



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA Y ANTIARTRÍTICA DE

Tagetes lucida Cav

TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

CINTHYA BELLO PERALTA

Directora: Dra. Gabriela Belén Martínez Hernández

Coodirectora: Dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz

CUERNAVACA, MORELOS

Marzo, 2021

Dedicatorias

A mis queridos padres quienes me han apoyado a lo largo de mi vida, este logro es por y para ustedes.

A mis amigas, Andrea, Priscila, Miros y Luccia quienes han estado para mí en cada momento, gracias por sus palabras y por darme los ánimos necesarios cuando más lo necesitaba.

A mi querida abuelita Mary que estuvo conmigo y me alegró los días con sus ocurrencias, te quiero mucho.

A BTS, quienes con su música me dieron la fuerza y me sacaron muchas veces adelante, siendo siempre un ejemplo de esfuerzo y perseverancia.

Agradecimientos

Principalmente la dra. Maribel Lucila Herrera Ruiz por su amabilidad y por aceptarme en el laboratorio, muchas gracias por introducirme al CIBIS, por la paciencia, sus enseñanzas compartidas, su tiempo y dedicación que me brindó y por todos sus consejos y observaciones que me han ayudado mucho.

A la M. en M. Gabriela Belén Martínez Hernández quien me ayudó bastante durante todo el proyecto de investigación, gracias por el tiempo, comprensión y amistad brindada durante este proceso académico.

A el Dr. Manases Gonzales Cortazar por todo el apoyo en la parte química, muchas gracias por brindarme un poco de su tiempo y atención.

A mi comité por sus comentarios y apoyo para este trabajo.

Compañeros del CIBIS-IMSS, gracias por ayudarme y por los consejos, también por compartir un poco de su vida, su amabilidad hizo un buen ambiente de trabajo dentro del laboratorio

A todos quienes participaron de manera directa o indirecta para llevar a cabo este trabajo.

Tabla de contenido

Símbolos y abreviaturas	6
Índice de figuras	9
Índice de diagramas.....	9
Índice de cuadros.....	10
Índice de gráficas	10
1. Introducción.....	11
2 Antecedentes	12
2.1 Condiciones reumáticas crónicas	12
2.2 Artritis reumatoide	13
2.3 Epidemiología	13
2.4 Etiología	14
2.5 Síntomas	14
2.6 Anatomía estructural y funcional de las articulaciones.....	15
2.7 Fisiopatología de la AR.....	16
2.7.1 Inflamación.....	16
2.7.2 Células y citocinas en la artritis reumatoide.....	17
2.7.3 Principales interleucinas que participan en el proceso inflamatorio	20
2.8 Tratamiento de la artritis reumatoide	21
2.8.1 Metotrexato (MTX).....	22
2.9 Morfología de la articulación	24
2.10 Modelos biológicos	24
2.11 Mono artritis inducida con carragenina.....	25
2.12 Edema auricular inducido por TPA.....	25
2.13 Hiperalgnesia: modelo de la placa caliente	26
2.14 Metabolitos secundarios.....	26
2.15 Plantas medicinales utilizadas como antiartríticas	27
2.16 <i>Tagetes lucida</i> Cav.	29
2.17 Clasificación taxonómica	30
2.18 Usos medicinales.....	30
2.19 Química y farmacología de <i>T. lucida</i>	31
3 Justificación.....	31

3.1	Pregunta de investigación.....	32
4	Hipótesis.....	32
5	Objetivos	33
	5.1 Objetivo general	33
	5.2 Objetivos específicos.....	33
6	Metodología.....	34
	6.1 Análisis químico.....	34
	6.1.1 Material vegetal.....	34
	6.1.2 Preparación de extracto	34
	6.1.3 Aislamiento de compuestos.....	34
	6.2 Análisis farmacológico.....	37
	6.2.1 Inflamación auricular inducida con TPA	38
	6.2.2 Hiperalgnesia: prueba de la placa caliente	39
	6.2.3 Modelo de artritis inducida con C/C	39
	6.3 Cuantificación de citocinas por el método de ELISA.	41
	6.4 Análisis estadístico.....	41
7	Resultados	42
	7.1 Separación y purificación de compuestos de <i>T. lucida</i>	42
	7.2 Resultados de análisis gases-masas (G-M) de las fracciones de <i>T. lucida</i>	50
	7.3 Actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de <i>T. lucida</i>	53
	7.4 Actividad de <i>T. lucida</i> sobre artritis-inducida con C/C.....	53
	7.5 Índice de peso de bazo y pulmón	59
	7.6 Actividad de <i>T. lucida</i> sobre la hiperalgnesia	60
	7.7 Concentración de citocinas pro- y anti-inflamatorias en diferentes órganos	61
8.	Discusión.....	66
9	Conclusiones	71
10	Perspectivas	72
	Glosario	73
	Referencias	77

Símbolos y abreviaturas

- **(7-iso)** 7-isoprenyloxicumarina
- **(AIA)** Artritis Inducida por Adyuvantes
- **(AIC)** Artritis Inducida por Colágeno
- **(AICAR)** 5-Aminoimidazol-4-Carboxiamina Ribonucleótido transformilasa
- **(AINE)** Antiinflamatorio No Esteroide
- **(Amix)** Mezcla de amirinas (α -amirina y β -amirina)
- **(AMP)** Adenosín monofosfato
- **(ANOVA)** Análisis de Varianza
- **(APC)** Células Presentadoras de Antígeno (por sus siglas en inglés, *antigen presenting cells*)
- **(AR)** Artritis Reumatoide
- **(ARJ)** Artritis Reumatoide Juvenil
- **(ARNm)** Ácido Ribonucleico mensajero
- **(BSA)** Albúmina de Suero Bovino
- **(CC)** Carragenina- Caolín
- **(CCF)** Cromatografía de capa fina
- **(CD)** Células Dendríticas
- **(CIBIS-IMSS)** Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social
- **(cm)** centímetros
- **(COX)** Ciclooxygenasa
- **(CSF)** Factor Estimulante de Colonias (por sus siglas en inglés, *colony stimulating factor*)
- **(DHFR)** Dihidrofolato reductasa
- **(DPPH)** 1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
- **(ELISA)** Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas
- **(ERK)** Quinasa Regulada activada por señal Extracelular
- **(Esp)** Espatulenol
- **(FAME)** Fármaco Modificador de Enfermedad

