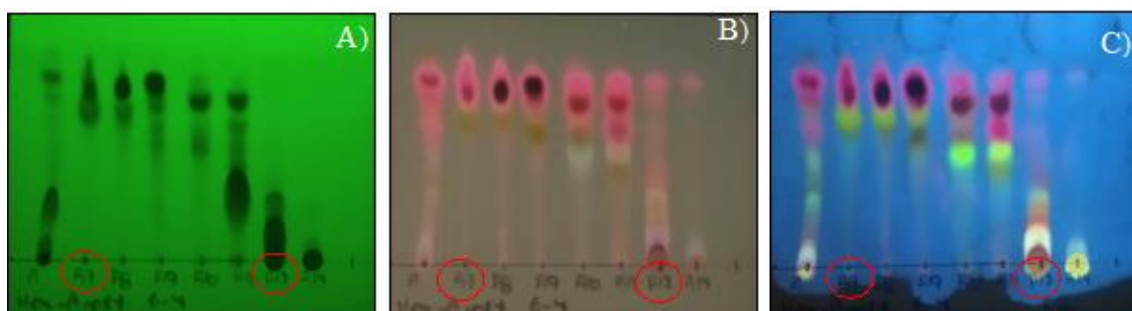


Figura 36. Cromatografía en capa fina en fase normal (FN) vista en luz UV de las sub-fracciones VMC1R7 y VMC1R13 (en círculo rojo). Sistema 6:4 hexano-acetato de etilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.

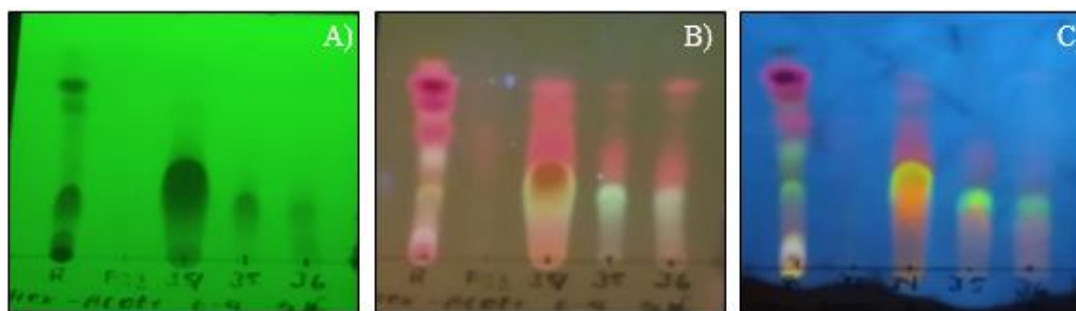


Figura 37. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de las fracciones 33-36 (VMC2R-12). Sistema 6:4 hexano-acetato de etilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.

9.3 Fraccionamiento de la reunión VMC1R13

Se tomaron 3 g de VMC1R13 para ser absorbidos en 5 g de sílice para posteriormente ser separados en una columna cromatográfica abierta, la cual se empaquetó con 12 g de sílice en 100 % de hexano; para después, eluir con gradientes de hexano- acetato de etilo 90%-10% respectivamente; después se prosiguió la elución con hexano- acetato de etilo 85%-15%; seguido de 80%-20% y así seguir el patrón (10 en 10) hasta llegar a hexano- acetato

de etilo 50%-50%, para después utilizar un sistema de 30%-70%. Por último, la columna cromatográfica se limpió con metanol (100%). De este proceso se obtuvieron 42 fracciones de 100 ml de las cuales las que mostraron patrones similares en CCF fueron agrupadas de acuerdo a su contenido químico obteniendo 14 sub-fracciones (Tabla 2).

Tabla 2. Fraccionamiento de la reunión VMC1R13.

Polaridad del sistema	Fracciones	Sub-fracciones	Clave
Hexano (100%)	1-5	1 (1-6)	VMC2R1
Hexano-AcOEt (90%-10%)	6-10	2 (7)	VMC2R2
Hexano-AcOEt (85%-15%)	11-15	3 (8-9)	VMC2R3
Hexano-AcOEt (80%-20%)	16-20	4 (10-11)	VMC2R4
Hexano-AcOEt (70%-30%)	21-25	5 (12)	VMC2R5
Hexano-AcOEt (60%-40%)	26-30	6 (13-15)	VMC2R6
Hexano-AcOEt (50%-50%)	31-35	7 (16-17)	VMC2R7
Hexano-AcOEt (30%-70%)	36-40	8 (18-22)	VMC2R8
Metanol (100%)	41-42	9 (23-25)	VMC2R9
		10 (26-27)	VMC2R10
		11 (28-30)	VMC2R11
		12 (31-34)	VMC2R12
		13 (35-39)	VMC2R13
		14 (40-42)	VMC2R14

El análisis mediante CCF de las sub-fracciones VMC2R11 y VMC2R12 en un sistema diclorometano-acetona (8:2) reveladas con 2-aminoetildifenilborinato dio positiva para flavonoides (Figura 38). Estas fueron sometidas en HPLC para poder identificar algún compuesto activo.

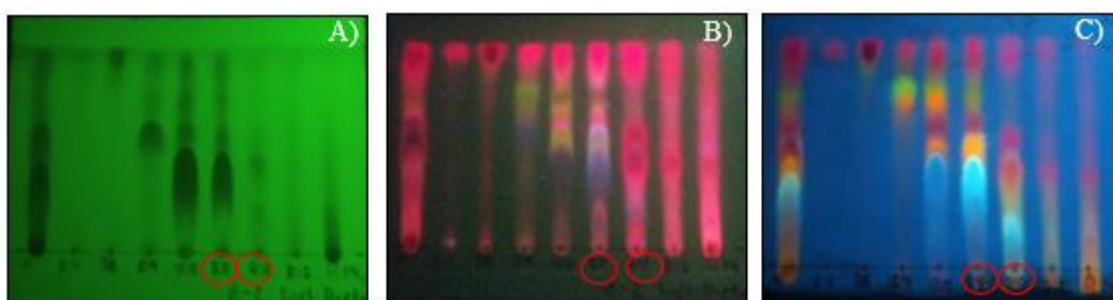


Figura 38. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de las sub-fracciones VMC2R11 y VMC2R12. Sistema 8:2 diclorometano-acetona. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.

Una tercera cromatografía en columna en fase reversa de la sub-fracción 12 (VMC2R12) permitió separar 0.7 g de la misma y una cuarta cromatografía en columna en fase normal de la sub-fracción R11 (VMC2R11) permitió separar 0.5 g.

9.4 Fraccionamiento de la reunión VMC2R12

Se tomaron 0.7 g de VMC2R12 para ser absorbidos en 1 g de sílice fase normal y 1 g de sílice gel fase reversa para posteriormente ser separados en una columna cromatográfica abierta, la cual se empaquetó con 8 g de sílice de fase reversa iniciando con un sistema de 100 % agua (H₂O); para después, eluir con gradientes de H₂O–Acetonitrilo 95%-5% respectivamente; siguiendo el patrón (5 en 5) hasta llegar a H₂O–Acetonitrilo 65%-35%. Por último, la columna cromatográfica se limpió con metanol (100%). Se obtuvieron 43 fracciones de 10 ml de las cuales las que mostraron patrones similares en CCF fueron agrupadas de acuerdo a su contenido químico obteniendo 9 sub-fracciones (Tabla 3).

El análisis mediante CCF en fase reversa (FR) de las sub-fracciones VMC3R3 y VMC3R6 en un sistema 5-5 H₂O/acetonitrilo reveladas con 2-aminoetildifenilborinato dio positiva para flavonoides (Figura 39). Estas fueron sometidas en HPLC para poder identificar algún compuesto activo. Además, la fracción VMC3R6 fue sometida a una evaluación antiinflamatoria.

Tabla 3. Fraccionamiento de la reunión VMC2R12.

Polaridad del sistema	Fracciones	Sub-fracciones	Clave
H ₂ O (100%)	1-5	1 (1-5)	VMC3R1
H ₂ O-Acetonitrilo (95%-5%)	6-10	2 (6-10)	VMC3R2
H ₂ O-Acetonitrilo (90%-10%)	11-15	3 (11-18)	VMC3R3
H ₂ O-Acetonitrilo (85%-15%)	16-20	4 (19-22)	VMC3R4
H ₂ O-Acetonitrilo (80%-20%)	21-25	5 (23-27)	VMC3R5
H ₂ O-Acetonitrilo (75%-25%)	26-30	6 (28-29)	VMC3R6
H ₂ O-Acetonitrilo (70%-30%)	31-35	7 (30-34)	VMC3R7
H ₂ O-Acetonitrilo (65%-35%)	36-40	8 (35-40)	VMC3R8
Metanol (100%)	41-43	9 (41-43)	VMC3R9

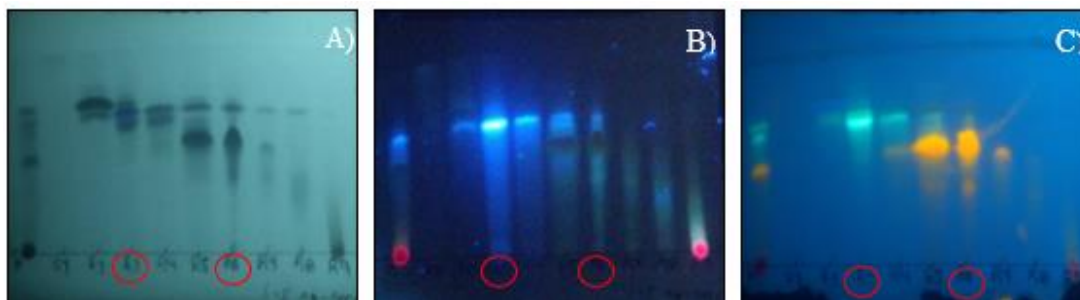


Figura 39. Cromatografía en capa fina FR vista en luz UV de las sub-fracciones VMC3R3 y VMC3R6. Sistema 5-5 H₂O/acetonitrilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides

9.5 Fraccionamiento de la reunión VMC2R11

Se tomaron 0.5 g de VMC2R11 para ser absorbidos en 2 g de sílice para posteriormente ser separados en una columna cromatográfica abierta, la cual se empaquetó con 10 g de sílice en 100 % de diclorometano; para después, eluir con gradientes de hexano- acetato de etilo 90%-10% respectivamente; después se prosiguió la elución con diclorometano-acetona 98%-2; siguiendo el patrón (2 en 2) hasta llegar a diclorometano-acetona 86%-14%, para después utilizar un sistema de 50%-50%. Por último, la columna cromatográfica se limpió con acetona (100%). De este proceso se obtuvieron 47 fracciones de 10 ml de las cuales las que mostraron patrones similares en CCF fueron agrupadas de acuerdo a su contenido químico obteniendo 9 sub-fracciones (Tabla 4).

Tabla 4. Fraccionamiento de la reunión VMC2R11.

Polaridad del sistema	Fracciones	Sub-fracciones	Clave
Dicloro-Acetona (100%)	1-8	1 (1-10)	VMC4R1
Dicloro-Acetona (98%-2%)	9-13	2 (11-20)	VMC4R2
Dicloro-Acetona (96%-4%)	14-18	3 (21-24)	VMC4R3
Dicloro-Acetona (94%-6%)	19-23	4 (25-28)	VMC4R4
Dicloro-Acetona (92%-8%)	24-28	5 (29-30)	VMC4R5
Dicloro-Acetona (90%-10%)	29-33	6 (31-33)	VMC4R6
Dicloro-Acetona (88%-12%)	34-38	7 (34-38)	VMC4R7
Dicloro-Acetona (86%-14%)	39-41	8 (39-41)	VMC4R8
Dicloro-Acetona (86%-14%)	42-44	9 (42-47)	VMC4R9
Acetona (100%)	45-47		

Al monitorear las CCF en FN y FR de las fracciones VMC4F25 y VMC4F31 en sistemas 5-5 hexano-acetato de etilo y 5-5 H₂O/acetonitrilo reveladas con 2-aminoetildifenilborinato dio positiva para flavonoides (Figura 40, 41 y 42). Estas fracciones fueron sometidas en HPLC para identificar algún compuesto activo.