- **(g)** gramo
- **(G-M)** Análisis por Gases-Masas
- **(Her)** Herniarina
- **(hr)** hora
- **(i-a)**Intra articular
- **(i-p)** Intra peritoneal
- **(IASP)** Asociación Internacional para el Estudio del Dolor
- **(IFN)** Interferón
- **(IFN- γ)** Interferón Gamma
- **(IL-)** Interleucina
- **(IL-1 β)** Interleucina 1 Beta
- **(INAH)** Instituto Nacional de Antropología e Historia
- **(iNOS)** Sintasa del óxido nítrico inducible (por sus siglas en inglés, *nitric oxide synthase*)
- **(kg)** kilogramo
- **(LOX)** Lipooxigenasa
- **(LPS)** Lipopolisacárido
- **(LTB₄)** Leucotrieno B₄
- **(MAPK)** Proteína Quinasa Activada por Mitógeno
- **(MDA)** Malondialdehído
- **(mg)** miligramos
- **(mM)** mili Molar
- **(mm)** milímetros
- **(msnm)** metros sobre el nivel del mar
- **(MTX)** Metotrexato
- **(NF- κ B)** Factor Nuclear kappa B
- **(NK)** Natural Killer (Asesina Natural)
- **(NO)** Óxido nítrico (por sus siglas en inglés, *nitric oxide*)
- **(OMS)** Organización Mundial de la Salud
- **(OPS)** Organización Panamericana de la Salud
- **(PGE₂)** Prostaglandina E₂

- **(pH)** Potencial de Hidrógeno
- **(PLA-2)** Fosfolipasa A2
- **(PMSF)** Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
- **(RANKL)** Ligando Receptor Activador para el Factor Nuclear
- **(RMN)** Resonancia Magnética Nuclear
- **(SSF)** Solución salina fisiológica
- **(TGF- β)** Factor de Crecimiento Transformante-Beta (por sus siglas en inglés, *transforming growth factor*)
- **(Th17)** Linfocitos T cooperadores 17 (por sus siglas en inglés, *T helper cells*)
- **(TIH)** Extracto Hexánico de Tagetes lucida
- **(TLC)** Cromatografía de Capa Fina
- **(TNF- α)** Factor de Necrosis Tumoral-Alfa (por sus siglas en inglés, *tumor necrosis factor*)
- **(TPA)** 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol
- **(TYMS)** Timidilato sintasa
- **(v.o)** Vía oral
- **(VEH)** Vehículo
- **(Vir)** Virgatenol
- **(κ Da)** kilo Dalton
- **(°C)** Grados Centígrados
- **(λ)** Longitud de onda
- **(μ l)** Microlitros
- **(%)** Porcentaje

Índice de figuras

Figura 1	Componentes principales de una articulación móvil	15
Figura 2	Esquema a nivel celular de la fisiopatología de la artritis reumatoide en una articulación	19
Figura 3	Propuesta de mecanismo de acción antiinflamatoria del metotrexato	23
Figura 4	Principales articulaciones afectadas en la AR	24
Figura 5	<i>Tagetes lucida</i>	29
Figura 6	Aplicación de tratamientos, TPA y VEH en ratón BALB/C	38
Figura 7	Fotografía de una CCF que muestra los compuestos C0 a C5.	43
Figura 8	Fotografía de una placa de la fracción 19 de TICbC2-F9	44
Figura 9	Fotografía de las fracciones 14-15 pertenecientes a TICbC6-F6.	45
Figura 10	Fotografía de las fracciones 19-22 pertenecientes a TICbC7-F7	45
Figura 11	Fotografía de las fracciones 21-24 pertenecientes a TICbC9-F9	46
Figura 12	Fotografía de las fracciones 30-35 pertenecientes a TICbC9-F11	46
Figura 13	Fotografía de las fracciones 41-46 pertenecientes a TICbC10-F11	47
Figura 14	Fotografía de las fracciones 3-6 pertenecientes a TICbC11-F2	47
Figura 15	Estructura química de Virgatenol	52
Figura 16	Fotografía en la que se observa la inflamación articular entre la pata que no recibió el estímulo dañino (A) y a la que se le administró C/C (B)	58
Figura 17	Fotografía en la que se observa la inflamación que rodean los tejidos de la pata que recibió C/C, así como en la zona tarsiana y metatarsiana	58

Índice de diagramas

Diagrama 1	Resumen del procedimiento de separación de los Compuestos de <i>Tagetes lucida</i>	42
------------	--	----

Índice de cuadros

Cuadro 1	Cumarinas aisladas de <i>Tagetes lucida</i>	43
Cuadro 2	TIH	48
Cuadro 3	Rendimiento y cantidad total de TIH en las 12 columnas	50
Cuadro 4	Análisis de C0 de la fracción TICbC5-F4 a través de G-M.	50
Cuadro 5	Análisis de CF9 de la fracción TICbC9-F9 a través de G-M	51
Cuadro 6	Efecto antiinflamatorio de los compuestos aislados del extracto TIH	53
Cuadro 7	Peso de órganos, bazo y pulmón, medido como porcentaje respecto al peso total del animal	59
Cuadro 8	Efecto de tratamientos de <i>T. lucida</i> sobre ratones en el ensayo de la placa caliente.	60
Cuadro 9	Efecto de diferentes tratamientos de <i>T. lucida</i> sobre la concentración local de IL-17	61
Cuadro 10	Efecto de diferentes tratamientos de <i>T. lucida</i> sobre la concentración local de TNF- α .	62
Cuadro 11	Efecto de diferentes tratamientos de <i>T. lucida</i> sobre la concentración local de IL-1 β	63
Cuadro 12	Efecto de diferentes tratamientos de <i>T. lucida</i> sobre la concentración local de IL-10	64

Índice de gráficas

Gráfica 1	Curva temporal de las primeras 4 hrs (240 min), después de la administración del estímulo intraarticular con C/C o SSF (basal)	54
Gráfica 2	Curso temporal de inflamación articular inducida con C/C, de los grupos control.	55
Gráfica 3	Curso temporal de la inflamación articular inducida con C/C en ratones que recibieron el extracto hexánico de <i>T. lucida</i> (TI)	56
Gráfica 4	Curso temporal de la inflamación articular inducida con C/C en ratones que recibieron 7-isoprenyloxycumarina, herniarina y virgatenol.	56
Gráfica 5	Curso temporal de la inflamación articular inducida con C/C en ratones que recibieron la mezcla de amirinas y espatulenol.	57

1. Introducción

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, que causa inflamación en el revestimiento de las articulaciones. Provoca deformaciones musculoesqueléticas debilitantes, debidas a la destrucción de tejido articular y erosión ósea. La AR afecta tanto a las articulaciones pequeñas y medianas como muñecas, codos, manos, rodillas, tobillos y hombros, así como a otros órganos del cuerpo como piel, ojos, corazón, sistema nervioso, riñones, pulmones, entre otros.

Si bien, existen numerosos indicios acerca de los acontecimientos que dan inicio al desarrollo de la AR, no se conoce con precisión su naturaleza. Las investigaciones realizadas indican que la patogénesis de la enfermedad involucra procesos inmunes tanto humorales como celulares y que tal vez influyan también los factores genéticos y ambientales

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la AR es una de las principales causas de ausentismo y retiro laboral prematuro en el mundo y afecta entre el 1 y 1.5 % de la población mundial. Además, en Latinoamérica, cifras de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), indican que hay 34 millones de personas con discapacidad permanente y 140 millones con discapacidad temporal a causa de las enfermedades reumáticas.

En la actualidad, no existe cura para la AR y los tratamientos usados por los sistemas de salud, son principalmente antiinflamatorios y son eficaces en la medida que reducen la inflamación, alivian parcialmente el dolor, pero no generan una reducción de los síntomas o prevención en la progresión de la enfermedad. Otros, los modificadores de la enfermedad si bien intentan reducir el deterioro, por retrasar el daño articular, tampoco mejoran la calidad de vida de los pacientes, ya que inducen efectos adversos desde leves a graves como hepatotoxicidad, daño gastrointestinal, aumento de peso, cataratas, osteoporosis, inflamación pulmonar, alopecia, daño renal y pueden crear dependencia si se toman en exceso, sin mejorar la evolución de la enfermedad.

Numerosos estudios confirman que las plantas medicinales son fuente de metabolitos secundarios que en su conjunto podrían representar ventajas sobre los fármacos de síntesis que se usan en la actualidad, debido a que sus componentes inducen efectos

sinérgicos y con ello un mayor impacto para disminuir los efectos dañinos de las enfermedades, entre ellas las reumáticas como la AR.

En México, son utilizadas diversas plantas para el tratamiento de enfermedades con un fondo inflamatorio, como lo es la AR. Un ejemplo de éstas es *Tagetes lucida*, conocida comúnmente como “pericón”. Los reportes etnomédicos la recomiendan para tratar los nervios, cólicos menstruales, dolor y reumatismo. Existen reportes científicos que indican su actividad farmacológica en modelos de ansiedad, de depresión, como sedante y espasmolítico. Recientemente, el grupo de investigación del CIBIS-IMSS mostró la capacidad antiinflamatoria del extracto hexánico y de 5 cumarinas, entre las que destacan 7-isoprenyloxilcumarina y herniarina aisladas de la planta.

Esta evidencia y su uso en padecimientos reumáticos llevaron a proponer a *Tagetes lucida* como objeto de estudio con la finalidad de mostrar su efecto antiartrítico. En este trabajo de investigación se pudieron obtener 2 fracciones donde predomina una mezcla de α - y β amirina (Amix) así como espatulenol (Esp), respectivamente., y una cumarina llamada virgatenol, reportándose por primera vez para esta especie. Los resultados obtenidos, indican la capacidad antiinflamatoria de la planta, desde el extracto hasta cada uno de los compuestos obtenidos. Además, se muestra que el extracto de TIH a 25 mg/kg, 7-Iso, Her, Vir, Esp y Amix son capaces de disminuir la inflamación articular y modular la concentración de citocinas involucradas en el proceso de daño, en el modelo de AR experimental-inducido con carragenina-caolín (CC). También se reporta que TIH y Her, con propiedades antinociceptivas.

2 Antecedentes

2.1 Condiciones reumáticas crónicas

Las enfermedades reumáticas comprenden alrededor de 150 condiciones médicas, que usualmente son progresivas y están asociadas con dolor. Se pueden categorizar como enfermedades articulares, discapacidades físicas, desórdenes espinales y condiciones que resultan de traumas físicos. Existen más de 100 tipos de artritis y enfermedades asociadas,

entre las más comunes están la artritis reumatoide, espondiloartritis y la artritis psoriásica; la de mayor impacto es la artritis reumatoide (Arthritis Foundation, 2016).

2.2 Artritis reumatoide

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune, crónica, sistémica, lentamente progresiva la cual evoluciona hacia el daño articular e incapacidad, si no es diagnosticada y tratada oportunamente. Esta patología se caracteriza por ser poliarticular, simétrica y seguir un patrón de afección predominante en las articulaciones periféricas, suele respetar las articulaciones proximales (Morales-López, 2013).

2.3 Epidemiología

Las enfermedades reumáticas afectan aproximadamente a 10 millones de personas en México, siendo la Artritis Reumatoide y la Osteoartritis las dos más comunes con 1 y 8 millones de personas respectivamente (Instituto Mexicano del Seguro Social, 2009).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la AR es una de las mayores causas de ausentismo y retiro laboral prematuro en el mundo (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2016).

Según cálculos de la OMS, la artritis reumatoide afecta entre el 1 y 1.5 % de la población mundial; además en Latinoamérica, cifras de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), indican que hay 34 millones de personas con discapacidad permanente y 140 millones con discapacidad temporal a causa de las enfermedades reumáticas (Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado, 2016).

Esta enfermedad predomina en el sexo femenino con un promedio de edad a partir de los 45 años. Aproximadamente tres de cada cuatro personas con AR son mujeres, aunque en edades avanzadas la diferencia de prevalencia entre ambos sexos disminuye (Morales-López, 2013). También aparece en personas jóvenes, en México existen datos registrados de pacientes con inicio de enfermedad desde los 12 años (Jaillier *et al.*, 2015).

Los padecimientos de origen reumático tienen una pesada carga económica y moral

para el paciente, su familia y la sociedad. La invalidez ocasionada por estas enfermedades repercute de manera importante en la calidad de vida del paciente, pues disminuye su capacidad funcional y habilidad para realizar funciones sociales y de bienestar (Suárez-Garza, 2006).

2.4 Etiología

Se desconoce la causa exacta de la AR y si bien hay datos bien documentados del papel de genes en el desarrollo y evolución de la enfermedad, no es claro el factor de predisposición que antecede a dicho proceso patológico. Algunos factores ambientales involucrados son el humo del cigarro, contaminantes ambientales, algunos agentes infecciosos virales y bacterianos (Instituto Nacional de la Salud, 2014).

2.5 Síntomas

Algunos pacientes pueden presentar únicamente un proceso oligo-articular de breve duración y con lesiones articulares mínimas, mientras que otros padecen afección en varias articulaciones, progresiva e imparable, que evoluciona hacia la aparición de deformidades articulares importantes (Secretaría de Salud, 2011).

Si se padece AR, es probable presentar los siguientes síntomas en algunas articulaciones: ardor, hinchazón, hipersensibilidad, enrojecimiento, dolor frecuente, dificultad en la movilidad (Arthritis Foundation, 2016). La AR puede hacer que una persona se sienta completamente enferma, particularmente durante los períodos de agudización, se puede presentar: pérdida del apetito, pérdida de peso, tener poca energía, presentar fiebre, volverse anémico, desarrollar nódulos reumatoides, entre otros (Neira y Ortega 2006).

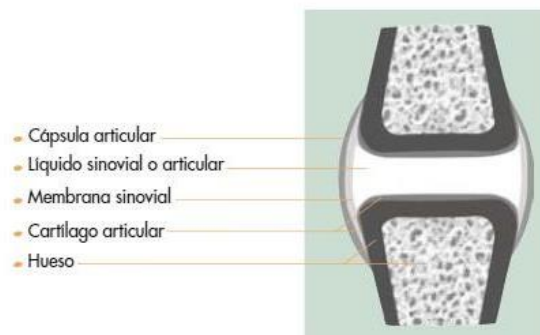
En ocasiones, las personas con AR presentan inflamación de los revestimientos que rodean al corazón (pericarditis) y a los pulmones (pleuritis), las glándulas lacrimógenas y

salivares (síndrome de Sica / resequedad o síndrome de Sjögren) así como en los vasos sanguíneos (vasculitis) (Arthritis Foundation, 2016).