Figura 40. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de la fracción VMC4F25. Sistema 5-5 hexano-acetato de etilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.

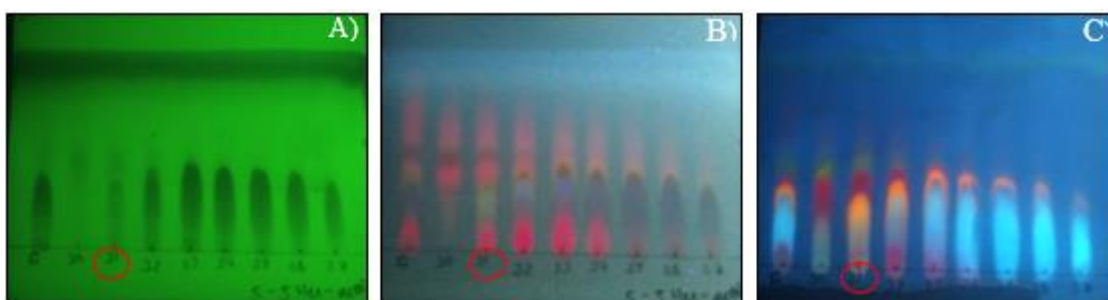


Figura 41. Cromatografía en capa fina FN vista en luz UV de la fracción VMC4F31. Sistema 5-5 hexano-acetato de etilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.

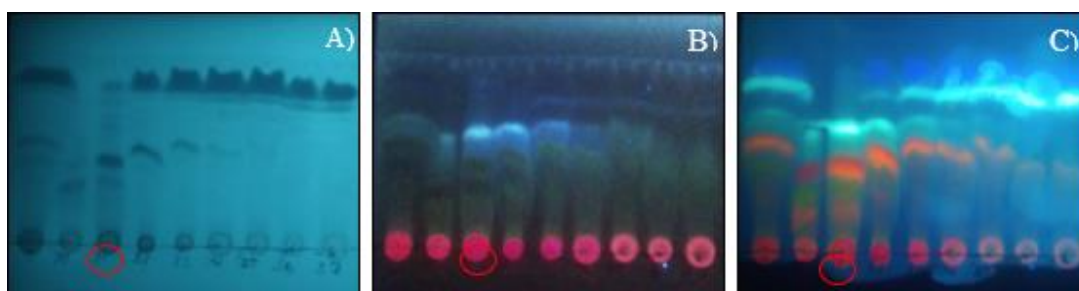


Figura 42. Cromatografía en capa fina FR vista en luz UV de la fracción VMC4F31. Sistema 5-5 H₂O-acetonitrilo. A) Onda corta, B) Onda larga y C) Revelador Flavonoides.

9.6 Modelos experimentales

9.6.1 Modelo de inflamación aguda en ratones con TPA

La inflamación se indujo siguiendo el método descrito previamente (Payá *et al.*, 1993). Se agruparon los ratones (seis individuos) y se les aplicó TPA (2.5 µg) disuelto en acetona (20 µL) en la superficie interna y externa de la oreja derecha para causar edema. Se aplicaron dosis de 1 mg / oreja de cada tratamiento (extracto) en la oreja de cada individuo. El fármaco antiinflamatorio indometacina fue administrado a 1 mg/oreja. Todos los tratamientos fueron disueltos en acetona y se aplicaron tópicamente en ambas orejas inmediatamente después de la administración de TPA. Cuatro horas después de la

administración del agente pro-inflamatorio, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Se tomaron secciones circulares de 6 mm de diámetro de ambas: las orejas tratadas (t) y no tratadas (nt), que fueron pesadas para determinar la inflamación. El porcentaje de inhibición se obtuvo utilizando la siguiente expresión: % de inhibición = $[(w \text{ control} - w \text{ tratamiento}) / w] \times 100$.

9.6.2 Modelo de edema plantar inducido por carragenina

El edema agudo de la pata con carragenina fue inducido en 6 grupos de 7 ratones Balb-C por vía intraplantar en inyección de 40 μ L de carragenina al 4% en el cojinete plantar de la pata trasera izquierda según el método de Winter *et al.* (1962). Los tratamientos fueron por vía oral 30 min después de la inducción de edema de carragenina. El grupo 1 o grupo de control, recibió solución salina fisiológica por vía oral. El grupo 2 o grupo de control negativo, le fue administrado solamente el agente inflamatorio carragenina. El control positivo (grupo 3), recibió el fármaco meloxicam (MELO) a una dosis de 10 mg/kg. El grupo 4, se aplicó el extracto de VmAcOEt a una dosis de 500 mg/kg; al grupo 5, se le administró la sub-fracción VMC1R12 en dosis de 50 mg/kg. Al grupo 6, se le administró la sub-fracción VMC1R13 en una dosis de 50 mg/kg. El tamaño o grosor del edema de la pata se midió utilizando un micrómetro digital, 30 min antes de la inducción del edema y 4 h después tratamiento edema de carragenina, con el objetivo de determinar la actividad antiinflamatoria. Cuatro horas después de la administración del agente inflamatorio, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical (Ou *et al.*, 2019).

9.7 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Es uno de los métodos cromatográficos más utilizado para el análisis (separación y la identificación) de compuestos bioactivos de plantas medicinales por su facilidad de uso (Van Middlesworth & Cannell, 1998). El detector más empleado en HPLC es el detector UV por a su alta sensibilidad, así como a que la mayoría de los agregados de origen natural presentan absorción a longitudes de onda baja (195-210 nanómetros).

9.8 Análisis estadístico utilizado

Los resultados obtenidos de los modelos de inflamación fueron sometidos a una prueba ANOVA de una vía seguida de una post-prueba de Dunnet con un nivel de significancia de $p \leq 0.05$, en comparación con los grupos de daño (Veh, en ambas pruebas farmacológicas). Todos los análisis se procesaron con el paquete estadístico SPSS.

10. RESULTADOS

Los extractos de VM fueron cuantificados y el rendimiento de cada uno respecto al total de la planta extractada (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimientos de los extractos de *Vitex mollis*.

Planta/Parte	Disolvente	Peso del extracto (g)	Rendimiento (%)
<i>V. mollis</i> /hoja	Hexano	13.9	1.15
<i>V. mollis</i> /hoja	Acetato de etilo	20.1	1.67

El extracto de acetato de etilo de las hojas de *Vitex mollis* tuvo una importante actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA (Diagrama 1).

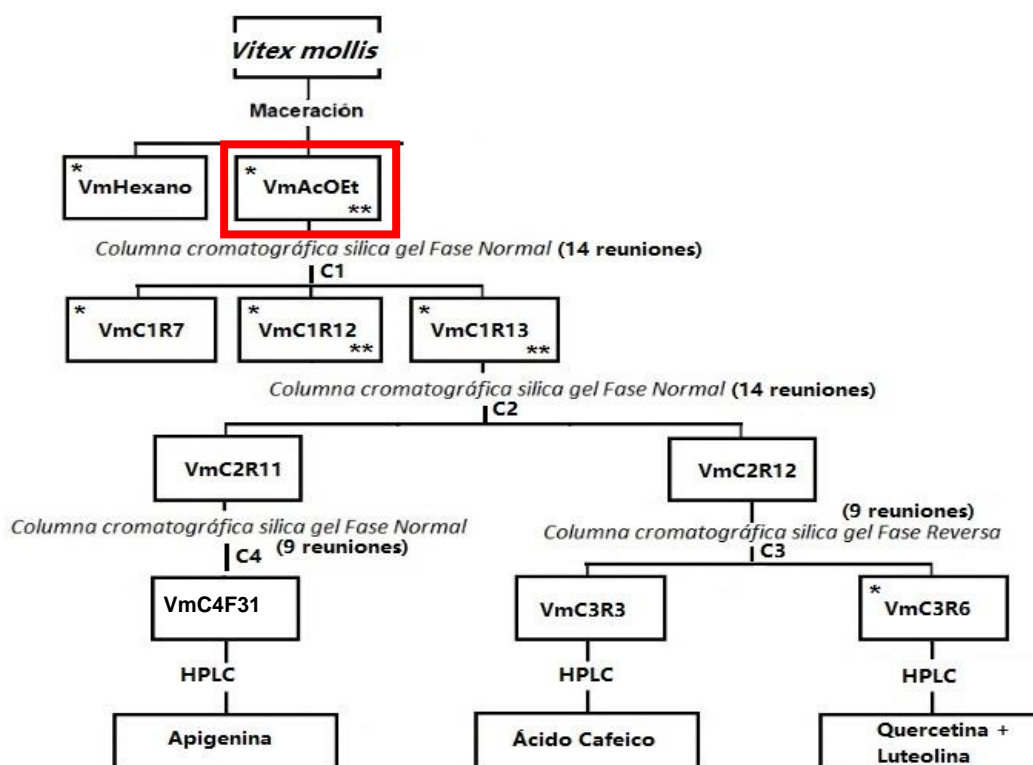


Diagrama 1. Separación fitoquímica de *V. mollis*.

*Extractos y subfracciones con efecto antiinflamatorio modelo de TPA.

**Extractos y subfracciones con efecto antiinflamatorio modelo de Carragenina.

10.1 Actividad antiinflamatoria de extractos de hexano y acetato de etilo de *Vitex mollis* en TPA

En la tabla 6 se observan 2 extractos aislados de esta especie, capaces de inhibir significativamente ($*p < 0.05$) el edema del pabellón auricular, en comparación con el grupo TPA. El extracto de AcOEt inhibió el edema en un 71.4%, mientras que el extracto de hexano inhibió el edema en un 54.6%. El control positivo que fue la indometacina (INDO), presentó una inhibición del edema del 80%. Siendo así el extracto de AcOEt el que presentó mayor inhibición del edema.

Tabla 6. Actividad antiinflamatoria de extractos de VmHex y VmAcOEt en un modelo de edema auricular en ratón ICR inducido por TPA.

Extracto	Tiempo (h)	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) Prom. \pm EEM	Inhibición del edema (%)
TPA	6	--	13.76 \pm 1.41	--
INDO	6	1.0	2.72 \pm 0.75*	80.23 \pm 0.75
VmHex	6	1.0	6.23 \pm 1.73*	54.69 \pm 1.73
VmAcOEt	6	1.0	3.93 \pm 1.22*	71.41 \pm 1.22

* $p < 0.05$ en comparación con el grupo TPA, que sólo recibió como vehículo acetona.

10.2 Actividad antiinflamatoria de las fracciones VMC1R7, VMC1R12 Y VMC1R13 en TPA

Los resultados mostraron que, de igual forma, fracciones aisladas de VmAcOet, son capaces de disminuir significativamente ($*p < 0.05$) el edema del pabellón auricular, en comparación con el grupo con TPA. VMC1R13, VMC1R12 y VMC1R7 inhibieron el edema en un 75.2%, 74.7%, y 45.7% respectivamente. La indometacina (control positivo) presentó una inhibición del edema del 81.2% (Tabla 7).

Tabla 7. Actividad antiinflamatoria de las reuniones VMC1R7, VMC1R12 y VMC1R13 en un modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA.

Extracto	Tiempo (h)	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) Prom. \pm EEM	Inhibición del edema (%)
TPA	6	--	14.48 \pm 1.33	--
INDO	6	1.0	2.72 \pm 0.75*	81.21 \pm 0.75
VMC1R7	6	1.0	7.85 \pm 1.64*	45.78 \pm 1.64
VMC1R12	6	1.0	3.65 \pm 1.52*	74.79 \pm 1.52
VMC1R13	6	1.0	3.58 \pm 1.91*	75.27 \pm 1.91

* $p < 0.05$ en comparación con el grupo TPA, que sólo recibió como vehículo acetona.

10.3 Actividad antiinflamatoria de la reunión VMC3R6 a 1 mg/oreja y a 0.5 mg/oreja en TPA

Los resultados mostraron que VMC3R6 a 1 mg/oreja inhibió el edema en un 73.4%, mientras la misma reunión a una dosis de 0.5 mg/oreja inhibió el edema en un 62.5%, los cuales también son capaces de disminuir significativamente ($*p < 0.05$) el edema del pabellón auricular, en comparación con el grupo con TPA como se muestra en la tabla 8. La indometacina presentó una inhibición del edema del 81.2%.

Tabla 8. Actividad antiinflamatoria de la reunión VMC3R6 a 1 mg/oreja y a 0.5 mg/oreja en un modelo de edema auricular en ratón inducido por TPA.

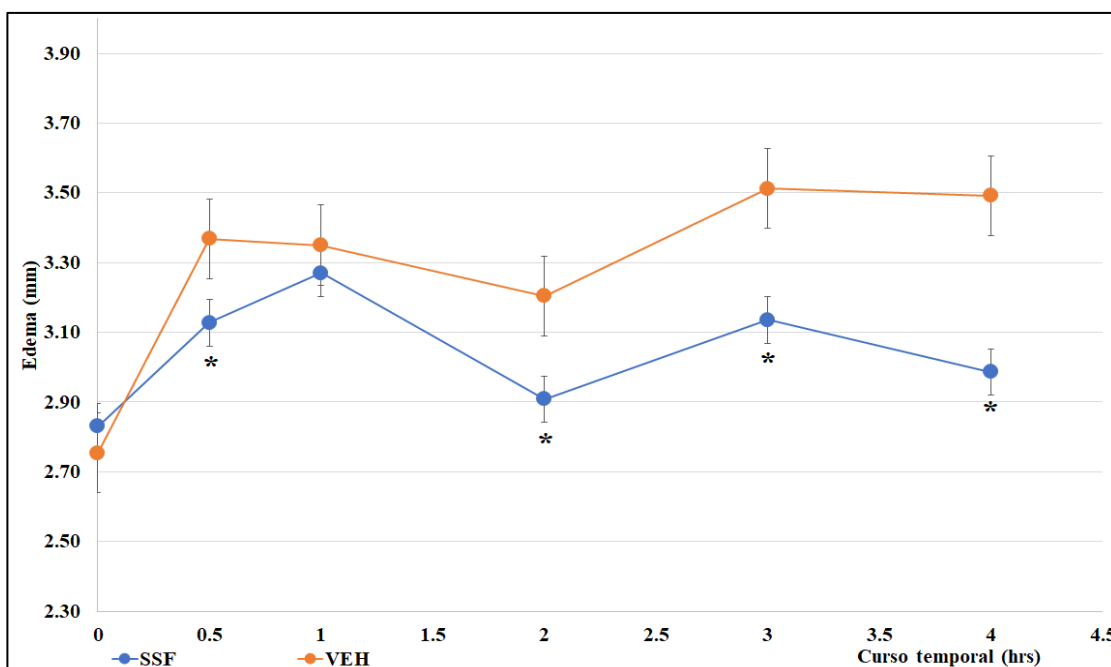
Extracto	Tiempo (h)	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg) Prom. \pm EEM	Inhibición del edema (%)
TPA	6	--	14.48 \pm 1.33	--
INDO	6	1.0	2.72 \pm 0.75*	81.21 \pm 0.75
VMC3F6	6	0.5	5.42 \pm 1.0*	62.56 \pm 1.0
VMC3F6	6	1.0	3.85 \pm 1.49*	73.41 \pm 1.49

* $p < 0.05$ en comparación con el grupo TPA, que sólo recibió como vehículo acetona.

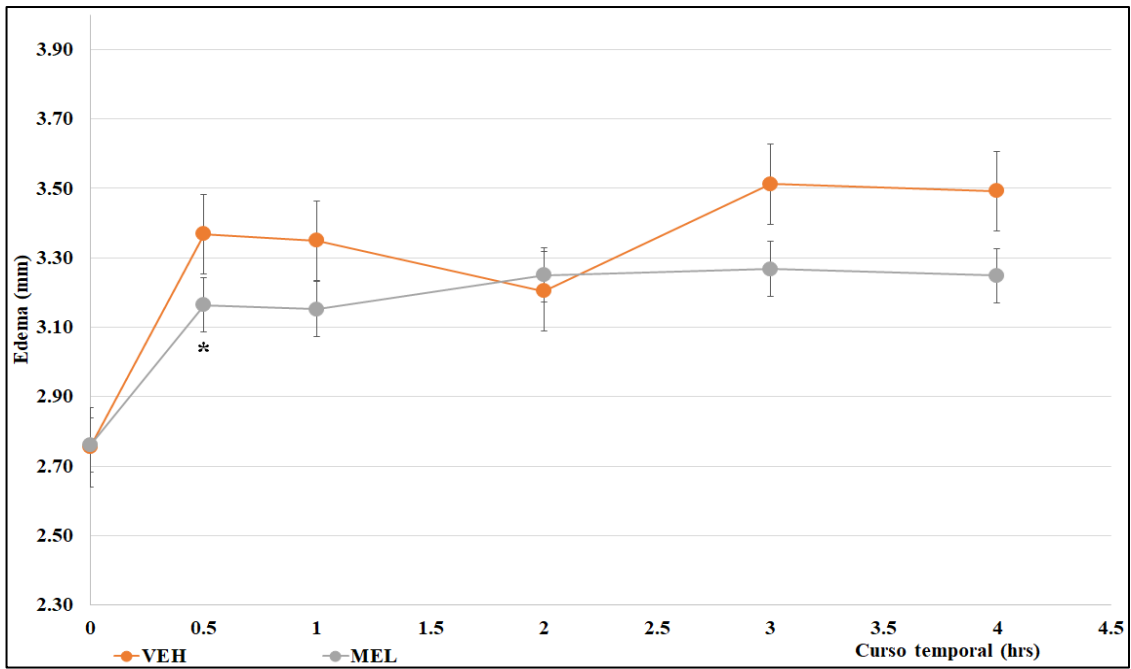
10.4 Efecto antiinflamatorio de extractos y reuniones seleccionadas en modelo de edema plantar inducido por carragenina

En este modelo se logró observar que la inyección de la carragenina al 4 % fue capaz de incrementar el nivel de inflamación del cojinete plantar en los ratones a partir del minuto 30 después de ser aplicada, este efecto prevaleció durante las 4 h que se mantuvo en observación, en el grupo que sólo recibió Tween 20 al 1% (VEH); a comparación de este, el grupo que recibió solamente Solución Salina Fisiológica (SSF) tuvo un efecto diferente significativamente ($*p < 0.05$) como se observa en la Gráfica 1. En la Gráfica 2 se muestra el efecto del tratamiento MEL (Meloxicam) en comparación con el grupo VEH, mostrando únicamente diferencia significativa ($*p < 0.05$) en la primera media hora después de la inducción del edema; por su parte, VmAcOEt no logró disminuir significativamente el edema en comparación del VEH (Gráfica 3), mientras que las fracciones R-12 y R-13 lograron reducir significativamente ($*p < 0.05$) el edema en comparación con el VEH en la hora 4 de observación (Gráfica 4 y Gráfica 5). Se puede observar que el edema plantar en los 4 grupos, tienden a incrementar a los 30 min, a partir

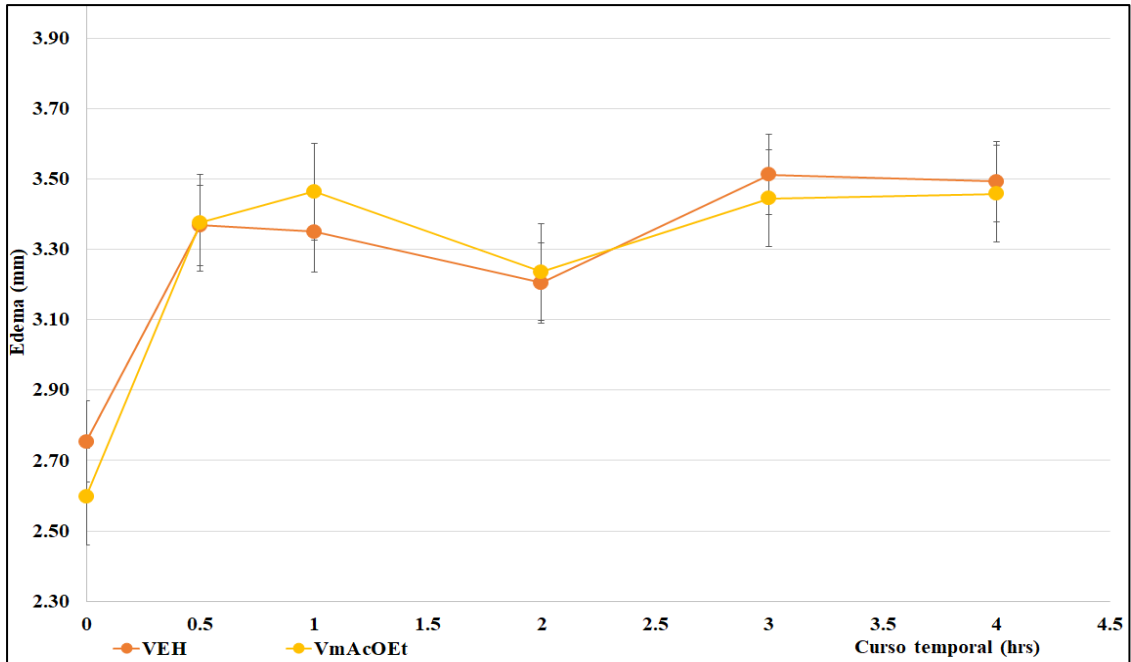
de este punto el edema se mantiene a lo largo de las horas y no llega a los niveles del VEH. En la gráfica 6, se muestra la caracterización de la evolución del proceso inflamatorio a lo largo del curso temporal de la evolución del edema plantar. Se midió el cambio del área bajo la curva (ABC), que se obtuvo de cada una de las anteriores gráficas (2, 3, 4 y 5), en las que se representan los cursos temporales del edema plantar. Podemos observar que la carragenina provoca un incremento relativo estadísticamente significativo de 11.6 %. Con el tratamiento de meloxicam, solo alcanzó 4.9 % de incremento relativo, lo cual fue una reducción importante de dicho edema. El tratamiento con el extracto VmAcOEt, el valor de ABC, mostró un incremento relativo del edema de 7.3 %. Es importante mencionar, que estos efectos no fueron estadísticamente diferentes cuando se comparó contra el grupo de daño (VEH). Los tratamientos con las fracciones R12 y R13, presentaron valores de ABC que al contrastarlo contra el grupo control basal (SSF), mostraron un incremento relativo del edema de 0.3% y 0.7%. Y estos no fueron estadísticamente diferente al compararlo contra el grupo basal; pero si lo fueron con el VEH; mientras que en la Gráfica 7 se muestra el porcentaje inhibido del edema a partir de la inyección de carragenina, siendo los grupos R-12 y R-13 los de mayor porcentaje (16.8 % y 14.03 % respectivamente) seguidos del MEL (9.64 %) y por último VmAcOEt (5.15 %).