2.6 Anatomía estructural y funcional de las articulaciones

La articulación está formada por la unión de dos huesos y permite la movilidad del esqueleto. Las estructuras que permiten esta unión son la cápsula articular y los ligamentos. En la parte interior de la cápsula, las articulaciones presentan la membrana sinovial que segrega un fluido, el líquido sinovial (Figura 1), que actúa como lubricante facilitando, por su viscosidad, el roce de los extremos óseos que se articulan. Además, la membrana sinovial contiene células inmunitarias y, por lo tanto, tiene un papel destacado en la defensa de la articulación, por lo que constituye el lugar donde se producen las reacciones inflamatorias (Coordinadora Nacional de Artritis, 2014).

Figura 1. Componentes principales de una articulación móvil. Obtenido de (Coordinadora Nacional de Artritis, 2010)



Otro componente muy importante de las articulaciones es el cartílago articular, que recubre las superficies óseas articulares y actúa a modo de almohadilla en los movimientos de desplazamiento entre las mismas (Sociedad española de reumatología, 2019).

2.7 Fisiopatología de la AR

2.7.1 Inflamación.

La fisiopatología de la AR es compleja e involucra muchos tipos celulares, entre ellos los macrófagos, las células T y B, fibroblastos, condrocitos y células dendríticas. Afecta directamente a las articulaciones, ya que el sinovio es el primer sitio donde se inicia la cascada de mediadores inflamatorios (Lam *et al.*, 2000; Picerno *et al.*, 2015).

Asimismo, se conoce que los macrófagos sinoviales activados liberan grandes cantidades de interleucina (IL) 1- β y factor de necrosis tumoral (TNF-) alfa (α), al espacio sinovial. Las citocinas son moléculas que modulan la respuesta inmune, cada una con características propias, algunas poseen principalmente capacidad proinflamatoria y otras, antiinflamatoria; así que, un desequilibrio entre los dos mecanismos de regulación contribuye a la patogenia de la AR. Dos de estas moléculas, la IL-1 β y el TNF- α , son identificadas como clave en la fisiopatología de este trastorno y se ha observado, por ejemplo, un aumento de la concentración de IL-1 β y TNF- α en el líquido sinovial y el tejido articular de pacientes con la enfermedad (Cisneros-Caballero *et al.*, 2017). La IL-1 β actúa sobre diferentes tipos de células, como monocitos, macrófagos, condrocitos y sinoviocitos, estimula la liberación de mediadores proinflamatorios que causan destrucción tisular. A su vez, estas células producen más citocinas proinflamatorias como la IL-17 y otros factores de inflamación, contribuyendo a la cascada de cambios inflamatorios agudos y crónicos en la articulación reumatoide (Pinto-Tasende *et al.*, 2003).

También los sinoviocitos activan osteoclastogénesis promoviendo la liberación de la IL-10, del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) por los osteoclastos, que actúan como células presentadoras de antígeno y por tanto activan células T tipo CD4⁺ y CD8⁺, perpetuando así, los eventos inflamatorios; (Lam *et al.*, 2000; Picerno *et al.*, 2015).

El tejido sinovial inflamado promueve la destrucción de la articulación mediante la activación de osteoclastos, condrocitos y fibroblastos sinoviales que destruyen el cartílago y hueso vecino. La médula ósea subyacente también es infiltrada por agregados de

linfocitos T y B autorreactivos y es dañada, en consecuencia, el proceso inflamatorio persiste (Cisneros-Caballero *et al.*, 2017).

Además, la inflamación articular sostenida hace que el cartílago, el cual que permite el rozamiento suave entre los huesos, adelgace y desaparezca (Sociedad española de reumatología, 2019).

La alteración inicial parece ser una reacción inflamatoria inespecífica que se desencadena por un estímulo desconocido. Se manifiesta como daño sinovial autoinmune que se da por la infiltración de células T predominantemente y macrófagos, a la membrana sinovial, lo que lleva a una lesión microvascular y un aumento en el número de células de revestimiento sinovial e inflamación perivascular por células mononucleares, posteriormente este proceso inflamatorio se extiende hacia el cartílago adyacente y el hueso ocasionando así el daño articular. No está claro el mecanismo exacto mediante el cual se produce la destrucción ósea cartilaginosa, aunque el líquido sinovial contiene enzimas capaces de degradar el cartílago, la mayor parte de la destrucción se produce en yuxtaposición a la membrana sinovial inflamada que se extiende hasta cubrir el cartílago articular (Morales-López, 2013).

2.7.2 Células y citocinas en la artritis reumatoide

El proceso inflamatorio está mediado fundamentalmente por la producción de mediadores solubles, en su mayoría citocinas, pero también factores de crecimiento y quimiocinas.

Las citocinas son proteínas o glucoproteínas de bajo peso molecular (< 30 kDa) con vida media corta, producidas principalmente por las células del sistema inmunológico (Sánchez-Ramón *et al.*, 2010). Estas moléculas están directamente implicadas en los procesos inmunes asociados con la patogénesis de la AR, se expresan y son funcionalmente activas en los tejidos sinoviales. En consecuencia, la modulación de la citocina altera el resultado en muchos modelos de artritis en roedores. Es importante destacar que el TNF está dirigido al tratamiento estándar de pacientes con artritis reumatoide (McInnes y Schett, 2007).

Las funciones de las citocinas dentro de una red reguladora compleja están relacionadas con procesos inmunológicos específicos que promueven la autoinmunidad, la inflamación crónica y la destrucción de tejidos (McInnes y Schett, 2007). Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), el factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF) y las quimiocinas (Filella *et al.*, 2002).

En la membrana sinovial que tapiza la superficie articular y las vainas tendinosas se produce una infiltración por diversas células inflamatorias, entre las que los linfocitos Th17, secretores de la citocina con mayor efecto proinflamatorio, la interleucina (IL-17), parecen desempeñar un papel iniciador, interaccionando con células dendríticas (CD), macrófagos y linfocitos B (Figura 2, Miossec *et al.*, 2009).

Los macrófagos son células fundamentales en la fisiopatología y la magnitud de su infiltración se correlaciona con los síntomas, probablemente debido a la secreción de mediadores proinflamatorios claves, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y la IL-1, implicadas en la perpetuación de la inflamación crónica en la AR (Hamilton y Tak, 2009).

Los linfocitos B actúan mediante la producción de autoanticuerpos, como células activadoras de los linfocitos T en su función de APC y de activación de fibroblastos mediante la secreción de TNF. Además, se forman folículos linfoides en el tejido sinovial, lo que sugiere que la presentación de antígenos tiene lugar localmente, mientras que en otros pacientes los linfocitos B se distribuyen en agregados o difusamente (Sánchez-Ramón *et al.*, 2010).

Por último, se produce deformación e inmovilidad articular. La desaparición del cartílago articular y fibrosis del espacio articular conducen a la inmovilización articular. (Noa-Puig *et al.*, 2011).