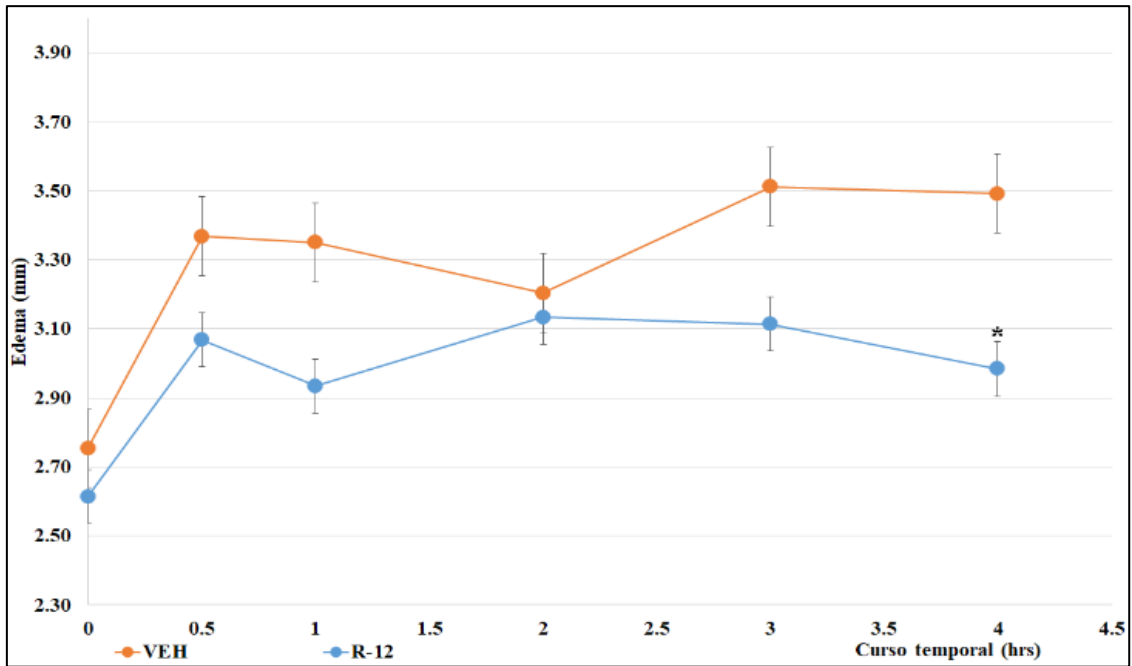
Gráfica 1. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo SSF. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo VEH.



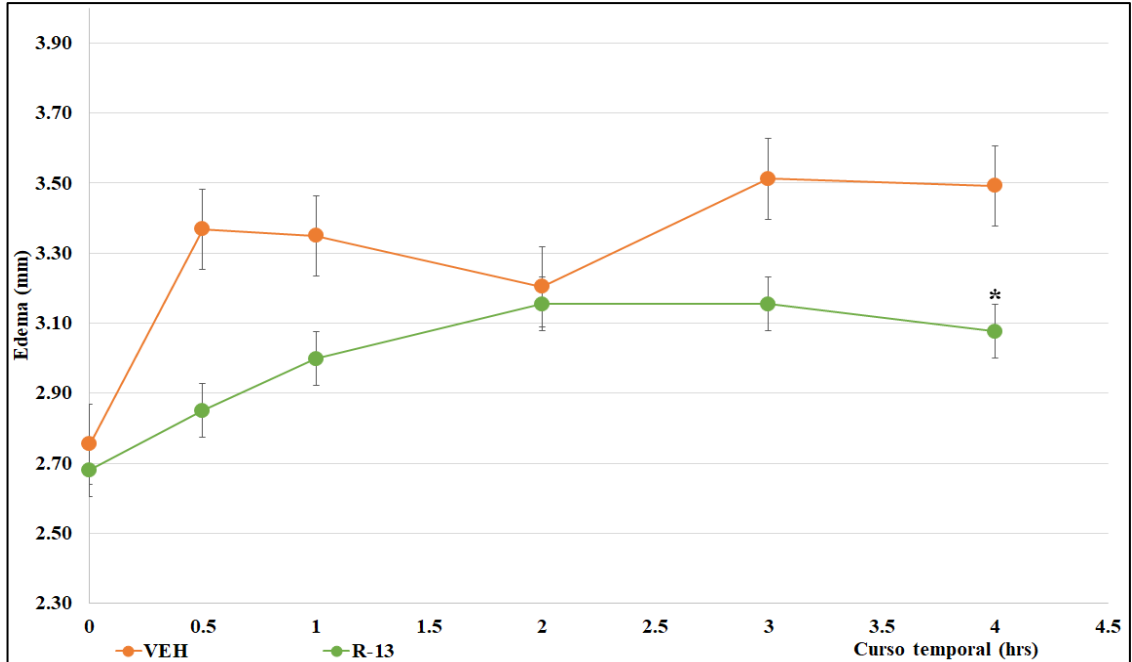
Gráfica 2. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo MEL (Meloxicam). * $p < 0.05$ en comparación con el grupo VEH.



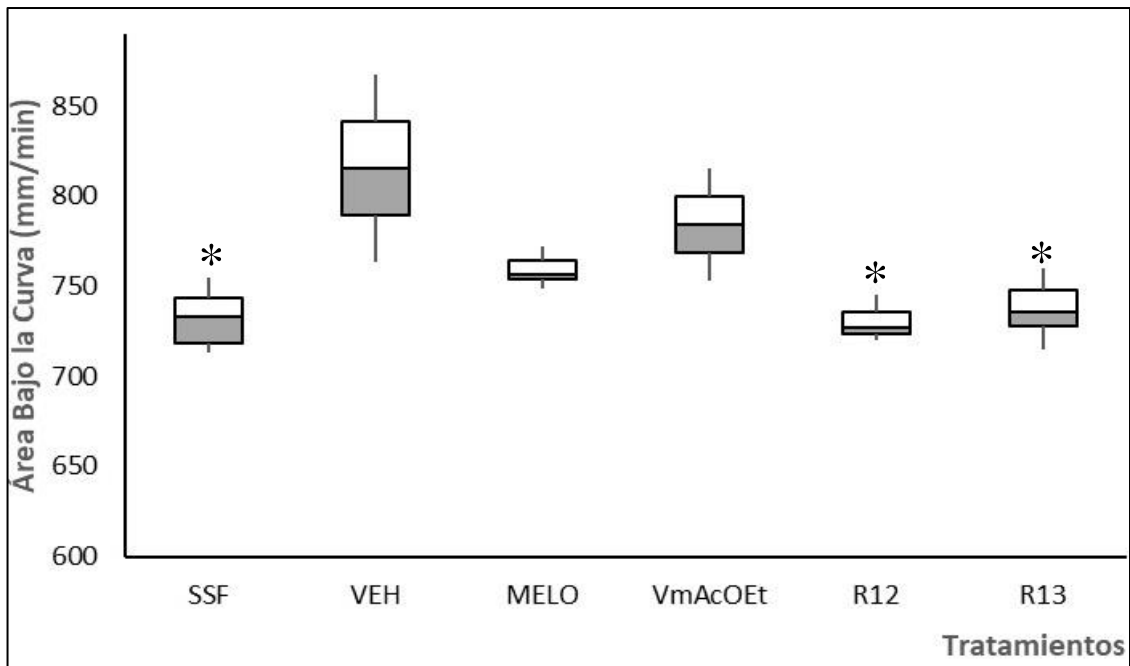
Gráfica 3. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo VmAcOEt. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo VEH.



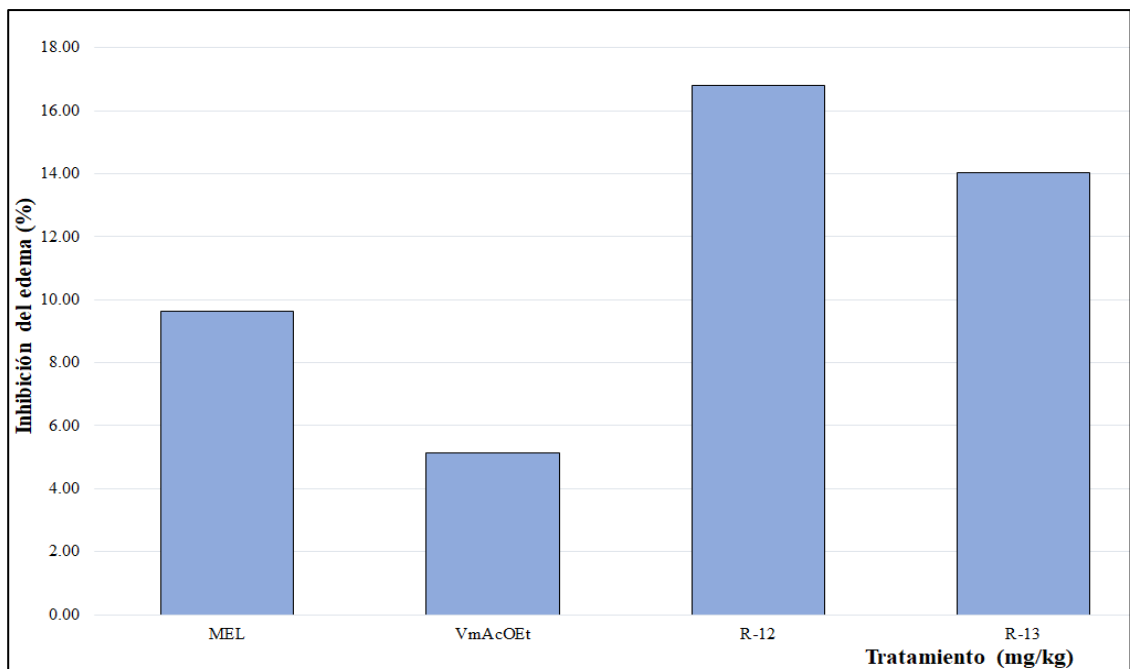
Gráfica 4. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo R-12. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo VEH.



Gráfica 5. Curso temporal de la inflamación inducida con carragenina en el cojinete plantar. Comparación del grupo VEH (carragenina) con el grupo R-13. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo VEH.



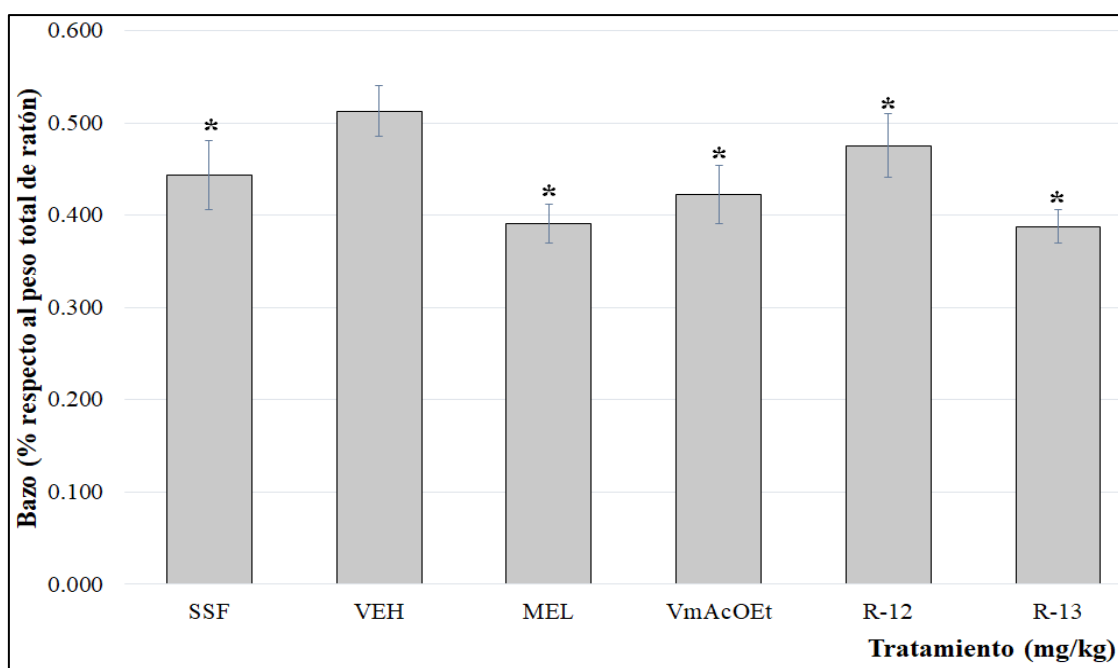
Gráfica 6. Efecto de los tratamientos sobre la inflamación del cojinete plantar después de la administración de carragenina. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo VEH.



Gráfica 7. Porcentaje de inhibición del edema de los tratamientos utilizados a las 4 h después de la inducción del edema con carragenina al 4 %.

10.5 Efecto de extractos y reuniones sobre el bazo de ratones con edema plantar inducido por carragenina

En la Gráfica 8 se observa que la inyección de carragenina en el cojinete plantar provocó un incremento en el porcentaje del peso del bazo (0.51 %) respecto al total del animal (VEH); el grupo que recibió SSF obtuvo un 0.44 %; mientras que la administración de los tratamientos MEL, AcOEt, R-12 y R-13 disminuyeron significativamente el valor respecto al grupo VEH (* $p < 0.05$).



Gráfica 8. Porcentaje del bazo respecto al peso total de ratón con edema plantar inducido con carragenina de los grupos utilizados. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo VEH.

10.6 Identificación del compuesto ácido cafeico en la sub-fracción VMC3R3

El resultado de CCP en fase reversa de la sub-fracción VMC3R3 produjo un precipitado amarillento, por lo que fue analizado en HPLC con la finalidad de identificar algún compuesto bioactivo. La comparación con el estándar de ácido cafeico mediante HPLC nos corroboró la presencia de este compuesto con un tiempo de retención de 9,04 min, con espectro de UV λ_{nm} (nanómetros)= 219, 241 y 325 señales características para un fenil propanoide (Figura 43 y 44).

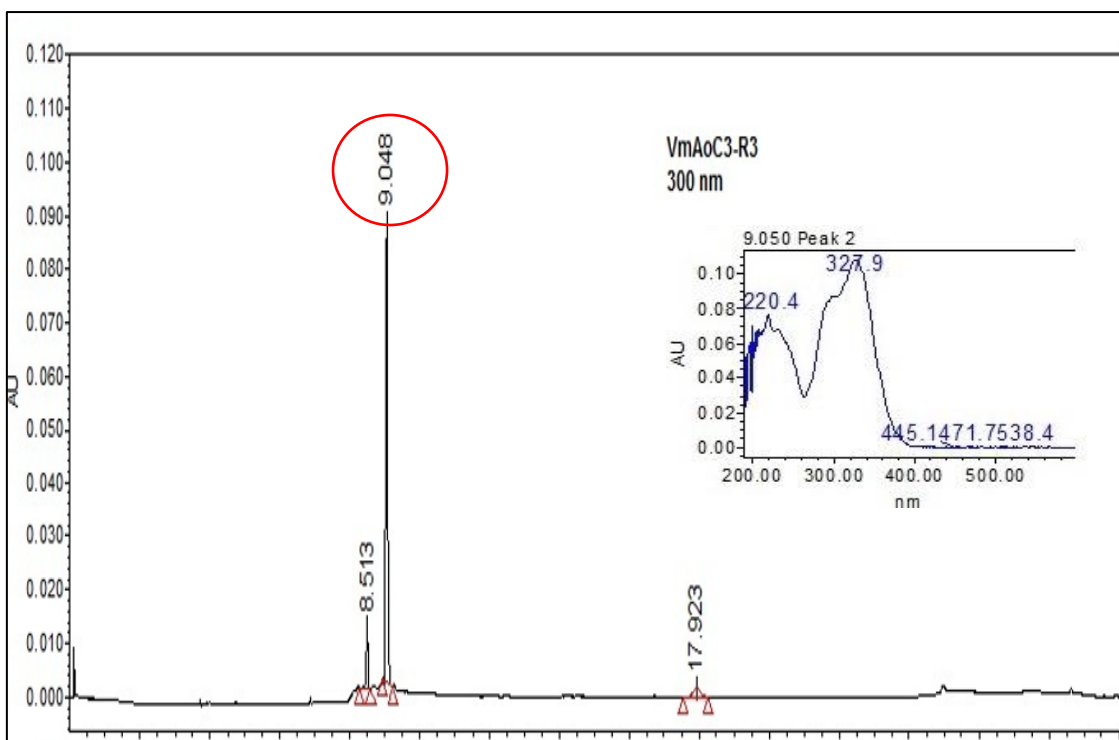


Figura 43. Cromatograma de VMC3R3 en HPLC a 300 nm.

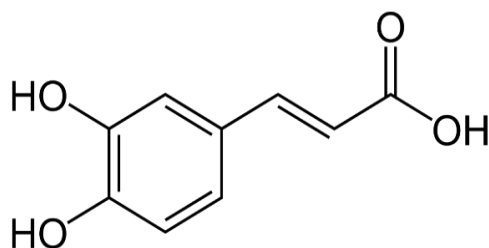


Figura 44. Ácido cafeico.

10.7 Identificación de la mezcla de quercetina y luteolina en la sub-fracción VMC3R6

El resultado de CCP en fase reversa de VMC3R6 produjo un precipitado amarillento, por lo que fue analizado en HPLC con la finalidad de identificar algún compuesto bioactivo. La comparación con el estándar de luteolina y quercetina mediante HPLC nos corroboró la presencia de estos compuestos con un tiempo de retención de 14,08 min, con espectro de UV λ_{nm} = 212.2, 253.3 y 348.2 señales características para una flavona; y 14,95 min, con espectro de UV λ_{nm} = 199.3, 255.7 y 368.2 señales características para un flavonol, respectivamente (Figura 45, 46 y 47).

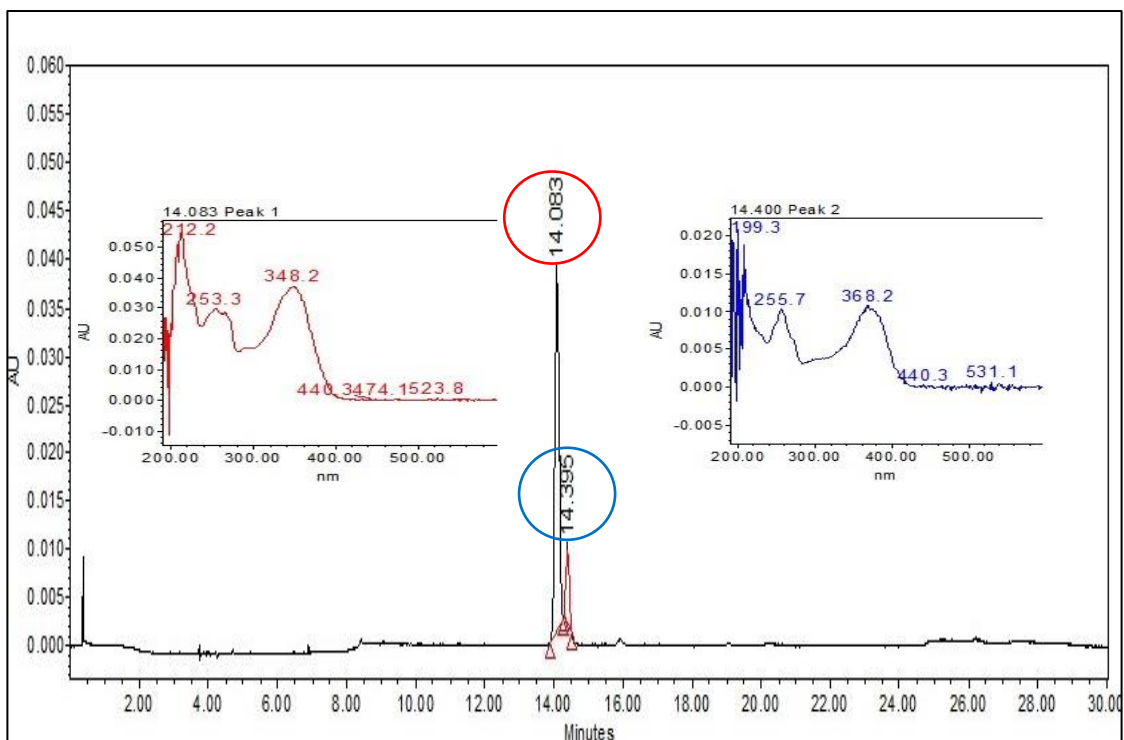


Figura 45. Cromatograma de VMC3R3 en HPLC a 350 nm.

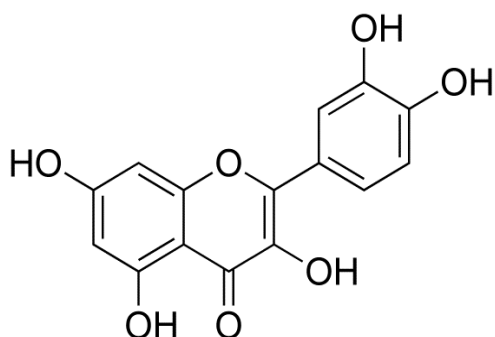


Figura 46. Quercetina.

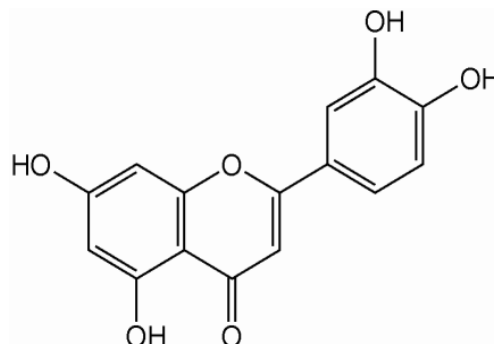


Figura 47. Luteolina.

10.8 Identificación del compuesto apigenina en la fracción VMC4F31

El resultado de CCP en fase normal y reversa de VMC4F31 produjo un precipitado amarillento, por lo que fue analizado en HPLC con la finalidad de identificar algún compuesto bioactivo. La comparación con el estándar de apigenina mediante HPLC nos corroboró la presencia de este compuesto con un tiempo de retención de 18,26 min, con espectro de UV $\lambda_{nm} = 211, 267$ y 338 señales características para una flavona. (Figura 48 y 49).

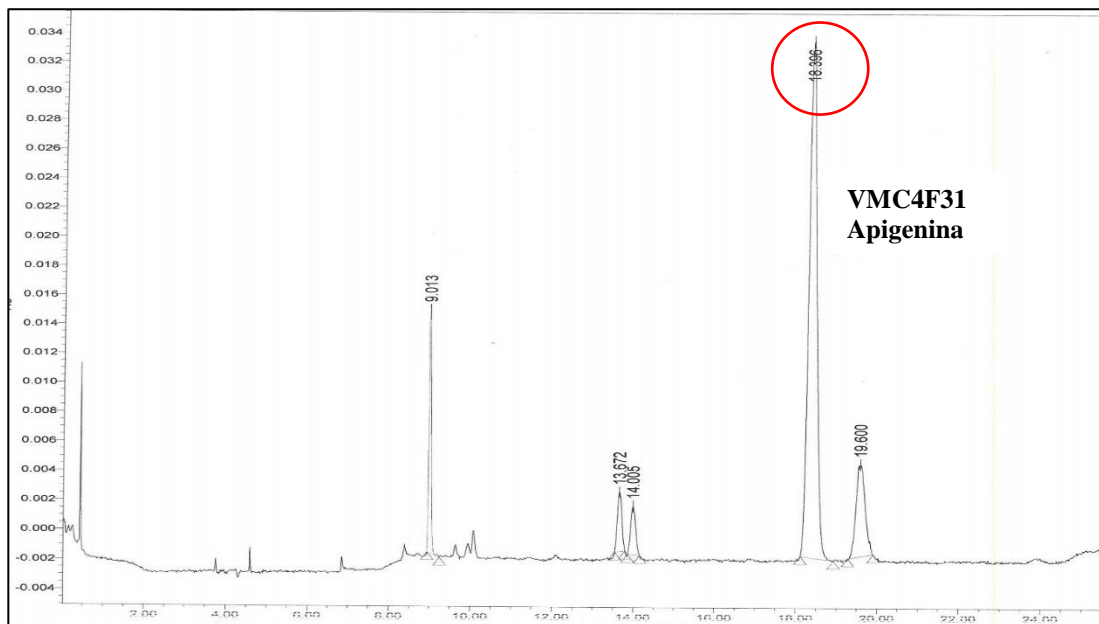


Figura 48. Cromatograma de VMC4F31 en HPLC.

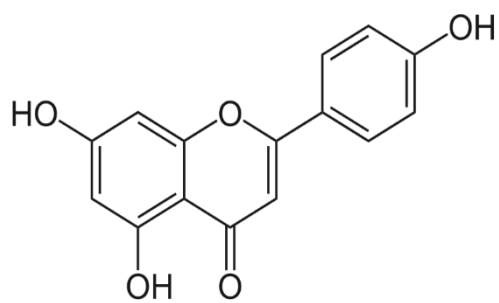


Figura 49. Apigenina.