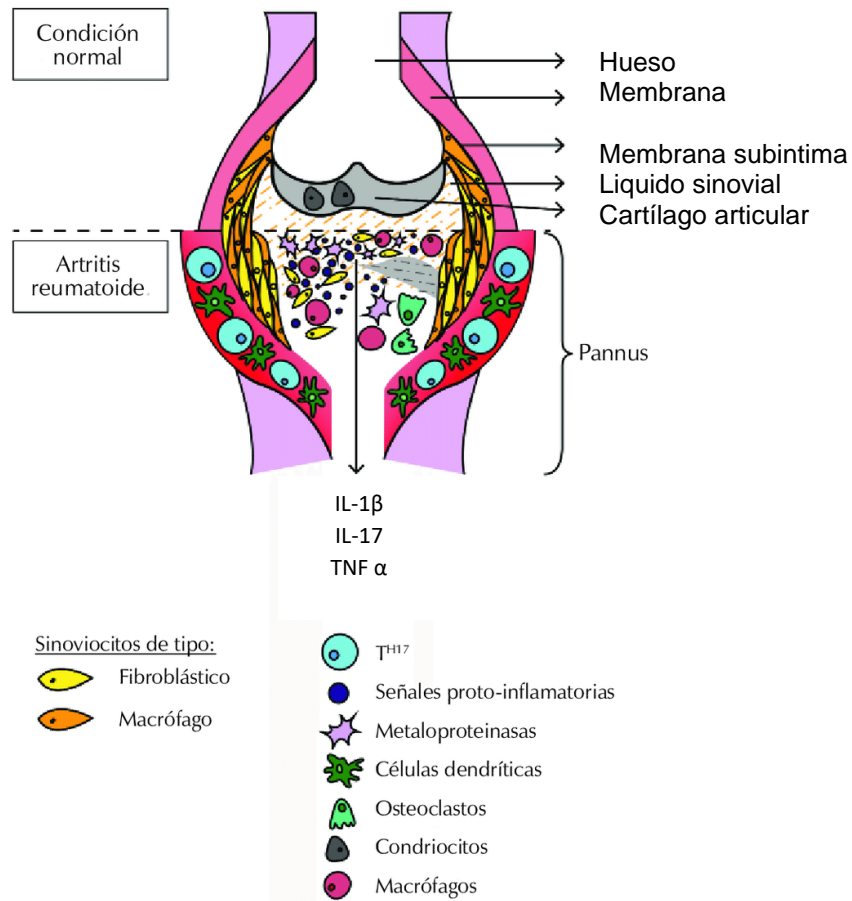


Figura 2. Esquema a nivel celular de la fisiopatología de la artritis reumatoide en una articulación. La cavidad artrítica está rodeada por una membrana sinovial, lo cual alberga al líquido sinovial, la población de sinoviocitos adheridos a la membrana subintima y las cabezas de los huesos. Aunque la fisiopatogenia de la AR no es del todo entendida, se han identificado elementos claves en el desarrollo de este padecimiento que comienza con la respuesta específica de los linfocitos T auto reactivos a determinados antígenos junto con la proliferación descontrolada de sinoviocitos, la estimulación de vías de producción e interacción de citocinas proinflamatorias y el desarrollo de la hiperplasia sinovial y vasodilatación. Todos estos escenarios tienen el propósito final de generar una inflamación en la articulación, lo que lleva a la consecuente degradación del cartílago y hueso articular (Cisneros-Caballero *et al.*, 2017).

2.7.3 Principales interleucinas que participan en el proceso inflamatorio

Interleucina-1

Es un polipéptido del que existen dos formas, denominadas IL-1 α e IL-1 β . La IL-1 α actúa principalmente intracelularmente y no se encuentra en la circulación general. En cambio, la IL-1 β es la forma predominante en el espacio extracelular. Los macrófagos activados son la principal fuente fisiológica de IL-1, citocina que destaca por su capacidad proinflamatoria (Filella *et al.*, 2002).

Interleucina-10

Inhibe las citocinas proinflamatorias, principalmente TNF- α , IL-1 producidas por macrófagos y monocitos activados, estimulando la producción endógena de citocinas antiinflamatorias. Además, aumenta la proliferación de mastocitos e impide la producción de IFN- γ por células NK (Marcio *et al.*, 2011).

Interleucina-17

Citocina implicada en el desarrollo de la inflamación. Sus genes blancos incluyen aquéllos que codifican para citocinas pro-inflamatorias, citocinas hematopoyéticas, quimiocinas, péptidos antimicrobianos y moléculas útiles en la remodelación de tejido, dependiendo del tipo celular y enfermedad. Muchos experimentos sugieren que la IL-17 induce inflamación del tejido, principalmente al estimular la expresión de varias citocinas proinflamatorias tales como TNF- α e IL-1 β y al ejercer su acción sobre la ciclooxigenasa 2 (COX-2) y la sintasa del óxido nítrico inducible (iNOS) puede producir el incremento en la producción de la PGE₂ y de NO por varios tipos celulares. Se han encontrado niveles elevados de la IL-17 en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide (Flores-García y Talamas-Rohana, 2012)

Factor de necrosis tumoral α

El TNF- α se ha relacionado con la activación de diversos tipos celulares del sistema inmune y no inmune en la membrana sinovial, causando inflamación articular en pacientes con AR y ARJ. El TNF- α induce, además, la síntesis de las metaloproteasas y los osteoclastos involucrados en la degradación del cartílago y la erosión del hueso, respectivamente (Fragoso *et al.*, 2013).

2.8 Tratamiento de la artritis reumatoide

La AR generalmente requiere tratamiento de por vida que incluye medicamentos, fisioterapia, ejercicio y posiblemente cirugía. El tratamiento agresivo y oportuno para este tipo de artritis puede retardar la destrucción de la articulación (Noa-Puig *et al.*, 2011).

Los antiinflamatorios no-esteroides (AINEs) se utilizan para disminuir la inflamación y el dolor que acompañan a la AR. Algunos AINEs incluyen diclofenaco, ibuprofeno, indometacina y naproxeno, entre otros. Estos medicamentos por sí solos no suelen constituir un tratamiento adecuado para la AR. La mayoría de los pacientes con AR también necesitan tomar medicamentos modificadores de la enfermedad o agentes biológicos. Los AINEs causan efectos secundarios adversos, como dolor de estómago, úlceras gástricas e incluso hemorragias. También se asocian a problemas cardíacos, daño hepático y renal en personas susceptibles (Arthritis foundation, 2016).

La terapia temprana con fármacos modificadores de la enfermedad (FAMEs), consigue mejorar los signos y síntomas de la AR y frenar la progresión radiográfica (Domínguez-Baena *et al.*, 2015). Sin embargo, los medicamentos como el metotrexato (MTX), sulfasalazina, hidroxicloroquina y leflunomida (FAMEs biológicos), que son aceptadas como la terapia «*gold standard*», llevan a cierta mejoría de los síntomas, pero son incapaces de detener la destrucción articular. Son de acción lenta e incluso tóxica y poco eficaz en casos severos (Aguillón *et al.*, 2005).