11. DISCUSIÓN

A lo largo de la historia, el uso de las plantas medicinales ha sido el sustento del desarrollo de nuevos medicamentos, debido a esto es parte fundamental para la investigación. Las plantas son sésiles y por lo tanto, la respuesta a agresiones del entorno se ve reflejada en una gran cantidad de moléculas producidas por el metabolismo secundario de las mismas. Ahora bien, desde el punto de vista antropocéntrico, uno de los principales objetos de estudio de la etnobotánica es la búsqueda de los usos medicinales de las plantas, a partir del gran interés médico de las actividades farmacológicas interesantes que llegan a mostrar. A lo largo del tiempo, esta estrategia ha sido muy exitosa, debido a que la selección natural es el gran laboratorio de pruebas, que a lo largo de millones de años ha generado a través del ensayo de prueba y error, una gran cantidad de moléculas. De tal forma, que es perfectamente lógico que, se puedan diseñar tratamientos para una multiplicidad de enfermedades y con ello tener ventajas competitivas comparando con los fármacos sintéticos. Otra diferencia notable que se identifica entre los dos tipos de abordaje terapéutico, extractos vegetales y fármacos de síntesis, es que los primeros están basados en que el tratamiento utiliza una mezcla de compuestos en donde la interacción farmacológica es parte del modo de acción. En cambio, un fármaco de síntesis en principio es una única molécula activa, que generalmente es de mayor potencia farmacológica. Hay evidencia de que la eficacia comparativa entre un fitomedicamento y un fármaco de síntesis es similar, aunque en el primer caso los pacientes presentan un mayor apego terapéutico por el menor impacto de los efectos colaterales adversos (Herrera-Arellano *et al.*, 2007a; Herrera-Arellano *et al.*, 2007b.). La inflamación es una respuesta del sistema inmunitario que se produce ante una lesión por distintos factores (agentes patógenos, traumatismo, etc.) que afecta a los tejidos celulares o vasculares (Barreno, 2008). El TPA, es un agente que causa inflamación por la liberación de ácido araquidónico, cuyos metabolitos eicosanoides pueden actuar produciendo vasodilatación, agregación plaquetaria, afectan la permeabilidad vascular y atraen a leucocitos polimorfonucleares a la zona de lesión (Grossman & Porth, 2013). Se ha comprobado que el género *Vitex* contiene compuestos bioactivos, como iridoides, flavonoides, diterpenoides, y fitosteroides (Meena *et al.*, 2011); que son capaces de intervenir en procesos de inflamatorios inhibiendo la producción de eicosanoides (Cuevas-Juárez *et al.*, 2014; Padmalatha, *et al.*, 2009). Por tal motivo, el presente estudio evaluó la actividad antiinflamatoria de extractos orgánicos de polaridades baja y mediana (hexano y acetato

de etilo) de la especie *Vitex mollis* en dos modelos experimentales de inflamación. El primero de ellos fue el modelo de edema de pabellón auricular de ratón inducido por TPA, el cual inicia incrementando la corriente entrante de Ca⁺⁺ en células epiteliales, lo que desencadena la activación de proteína quinasa C, que deriva en la liberación de AA para finalmente provocar la producción y liberación de eicosanoides (Flores-Vieyra *et al.*, 2005). Todos los extractos aislados y las sub-fracciones utilizados en el modelo de TPA mostraron, en algún grado, actividad antiinflamatoria disminuyendo significativamente el edema.

Esto probablemente sea atribuido a los compuestos identificados en *V. mollis*, y de cómo actúan en contrarrestando los efectos del TPA, por ejemplo, la quercetina y luteolina tienen la capacidad de inhibir a las enzimas COX y LO, lo que disminuye la producción de eicosanoides (Raso *et al.*, 2001; Ziyen *et al.*, 2007).

El ácido cafeico modula la cascada metabólica del AA, además de inhibir células inflamatorias como macrófagos, linfocitos y polimorfonucleares (Morones *et al.*, 2016). Por último, el flavonoide apigenina inhibe a COX-2 y mediadores inflamatorios como TNF- α , IL-1 e IL-6 (Zhang *et al.*, 2014).

El modelo de edema en la pata de ratón inducido con carragenina es usado ampliamente en el desarrollo de fármacos antiinflamatorios no esteroideos e inhibidores selectivos de la COX-2, para la formación de edema e hiperalgesia (Chattopadhyay *et al.*, 2012). La inyección de la carragenina promueve la activación de células como macrófagos y linfocitos, las cuales desencadenan la producción de células proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), responsables de la respuesta inflamatoria (Salinas-Sánchez *et al.*, 2015), para después, desencadenar la producción de células antiinflamatorias como lo son la IL-10 e IL-4 (Nicasio-Torres *et al.*, 2020). La inyección de carragenina provocó el desarrollo de edema durante las 4 h.

De esta manera, concluimos que las sub-fracciones R-12 y R-13 lograron obtener una diferencia significativa ($p < 0.05$) respecto al control negativo (VEH). Los fármacos control positivo utilizados en los ensayos, fueron elegidos por su efectividad y potencia farmacológica (Lucas S, 2016; Khalil NY & Aldosari KF, 2020). Estos criterios de elección son los mismos por los que tiene un amplio uso en la terapéutica. Sin embargo, su uso por periodos prolongados de tiempo, provoca efectos colaterales adversos. Por otro lado, los resultados obtenidos de extractos y sub-fracciones demuestran que *V. mollis* es capaz de reducir la inflamación considerablemente de manera comparable a indometacina y meloxicam. Ahora bien, los compuestos activos identificados (quercetina, luteolina,

ácido cafeico y apigenina) en esta especie, al ser aplicados por separado, probablemente muestren eficacia, pero con una menor potencia respecto a los fármacos de referencia. Como ya se mencionó, una posible ventaja competitiva, como nos lo muestran los resultados obtenidos, es que la mezcla de compuestos presentes en los extractos y en las fracciones activas, deban su eficacia y potencia a la interacción farmacológica, bajo un esquema de efecto sinérgico entre compuestos activos.

Como se menciona anteriormente, fue posible detectar algunos metabolitos secundarios de *V. mollis* a través de técnicas de CCP y HPLC; se pudo observar una mezcla de quercetina y luteolina en VmC3R6; ácido cafeico en VmC3R3 y apigenina en VmC4F31. Esta investigación farmacológica y química de los extractos de *Vitex mollis* puede ser de importancia en la investigación de terapias farmacológicas alternativas, que permitan disminuir los efectos colaterales que se presentan con el tratamiento de compuestos sintéticos y tener la posibilidad de desarrollar fitomedicamentos eficaces y seguros para el tratamiento de la inflamación.

12. CONCLUSIONES

- El extracto de acetato de etilo (VmAcOEt) obtenido de *V. mollis*, despliega una importante actividad antiinflamatoria en el modelo de TPA.
- VMC1R12, VMC1R13 y VMC3R6 aisladas de VmAcOEt, resultaron activas en el ensayo de TPA, siendo la VMC1R13 la de mayor actividad.
- VMC1R12 y VMC1R13 disminuyen el edema plantar inducido con carragenina.
- Se identificaron, el ácido cafeico perteneciente al grupo de ácidos fenólicos en la sub-fracción VMC3R3; asimismo, la quercetina perteneciente al grupo de flavonoles y luteolina perteneciente al grupo de flavonas en la sub-fracción VMC3R6; y por último, la apigenina perteneciente al grupo de flavonas en la sub-fracción VMC4F31 mediante HPLC, con muestras auténticas de dichos compuestos.

13. REFERENCIAS

- 1) Ata A, Mbong N, Iverson CD, Samarasekera R. (2009). Minor chemical constituents of *Vitex pinnata*. *Natural product communications*, 4(1)
- 2) Bao F, Tang R, Cheng L, Zhang C, Qiu C, Yuan T, Chen, L. (2018). Terpenoids from *Vitex trifolia* and their anti-inflammatory activities. *Journal of natural medicines*, 72(2), 570-575.
- 3) Barnes PJ. (2006). How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture 2005. *British journal of pharmacology*, 148(3), 245-254.
- 4) Barreno PG. (2008). Inflamación. *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 102(1), 91-160.
- 5) Billeter M, Meier B, Sticher O. (1990). Densitometric determination of flavonoids after derivatization. *Journal of Planar Chromatography— Modern TLC* 3:370-375.
- 6) Bralley EE, Greenspan P, Hargrove JL, Wicker L, Hartle DK. (2008). Topical anti-inflammatory activity of *Polygonum cuspidatum* extract in the TPA model of mouse ear inflammation. *Journal of Inflammation*, 5(1), 1.
- 7) Cabo de Villa ED, Morejón Hernández JM & Acosta Figueredo E. (2020). Dolor y analgésicos. Algunas consideraciones oportunas. *Medisur*, 18(4), 694-705.
- 8) Cameron M, Gagnier JJ, Chrubasik S. (2011). Herbal therapy for treating rheumatoid arthritis. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2).
- 9) Canter PH, Lee HS, Ernst E. (2006). A systematic review of randomised clinical trials of *Tripterygium wilfordii* for rheumatoid arthritis. *Phytomedicine*, 13(5), 371-377.
- 10) Cantino PD, Harley RM, Wagstaff SJ. (1992). Advances in Labiate science. In: Harley, R. M., Reynolds, T. (Eds.) Royal botanic gardens. Kew.
- 11) Carlson RP, Chang J, Lewis AJ. (1985). Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents and actions*, 17(2), 197-204.
- 12) Chan EWC, Wong SK, Chan HT. (2018). Casticin from *Vitex* species: a short review on its anticancer and anti-inflammatory properties. *Journal of integrative medicine*, 16(3), 147-152.
- 13) Chandramu C, Manohar RD, Krupadanam DGL, Dashavantha RV. (2003). Isolation, characterization and biological activity of betulinic acid and ursolic acid from *Vitex negundo* L. *Phytotherapy Research*, 17(2), 129–134.

- 14) Chattopadhyay P, Hazarika S, Dhiman S, Upadhyay A, Pandey A, Karmakar S, & Singh L. (2012). Vitex negundo inhibits cyclooxygenase-2 inflammatory cytokine-mediated inflammation on carrageenan-induced rat hind paw edema. *Pharmacognosy research*, 4(3), 134.
- 15) Chong KL, Lim YY. (2012). Effects of drying on the antioxidant properties of herbal tea from selected Vitex species. *Journal of Food Quality*, 35(1), 51-59.
- 16) Choudhary MI, Jalil S, Nawaz SA, Khan KM, Tareen RB. (2009). Antiinflammatory and lipoxygenase inhibitory compounds from vitex agnus-castus. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives*, 23(9), 1336-1339.
- 17) Cuevas-Juárez E, Yuriar-Arredondo K, Pío-León JF, Montes-Avila J, López-Angulo G, Díaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F. (2014). Antioxidant and a-glucosidase inhibitory properties of soluble melanins from the fruits of *Vitex mollis* Kunth, *Randia echinocarpa* Sessé et Mociño and *Crescentia alata* Kunth. *Journal of Functional Foods*, 9, 78-88.
- 18) Davis B, Rothenberg M. (2013). Inflammatory and Effector Cells/Cell Migration. In: *Pediatric Allergy: Principles and Practice*. 3rd Ed. Elsevier; 2016. p. 41–53.
- 19) Delgado-Vargas F, Félix-Favela F, Pío-León JF, López-Angulo G, López-Valenzuela JA, Díaz-Camacho SP, Magdalena de JUB. (2010). Antibacterial activity and qualitative phytochemical analysis of *Vitex mollis* fruit. *International Journal of Green Pharmacy (IJGP)*, 4(4).
- 20) Dharmasiri, M. G., Jayakody, J. R. A. C., Galhena, G., Liyanage, S. S. P., & Ratnasooriya, W. D. (2003). Anti-inflammatory and analgesic activities of mature fresh leaves of *Vitex negundo*. *Journal of ethnopharmacology*, 87(2-3), 199-206.
- 21) Dowling P. (2011). Interacciones de los corticosteroides y los antiinflamatorios no esteroideos. *Revista Veterinaria Argentina*, 34, 354.
- 22) Fang SM, Liu R, Li L, Yao JL, Liu EW, Fan GW, Gao XM. (2018). Anti-inflammatory diterpenes from the fruits of *Vitex trifolia* L. var. *simplicifolia* Cham. *Journal of Asian natural products research*.
- 23) Flores-Vieyra R, Raya-Pérez JC & Torres-Márquez ME. (2005). Proteínas cinasas dependientes de Ca²⁺: características y activación. *Revista de Educación Bioquímica*, 24(3-4), 74-80.
- 24) Gacche RN, Dhole NA, Jadhav AD. (2008). Antioxidant and anti-inflammatory related activities of certain botanicals frequently used in Ayurveda and other indigenous systems of medication. *Aust. J. Med. Herbal*. 20, 27-35.