Otra alternativa de tratamiento de la AR es el uso de corticosteroides, los cuales reducen la hinchazón e inflamación articular. En dosis bajas por vía oral (10 mg/día), su uso sistémico está limitado y se deben utilizar de ser posible por corto tiempo y en dosis bajas (Noa-Puig *et al.*, 2011).

Los denominados agentes biológicos, son moduladores específicos de glóbulos blancos que controlan la inflamación de manera efectiva e incluyen el abatacept, el cual reduce el número de células T; (Schiff *et al.*, 2009) el rituximab, el cual reduce el número de células B (Keystone *et al.*, 2007) y los inhibidores del TNF los cuales bloquean el TNF- α y comprenden: adalimumab, el etanercept y al infliximab. Se les ha atribuido múltiples eventos adversos, especialmente infecciones oportunistas severas y tuberculosis (El Bahri *et al.*, 2007) Además, el costo de estos agentes es mucho mayor que las terapias convencionales (Van-Vollenhoven, 2009).

2.8.1 Metotrexato (MTX)

El MTX es uno de los fármacos de primera elección al tratamiento inicial de la AR. Un porcentaje importante de pacientes no responden clínicamente al tratamiento. Por el resultado limitado de la monoterapia con este fármaco, se utilizan las combinaciones del MTX con otros FARME para incrementar el porcentaje de respuesta en el tratamiento de la AR (Boers *et al.*, 1997).

El metotrexato es un antagonista del ácido fólico que reduce los niveles de tetrahidrofolato en las células por inhibición de las enzimas dihidrofolato reductasa y timidilato sintetasa, responsables en la síntesis de ácidos nucleicos (Pérez-Hernández *et al.*, 2012). El MTX tiene adicionalmente propiedades inmunosupresoras y antiinflamatorias. En cuanto a la actividad inmunosupresora, inhibe la proliferación de linfocitos tipo CD3 - CD4 y otras células inmunocompetentes como los monocitos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares. El MTX también modula citocinas como IL-4 e IL-10, interferón alfa (INF- α) e IL-2, generando así acciones antiinflamatorias e inmunorreguladoras (Restrepo *et al.*, 2016).

Mecanismo de acción

Una vez dentro de la célula, los poliglutamatos de MTX se unen de forma competitiva y con mayor afinidad que el dihidrofolato, a varias enzimas e inhiben su función: DHFR, TYMS y AICAR formiltransferasa (Edno *et al.*, 1996). Al inhibir la AICAR formiltransferasa, se genera acumulación intracelular de AICAR, lo que, por inhibición competitiva de la adenosina monofosfato (AMP) de saminasa, provoca un acúmulo de AMPc. La célula expulsa el exceso de AMPc fuera de ella, donde se transformaría en adenosina que se libera en la sangre (Goicoechea-García ,2016).

Este mediador activa receptores extracelulares ADORA 2A (A2a), A2b y A3 en los monocitos y los macrófagos, bloquearía la formación de NF- κ B (figura 3) y con ello la síntesis de citocinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), IL-6 e IL-8, promueve la transcripción de ARNm para el receptor antagonista de IL-1 y aumenta la secreción IL-10, potente antiinflamatorio (Cronstein,1997). La activación de los receptores de adenosina sobre las células endoteliales humanas inhibe la producción de IL-6 e IL-8 y disminuye la expresión de E-selectina en la superficie celular. (Lebbe *et al.*, 1994; Bressolle *et al.*, 2000)

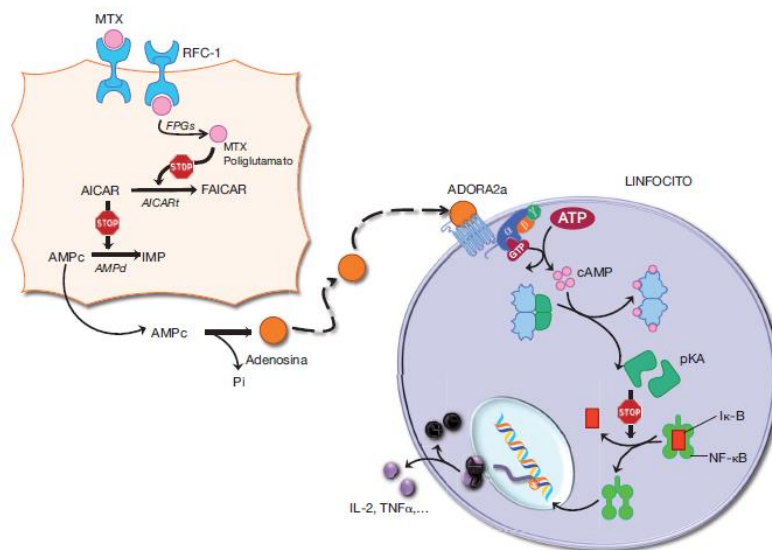


Figura 3. Propuesta de mecanismo de acción antiinflamatorio del metotrexato. El metotrexato provoca la liberación de AMPc al exterior celular, donde se transforma en adenosina, que se une a los linfocitos para impedir la síntesis de sustancias proinflamatorias (Goicoechea-García ,2016)

2.9 Morfología de la articulación

Por orden de frecuencia, las articulaciones más afectadas son las de las manos y los pies (90%), los tobillos y las rodillas (80%), los hombros (60%), los codos y las muñecas (60%), las articulaciones de la región cervical de la columna vertebral (40%), las caderas (10-30%) (Figura 4). En la AR no se afectan, salvo auténticas excepciones, las articulaciones de las regiones media e inferior de la columna vertebral (regiones dorsal, lumbar y sacra) (Coordinadora Nacional de Artritis, 2010).

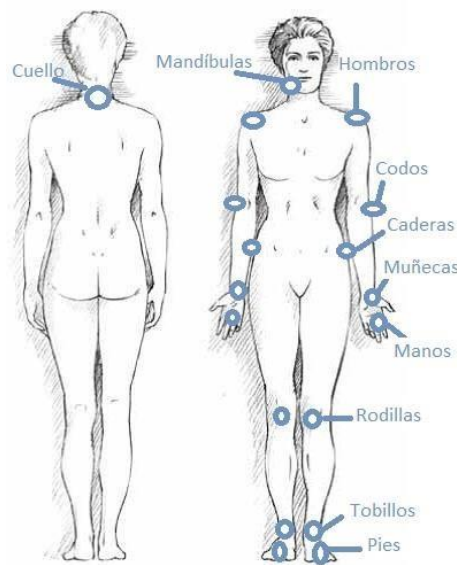


Figura 4. Principales articulaciones afectadas en la AR. (Arthritis Foundation, 2016)

2.10 Modelos biológicos

Los modelos animales de AR se utilizan para investigar la patogénesis de la enfermedad y para evaluar potenciales fármacos antiartríticos. Existen criterios importantes en la selección de los modelos animales como son: 1) su capacidad para predecir la eficacia de los agentes evaluados en humanos, 2) la facilidad para realizar el modelo, reproducibilidad de los datos, duración del período de prueba y 3) la similitud en la enfermedad y/o patogénesis con la del humano (Noa-Puig *et al.*, 2011).