- 25) Gallo MB, Vieira PC, Fernandes JB, da Silva MFDG, Salimena-Pires FR. (2008). Compounds from *Vitex polygama* active against kidney diseases. *Journal of ethnopharmacology*, 115(2), 320-322.
- 26) García de Lorenzo y Mateos A, López Martínez J, Sánchez Castilla M. (2000). Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. *Med. intensiva (Madr., Ed. impr.)*, 353-360.
- 27) Gastélum-Vega NK, Ruíz-Cruz S, Valenzuela-López CC, Olivas-Reyes TM, Gassos-Ortega LE. (2015). Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de fenoles totales de extractos de hoja de uvalama (*Vitex mollis*).
- 28) Gill BS, Mehra R, Kumar S. (2018). *Vitex negundo* and its medicinal value. *Molecular biology reports*, 45(6), 2925-2934.
- 29) González Naranjo LA, Molina Restrepo JF. (2010). Evaluación de la inflamación en el laboratorio. *Rev. colomb. reumatol*, 35-47.
- 30) González RB, Beltrán MM, Olivares EG, Barrilao RG. (1994). El proceso inflamatorio. *Revista de Enfermería*, (4), 30-33.
- 31) González-Costa M, González AAP. (2019). La inflamación desde una perspectiva inmunológica: desafío a la Medicina en el siglo XXI. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 18(1), 30-44.
- 32) Grossman S, Porth CM. (2013). Porth's Pathophysiology: Concepts of Altered Health States, Ninth Edition. *Lippincott Williams & Wilkin*. 2763-2770 (3227).
- 33) Hansel R, Winde E. (1959). Agnoside, a new glycoside from *Vitex agnuscastus*. *Arzneimittel-Forschung*, 9(3), 189-190.
- 34) Herrera-Arellano A, Jiménez-Ferrer E, Zamilpa A, Morales-Valdéz M, García-Valencia CE, & Tortoriello J. (2007). Efficacy and tolerability of a standardized herbal product from *Galphimia glauca* on generalized anxiety disorder. A randomized, double-blind clinical trial controlled with lorazepam. *Planta médica*, 73(08), 713-717.
- 35) Herrera-Arellano A, Miranda-Sánchez J, Ávila-Castro P, Herrera-Álvarez S, Jiménez-Ferrer JE, Zamilpa A & Tortoriello, J. (2007). Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta médica*, 73(01), 6-12.
- 36) Huang L, Lu Q, Xie, Xi T, Wen C. (2016). Deciphering the potential pharmaceutical mechanism of Chinese traditional medicine (gui-zhi-shao-yao-zhi-mu) on rheumatoid. *Scientific reports*, 6, 22602.

- 37) Kannathasan K, Senthilkumar A, Venkatesalu V. (2011). Mosquito larvicidal activity of methyl-p-hydroxybenzoate isolated from the leaves of *Vitex trifolia* Linn. *Acta Tropica*, 120(1-2), 115–118.
- 38) Khalil NY & Aldosari KF. (2020). Meloxicam. In *Profiles of drug substances, excipients and related methodology* (Vol. 45, pp. 159-197). Academic Press.
- 39) Khanna D, Sethi G, Ahn KS, Pandey MK, Kunnumakkara AB, Sung B, Aggarwal A, Aggarwal BB. (2007). Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current opinion in pharmacology*, 7(3), 344-351.
- 40) Kiuchi F, Matsuo K, Ito M, Qui TK, Honda G. (2004). New Norditerpenoids with Trypanocidal Activity from *Vitex trifolia*. *CHEMICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN*, 52(12), 1492–1494.
- 41) Kumar, S. K., Nagaveni, P., Anitha, K., & Mahaboob, S. T. (2013). Evaluation of anti-inflammatory activity on *Vitex negundo* Linn. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 3(2).
- 42) Kuruuzum A, Stroch K, Demirezer O. (2003). Glucosides from *Vitex agnus-castus*. *Phytochemistry*, 2003, 63: 959–964.
- 43) Ladeji O, Okoye ZS. (1996). Anti-hepatotoxic properties of *Vitex doniana* bark extrac. *International journal of pharmacognosy*, 34(5), 355-358.
- 44) Lajo Flores RJ. (2018). Evaluación del efecto antiinflamatorio de los extractos y gel del rizoma de *Cúrcuma Longa* Linn (palillo) en ratas sometidas a inflamación subplantar con carragenina.
- 45) Lee C, Lee JW, Jin Q, Lee HJ, Lee SJ, Lee D, Hwang BY. (2013). Anti-inflammatory constituents from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 23(21), 6010–6014.
- 46) Lin S, He Z, Chen R, Zhou Y, Zhang Z, Chen S, Yao Y. (2009). Treatment for premenstrual syndrome with *Vitex agnus castus*: A prospective, randomized, multi-center placebo controlled study in China. *Maturitas*, 2009, 63: 99-103.
- 47) Lucas S. (2016). The pharmacology of indomethacin. *Headache: The Journal of Head and Face Pain*, 56(2), 436-446.
- 48) Mabberley B. (1997). The plant-book. *Cambridge University Press. 2nd edition.* Cambridge, England. 858p.
- 49) Martínez-Gordillo M, Fragoso-Martínez I, Del Rosario García-Peña M, Montiel O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista mexicana de biodiversidad*, 84(1), 30-86.

- 50) Medina MFE, Alaba PA, Estrada-Zuñiga ME, Velázquez-Ordoñez V, Barbabosa-Pliego A, Salem MZ, Salem AZ. (2017). Anti-staphylococcal properties of four plant extracts against sensitive and multi-resistant bacterial strains isolated from cattle and rabbits. *Microbial pathogenesis*, 113, 286-294.
- 51) Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. (2008). 454:428–35.
- 52) Meena AK, Niranjana US, Rao MM, Padhi MM, Babu R. (2011). A review of the important chemical constituents and medicinal uses of *Vitex* genus. *Asian journal of traditional medicines*, 6 (2), 54-60.
- 53) Moldenke HN. (1955). Materials toward a monograph of the genus *Vitex*. I. *Phytologia*, 5(4), 142-166.
- 54) Montes-Ávila J, Ojeda-Ayala M, López-Angulo G, Pío-León JF, Díaz-Camacho SP, Ochoa-Terán A, Delgado-Vargas F. (2018). Physicochemical properties and biological activities of melanins from the black-edible fruits *Vitex mollis* and *Randia echinocarpa*. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12(3), 1972-1980.
- 55) Montiel-Herrera M, Camacho-Hernández IL, Ríos-Morgan A, Delgado-Vargas F. (2004). Partial physicochemical and nutritional characterization of the fruit of *Vitex mollis* (Verbenaceae). *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(2), 205-215.
- 56) Morales del Río JA, Lugo-Cervantes E, Guerrero-Medina PJ, Ruiz-Cruz S, Cinco-Moroyoqui FJ, Wong-Corral FJ, Del-Toro-Sánchez CL. (2015). Anti-inflammatory Activity and Changes in Antioxidant Properties of Leaf and Stem Extracts from *Vitex mollis* Kunth during *in vitro* Digestion. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, volume 2015.
- 57) Morones Alba JD, Macías Hernández SI, Villanueva López GC, Aragón Flores M. (2016). Efecto antiinflamatorio del ácido cafeico sobre la pulpitis en un modelo experimental en Cobayos. *Revista ADM*, 73(5).
- 58) Morris CJ. (2003). Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Inflammation protocols*, 115-121.
- 59) Naturalista. (2021) Coyotomate (*Vitex mollis*). Consultado el 21 de julio de 2021, Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. <https://www.naturalista.mx/taxa/210076-Vitex-mollis>
- 60) Nicasio-Torres MP, Serrano-Román J, Pérez-Hernández J, Jiménez-Ferrer E, & Herrera-Ruiz, M. (2017). Effect of dichloromethane-methanol extract and tomentin obtained from

- Sphaeralcea angustifolia cell suspensions in a model of kaolin/carrageenan-induced arthritis. *Planta Medica International Open*, 4(01), e35-e42.
- 61) Ochieng CO, Ishola IO, Opiyo SA, Manguro LA, Owuor PO, Wong KC. (2013). Phytoecdysteroids from the stem bark of *Vitex doniana* and their anti-inflammatory effects. *Planta médica*, 79(01), 52-59.
- 62) Oliveria CMBD, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR, Salomao R. (2011). Citocinas y dolor. *Revista Brasileira de Anestesiología*, 61(2), 260-265.
- 63) Olsen NJ, Stein CM, (2004). New drugs for rheumatoid arthritis. *The New England of Journal of Medicine*, 350:2167-79.
- 64) Ono M, Sawamura H, Ito Y, Mizuki K, Nohara, T. (2000). Diterpenoids from the fruits of *Vitex trifolia*. *Phytochemistry*, 55(8), 873-877.
- 65) Ono M, Yamamoto M, Masuoka C, Ito Y, Yamashita M, Nohara, T. (1999). Diterpenes from the fruits of *Vitex rotundifolia*. *Journal of natural products*, 62(11), 1532-1537.
- 66) Oscanoa-Espinoza TJ. (2015). Seguridad de los antiinflamatorios no esteroideos. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 53(2), 172-179.
- 67) Osuna L, Tapia-Pérez ME, Jiménez-Ferrer JE, Carrillo-Quiróz BA, Silva-Sánchez J. (2005). Screening of *Althernanthera repens*, *Boerhavia coccinea*, *Flaveria trinervia*, *Tournefortia desinflora* and *Vitex mollis* Extracts to Evaluate their Antibacterial Activity and Effect on Smooth Muscle. *Pharmaceutical Biology*, Vol. 43, No. 9, pp. 749-753.
- 68) Ou Z, Zhao J, Zhu L, Huang L, Ma Y, Ma C, Yi J. (2019). Anti-inflammatory effect and potential mechanism of betulinic acid on λ -carrageenan-induced paw edema in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 118, 109347.
- 69) Padmalatha K, Jayaram K, Raju NL, Prasad MNV, Arora R. (2009). Ethnopharmacological and Biotechnological Significance of *Vitex*. *Bioremediation, Biodiversity and Bioavailability*, 3 (1), 6-14.
- 70) Patel SS, Savjani JK. (2015). Systematic review of plant steroids as potential antiinflammatory agents: Current status and future perspectives. *The journal of phytopharmacology*, 4(2), 121-125.
- 71) Payá M, Ferrándis M, Sanz MJ, Bustos G, Blasco R, Ríos JL, Alcaraz MJ. (1993). Study of the antioedeme activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. *Phytotherapy Research*. 7: 159-162.
- 72) Pennington TD & Sarukhán J. (2005). *Árboles tropicales de México: manual para la identificación de las principales especies*. UNAM.

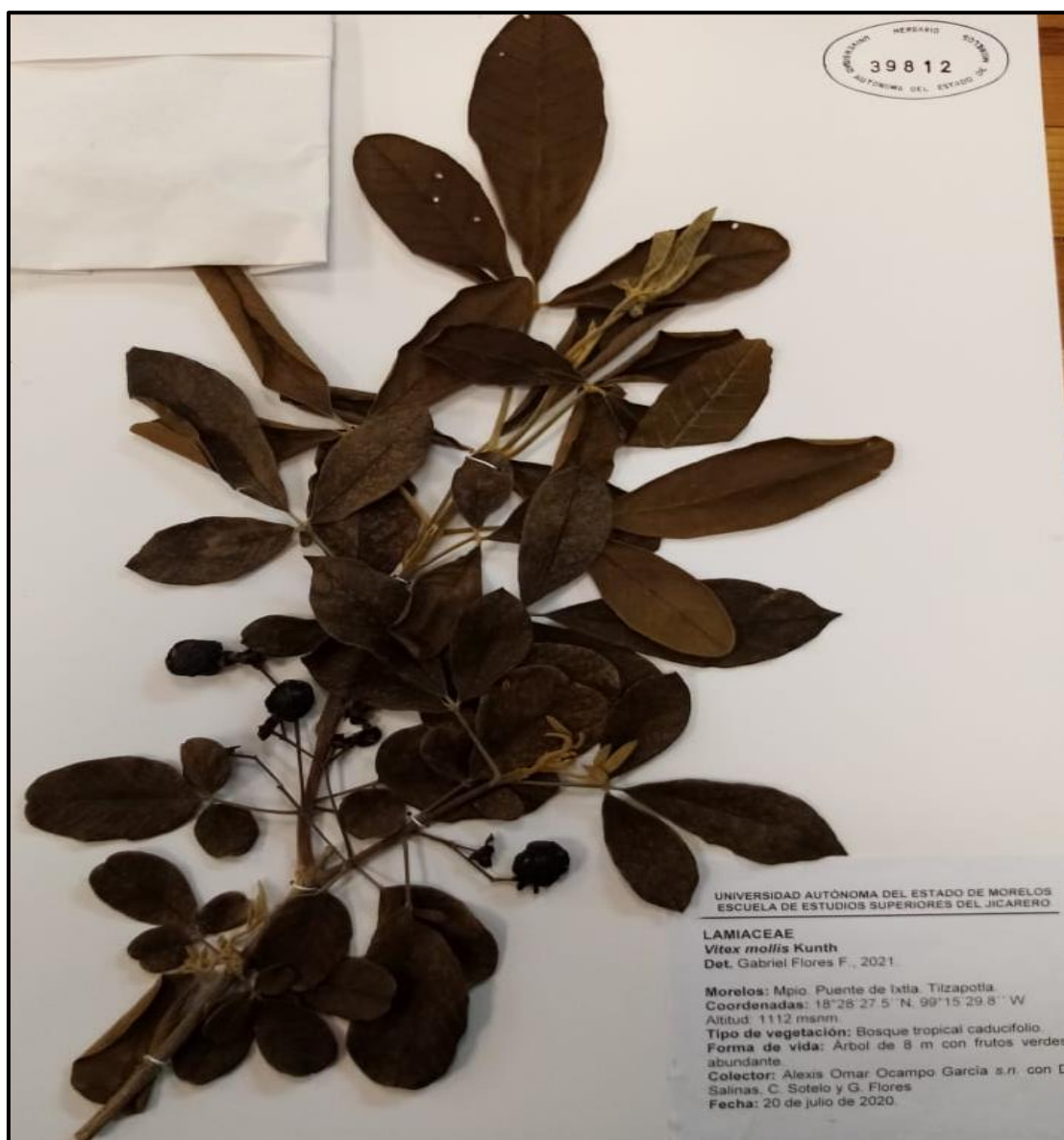
- 73) Pío-León JF, Montes-Ávila J, Díaz-Camacho SP, Delgado-Vargas F, Gupta VK. (2014). Biological Activities and Phytochemicals of the Fruits of *Vitex* Plant. *Bioactive Phytochemicals: Perspectives for modern medicine*. Vol. 2, (92-120).
- 74) Prozzi GR, Cañas M, Urtasun MA, Buschiazzo HO, Dorati CM, & Mordujovich-Buschiazzo P. (2018). Riesgo cardiovascular de los antiinflamatorios no esteroideos. *Medicina (Buenos Aires)*, 78(5), 349-355.
- 75) Rajan D, Suresh J, Paramakrishnan N, Reedy A, Nayeem M. (2012). Review on phitochemical and pharmacological properties of *Vitex trifolia* Linn. *Research Journal of Pharmacognosy and Phitochemistr*, 4(2), 124-129.
- 76) Ramírez-Cisneros MÁ, Rios MY, Aguilar-Guadarrama AB, Rao PP, Aburto-Amar R, Rodríguez-López V. (2015). In vitro COX-1 and COX-2 enzyme inhibitory activities of iridoids from *Penstemon barbatus*, *Castilleja tenuiflora*, *Crescentia alata* and *Vitex mollis*. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 25(20), 4505-4508.
- 77) Rao TS, Currie JL, Shaffer AF, Isakson PC. (1993). Comparative evaluation of arachidonic acid (AA) and tetradecanoilphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation. *Inflammation*, 17(6), 723-741.
- 78) Raso GM, Meli R, Di Carlo G, Pacilio M, Di Carlo R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. *Life sciences*, 68(8), 921-931.
- 79) Regal MLL, Borges AA, de Armas García JO, Alvarado LM, Cedeño JAV, del Sol JÁC. (2015). Respuesta inflamatoria aguda. Consideraciones bioquímicas y celulares. *Revista de Enfermedades no Transmisibles Finlay*, 5(1), 47-62.
- 80) Rodríguez Carranza R. (2015). *Vademécum Académico de Medicamentos*. McGraw Hill.
- 81) Rodríguez-López V, Figueroa-Suárez MZ, Rodríguez T, Aranda E. (2007). Insecticidal activity of *Vitex mollis*. *Fitoterapia*, 78(1), 37-39.
- 82) Saag KG, Teng GG, Patkar NM, Anuntiyo J, Finney C, Curtis JR, Paulus HE, Mudano A, Pisu M, Elkins-Melton M, Outman R, Allison JJ, Almazor MS, Bridges SL, Chatham WW, Hoshbrg M, Maclean C, Mikuls T, Moreland LW, O'Dell J, Turkiewicz A, Furst DE. (2008). American College of Rheumatology Recommendations for the Use of Nonbiologic and Biologic Disease-Modifying Antirheumatic Drugs in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis & Rheumatoid (Arthritis care & research)*, 59: 762-784.
- 83) Salinas- Sánchez DO, Herrera-Ruíz M, Pérez S, Jiménez-Ferrer JE, Zamilpa A. (2012). Anti-inflammatory Activity of Hautriwaic Acid Isolated from *Dodonaea viscosa*. *Leaves Molecules*. 2012, 17, 4292-4299.

- 84) Salinas-Sánchez DO, Zamilpa A, Pérez S, Herrera-Ruiz M, Tortoriello J, González-Cortazar M, & Jiménez-Ferrer E. (2015). Effect of hautriwaic acid isolated from *Dodonaea viscosa* in a model of kaolin/carrageenan-induced monoarthritis. *Planta Medica*, 81(14), 1240-1247.
- 85) Santos TCD, Schripsema J, Monache FD, Leitao SG. (2001). Iridoids from *Vitex cymosa*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 12(6), 763-766.
- 86) Sharma JN, Samud AM, Asmawi MZ. (2004). Comparison between plethysmometer and micrometer methods to measure acute paw oedema for screening anti-inflammatory activity in mice. *Inflammopharmacology*, 12(1), 89-94.
- 87) Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. In: Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology. EEUU: Elsevier; 2004. p. 385–405.
- 88) Solís Cartas U, Ríos Guarango PA, López Proaño GF, Yartú Couceiro R, Núñez Sánchez BL, Arias Pastor FH, Cárdenas de Baños L. (2019). Uso de la medicina tradicional en el tratamiento de la artritis reumatoide. *Revista Cubana de Reumatología*, 21(3).
- 89) Sugishita E, Amagaya S, Ogihara Y. (1981). Anti-inflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats. *Journal of Pharmacobio-dynamics*, 4(8), 565-575.
- 90) Sun HD, Farnsworth NR, Fong HS, Mesecar AD, Santarsiero BD, Zhang HJ, Li HS. (2002). Vitexlactam A, a novel labdane diterpene lactam from the fruits of *Vitex agnus-castus*. *Tetrahedron Letters*, 2002, 43(29): 5131-5134.
- 91) Tapia-Pérez MAE, Tapia-Contreras A, Cedillo-Rivera R, Osuna L, Mekes M. (2003). Screening of mexican medicinal plants for antiprotozoal activity-part II. *Pharmaceutical biology*, 41(3), 180-183.
- 92) Tiwari OP, Tripathi YB. (2007). Antioxidant properties of different fractions of *Vitex negundo* Linn. *Food Chemistry*, 100(3), 1170-1176.
- 93) Valencia-Botín AJ, Gutiérrez-Lomelí M, Morales-Del-Río JA, Guerrero-Medina PJ, Robles-García MA, Ruíz-Cruz S, Wong-Corral FJ, Borboa-Flores J, Rueda-Puente EO, Del-Toro-Sánchez CL. (2018). Efecto inhibitorio de *Vitex mollis* Kunth contra bacterias y especies de fusarium de importancia humana y agrícola. *Rev. Fitotec. Mex.* Vol. 41 (4): 353-363.
- 94) Van Middlesworth, F, & Cannell, RJ. (1998). Dereplication and partial identification of natural products. In *Natural products isolation* (pp. 279-327). Humana Press.
- 95) Vargas-Ruiz R, Montiel-Ruiz RM, Herrera-Ruiz M, González-Cortazar M, Ble-González EA, Jiménez-Aparicio AR, Jimenéz-Ferrer & Zamilpa A. (2020). Effect of phenolic

- compounds from *Oenothera rosea* on the kaolin-carrageenan induced arthritis model in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 253, 112711.
- 96)** Vazquez E, Navarro M, Salazar Y, Crespo G, Bruges G, Osorio C. (2015). Systemic changes following carrageenan-induced paw inflammation in rats. *Inflamm Res.* 2015; 64(5):333–42.
- 97)** Villalba Herrera, E. W. (2014). Inflamación I. *Revista de Actualización Clínica Investiga*, 43, 2261.
- 98)** White M. (1999). Mediators of inflammation and the inflammatory process. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 Mar; 103(3): S378–81.
- 99)** Williams J, León H. (2011). Estudio anatómico de la madera de 5 especies del género *Vitex* L. (Laminaceae) en Venezuela. *La revista forestal venezolana*, 55(2), 121-130.
- 100)** Winter CA, Risley EA, Nuss GW. (1962). Carrageenan induced oedema in hind paw of the rat as an assay of anti-inflammatory drugs, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111, 544–547.
- 101)** Yao JL, Fang SM, Liu R, Oppong MB, Liu EW, Fan GW, Zhang H. (2016). A review on the terpenes from genus *Vitex*. *Molecules*, 21(9), 1179.
- 102)** Yoshioka T, Inokuchi T, Fujioka S, Kimura Y. (2004). Phenolic Compounds and Flavonoids as Plant Growth Regulators from Fruit and Leaf of *Vitex rotundifolia*. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 59(7-8), 509–514.
- 103)** Yost CC, Weyrich AS, Zimmerman GA. (2010). The platelet activating factor (PAF) signaling cascade in systemic inflammatory responses. *Biochimie. Elsevier*; 2010;92(6):692–7.
- 104)** Young JM, Wagner BM, Spires DA. (1983). Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *Journal of Investigative Dermatology*, 80(1), 48-52.
- 105)** Yueqin Z. (2006). Identificación y actividad farmacológica de principios de especies antiinflamatorias.
- 106)** Yun YC, Koo ST, Kim CH, Lyu Y, Grady JJ, Chung JM. (2002). Two variables that can be used as pain indices in experimental animal models of arthritis. *Journal of Neuroscience Methods.* 115: 107-113.
- 107)** Zhang X, Wang G, Gurley EC, Zhou H. (2014). Flavonoid apigenin inhibits lipopolysaccharide-induced inflammatory response through multiple mechanisms in macrophages. *PloS One*, 9 (9).

108) Ziyang L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L. (2007). Evaluation of the Anti-inflammatory Activity of Luteolin in Experimental Animal Models. *Planta médica*, 73(3), 221-226.

14. ANEXOS



Anexo a. Planta *Vitex mollis* colectada en Tilzapotla, municipio de Puente de Ixtla, Morelos, México. Muestra del espécimen depositada en el herbario de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (CIByC-UAEM); con número de registro 39812.