El uso de modelos animales de AR ha contribuido al conocimiento de los procesos y mediadores importantes en la generación de inflamación, destrucción de cartílago y resorción ósea, que conllevan avances importantes en la terapéutica de esta destructiva enfermedad (Bendele, 2001).

Para evaluar nuevas terapias potenciales para el tratamiento de la AR existen varios modelos como el de AR inducida por adyuvante completo de Freund en ratas (AIA), el inducido por colágeno en ratas y ratones (AIC) (Hegen *et al.*, 2008; Asquith *et al.*, 2009), AR inducida por antígenos: albúmina de suero bovino (BSA) (Noa-Puig *et al.*, 2011).

Otro modelo es la artritis inducida por carragenina, se ha utilizado en conejos, perros y cerdos en varios estudios (Hansra *et al.*, 2000).

2.11 Mono artritis inducida con carragenina

Se considera mono-artritis a la inflamación de una articulación, oligo-artritis a la inflamación de dos a cuatro articulaciones y poliartritis a la inflamación de cinco o más articulaciones (González-Pineda, 2012).

La carragenina ha sido utilizada para inducir artritis en un modelo agudo con la combinación de otros agentes irritantes. Se han reportado los cambios histológicos que ocurren en la inducción de artritis administrando carragenina en rodillas de las ratas, lo cual ha permitido validarlo como un modelo para el estudio de artritis reumatoide (Sluka y Westlund, 1993). Un método utilizado para inducir artritis aguda es la administración de carragenina y caolín en las articulaciones de las ratas ya que origina una inflamación que puede perdurar por varias semanas (Hansra *et al.*, 2000).

2.12 Edema auricular inducido por TPA

Fue descrito por De Young *et al.*, 1989 y modificado por Payá *et al.*, 1993. El 13-acetato-12-O-tetradecanoilforbol (TPA) tiene propiedades irritantes, proinflamatorias y promotoras de tumores. Su administración desencadena todos los eventos propios del

proceso inflamatorio: vasodilatación, eritema, extravasación y edema (Gómez *et al.*, 2011). El edema está asociado con un incremento de eicosanoides como PGE₂ y LTB₄, además induce la expresión de otros mediadores inflamatorios como las citocinas (Murakawa *et al.*, 2006).

2.13 Hiperalgia: modelo de la placa caliente

En 1986, la International Association for the Study of Pain (IASP) definió el dolor como una experiencia sensorial y emocional desagradable con daño tisular real o potencial o descrito en términos de dicho daño (Merskey y Bogduk 1994). La terapéutica del dolor se basa en el bloqueo de las vías nerviosas que llevan la información de la lesión provocada hasta el cerebro y así, evitar la percepción del dolor. Es por ello por lo que los analgésicos, ya sean tipo AINES o analgésicos narcóticos bloquean alguna estructura de la vía nociceptiva (Sawynok, 2003; Blivis *et al.*, 2007).

Los modelos de dolor agudo por aplicación de estímulos intensos de corta duración inducen cambios motores reflejos cuantificables y no requieren de la realización de una lesión previa en el animal. Uno de los modelos más empleados basados en el uso de estímulos térmicos son la prueba de la placa caliente ya que permite discriminar respuestas que son predominantemente de tipo supraespinal (Le Bars *et al.*, 2001).

2.14 Metabolitos secundarios

Las plantas, organismos autótrofos, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos tienen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios que se distribuyen diferencialmente entre grupos taxonómicos, presentan propiedades biológicas, muchos desempeñan funciones ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones en farmacología, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros. Reciben también la denominación de productos naturales (Ávalos-García *et al* 2009).

Los compuestos bioactivos son constituyentes que se producen naturalmente en pequeñas cantidades en las plantas y frutos (Etherton *et al.*, 2002). Muchos de los compuestos bioactivos incluyen metabolitos secundarios estructuralmente variados entre los que se cuentan: productos nitrogenados, productos fenólicos y terpenoides.

Los compuestos nitrogenados son principalmente los alcaloides y glucósidos cianogénicos. Los alcaloides son un diverso grupo de compuestos con cerca de 4 000 estructuras conocidas. Estos son fisiológicamente activos en humanos (cocaína, nicotina, morfina) y por supuesto de gran interés para la industria farmacológica (Pérez y Jiménez, 2011).

La presencia de fenoles es una característica de todos los tejidos vegetales. Los fenoles son compuestos de estructura aromática con uno o varios grupos hidroxilo, libres o sustituidos. El compuesto básico es el fenol, pero la mayor parte de estos compuestos son polifenoles. Entre los polifenoles vegetales, de los que actualmente se conocen más de 8000, figuran las quinonas fenólicas, las cumarinas, los lignanos, los estilbenos, los flavonoides, ligninas y los taninos (Azcón y Talón, 2000). Hoy en día, existe un gran interés en el estudio de estos metabolitos secundarios, debido a sus propiedades antioxidantes, antimicrobiana, anticancerígenos, vasodilatadores, antitrombóticos, cardioprotector, antiinflamatorios y antiapoptóticos, (Porras y López, 2009; Martin, 2018).

Los terpenos constituyen el grupo más numeroso de metabolitos secundarios (más de 40 000 moléculas diferentes). Los terpenos de las plantas son extensamente usados por sus cualidades aromáticas. Juegan un rol importante en la medicina tradicional, han mostrado tener actividad antioxidante, antiinflamatoria, antimicrobiana, antitumoral y antiviral, (Viteri, 2012).

2.15 Plantas medicinales utilizadas como antiartríticas

Debido a los efectos secundarios adversos de los fármacos actuales para el tratamiento de AR, la exploración de alternativas nuevas es constante. Las plantas medicinales son un recurso factible en esta búsqueda. Las propiedades antiinflamatorias,

antiartríticas entre otras, éstas han sido evaluadas en modelos de artritis inducida por colágeno, *Streptococcus sp.*, adyuvante completo de Freund, así como en cultivo *in vitro* de sinoviocitos, macrófagos, fibroblastos, condrocitos y actualmente con el monitoreo de la expresión genética de citocinas, metaloproteínas, agrecanasas (moléculas asociadas al daño articular). Algunas especies vegetales han demostrado actividad al disminuir mediadores bioquímicos (inflamatorios) tales como fosfolipasa (PLA₂), ciclooxigenasa-2 (COX-2) lipooxigenasa (LOX), prostaglandina (PGE₂) y leucotrienos (LTB₄). De igual manera, algunos compuestos de algunas especies con actividad antiartrítica pueden regular las moléculas de señalización celular, que conducen a la expresión de los mediadores de la inflamación que juegan un papel clave en la fisiopatología de la AR y otras enfermedades inflamatorias (Mitogen, 2004; Sweeney y Firestein, 2004; Venkatesha *et al* 2011).

Tripterygium wilfordii Hook F, ha demostrado tener efectividad en pacientes con artritis, observando una mejoría en los signos y síntomas de AR como dolor, reducción de edema, así como protección articular la cual fue observada en radiografías (Tao *et al.*, 2001; Tao *et al.*, 2002; Goldbach-Mansky *et al.*, 2009).

La raíz del harpagofito (*Harpagophytum procumbens*) es la droga vegetal más utilizada en terapéutica para el tratamiento de dolores asociados a artrosis, lumbalgia y otras afecciones osteoarticulares de origen reumático (Crespo y Navarro, 2012)

Se han descrito efectos inmunomoduladores de extractos estandarizados de *Uncaria tomentosa* (uña de gato), demostrándose a nivel biológico su capacidad para la inhibición de procesos inflamatorios en animales de laboratorio, así como a nivel celular la inhibición en la producción de TNF- α en células animales o humanas en cultivo (Núñez-Ponce *et al.*, 2008). Otros autores también han mostrado actividad de extractos de uña de gato en la inhibición de otras citocinas claves en el proceso inflamatorio como IL-1 e IL-6 (Lemaire *et al.*, 1999).

También existen numerosos trabajos científicos que han demostrado la actividad antiinflamatoria de diversos extractos de *Urtica dioica*, en la que están implicados numerosos mediadores del proceso inflamatorio reduciendo significativamente de forma dosis-dependiente la liberación de citocinas proinflamatorias: interleucina 1 β (IL-1 β) y factor de necrosis tumoral (TNF- α) por parte de los monocitos estimulados por lipopolisacárido (LPS) (Choy *et al.*, 2015).

2.16 *Tagetes lucida* Cav.

Es una herbácea de 30 cm a 1 m de altura, erecta y muy ramificada. Las hojas son de un mismo ancho tanto en la parte axial, como en la distal, con los bordes dentados y de color verde oscuro, de olor y sabor anís. Tiene las flores dispuestas en cabezuelas agrupadas en racimos, están en las partes terminales de la planta y son de color amarillo (Figura 5). Sus frutos son negros y pequeños (CONABIO, 2017).



Figura 5. *Tagetes lucida*. (CONABIO, 2017)

Es originaria de México, Guatemala y Honduras; habita en climas cálido, semicálido, seco, semiseco y templado, entre los 800 a los 850 msnm y de los 1000 hasta los 4000 msnm. Es común encontrarla en terrenos de cultivo abandonados o cerca de las milpas, asociada a bosque tropical perennifolio, matorral xerófilo, pastizal. En ocasiones

ocupa partes altas de laderas y montañas en bosque mesófilo de montaña, de encino, de pino, mixto de pino-encino y de junípero (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2014; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2017; CONABIO, 2017).

2.17 Clasificación taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Traqueophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida (dicotiledóneas)

Subclase: Asteridae

Orden: Asterales

Familia: Asteraceae

Género: Tagetes

Especie: *Tagetes lucida* Cav.

Su sinonimia científica es *Tagetes florida* sweet, mientras que los nombres comunes que se le dan son flor de pericón, Yauhtli, anisillo, atagote, cedrón, flor de Xuchitl, hierbanís, hierba de nubes, hierba de San Juan, hierba santa, periquillo, rincón, Santa María, Santa María de Jardín, tatalencho, yerbanís (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2014; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2017; CONABIO, 2017).

2.18 Usos medicinales

Se le atribuyen una gran variedad de usos medicinales, destacando en este documento el dolor (estómago, espalda, abdomen, menstrual, muela, riñón, huesos y reumático), es útil para problemas de reumatismo e inflamación. Se refiere su uso medicinal desde el siglo XVI, en el código Florentino y por Francisco Hernández, para curar diarrea y fiebre, curar úlceras, tos, dolor de cabeza (Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana, 2014; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2017; CONABIO, 2017)

2.19 Química y farmacología de *T. lucida*

Existen estudios farmacológicos relacionados con la actividad antidepresiva, sedante y ansiolítica de esta planta (Bonilla *et al.*, 2015) Recientemente, el grupo de investigación del CIBIS-IMSS mostró la capacidad antiinflamatoria del extracto hexánico y de 2 cumarinas aisladas de la planta (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2019). Además de su capacidad citotóxica en diferentes líneas celulares (Vega-Ávila *et al.*, 2009), antifúngica y antibacteriana (Céspedes *et al.*, 2006). Sin embargo, no hay evidencias del estudio farmacológico antiartrítico y/o analgésico.

De los estudios químicos realizados a la planta se menciona la presencia de glucopiranosido; ácido 3-(2-O-beta-D-glucopiranosil-4-metoxifenil) propanoico, 6-hidroxi-7-metoxicumarina, herniarina, escopoletina, α -tocoferol, ácido gálico, ácido cafeico (Aquino *et al.*, 2002; Pérez-Ortega *et al.*, 2016). Se han aislado aceites esenciales, destacándose por su concentración en la planta, al metil-chavicol (Ciccio, 2004).

3 Justificación

La AR es una enfermedad crónica-degenerativa que causa un alto índice de comorbilidad y disminuyen la calidad de vida del paciente. Provoca dolor e inflamación, que de manera progresiva daña a las articulaciones, cartílago, huesos, tendones y ligamentos que con ello limita la funcionalidad de estas y si no se trata de forma apropiada y a tiempo, produce discapacidad de forma permanente. Afecta la vida laboral y social del individuo, provocando así una problemática de salud y social. El proceso fisiopatológico de esta enfermedad es muy complejo, al que subyacen procesos de inflamación crónica tanto articular como sistémica, eventos de estrés oxidante lo que lleva a la destrucción ósea y articular. Estos mecanismos requieren ser contrarrestados mediante un tratamiento que este asociado a una polifarmacia de productos de síntesis que, si bien son efectivos, parecieran tener un efecto significativo a largo plazo, pero que además inducen efectos tóxicos importantes.

En la búsqueda de alternativas farmacológicas, las plantas han surgido como una fuente apropiada de recursos terapéuticos en enfermedades crónico-degenerativas, como es el caso de la AR. Los estudios farmacológicos indican que extractos y fracciones de diversas especies medicinales en el mundo poseen efecto antiartrítico, datos que son obtenidos de diferentes modelos biológicos utilizados que han permitido además el aislamiento e identificación de compuestos con dicha actividad.

Basados en la información etnomédica, química y farmacológica de la especie *Tagetes lucida*, se propone evaluar su efecto antiartrítico como modulador de la respuesta inflamatoria mediada por citocinas.

Los resultados de este trabajo aportarán información básica sobre los efectos de esta especie en la inflamación y la AR en ratones.

3.1 Pregunta de investigación.

La especie *Tagetes lucida* podría formar parte de un recurso terapéutico adecuado en la AR, al poseer una combinación de compuestos con propiedades antiinflamatoria, antioxidante y anti-hiperalgésica. Por lo que en este trabajo se pretende investigar si esta planta posee la capacidad de contrarrestar la inflamación y algunos de los parámetros asociados a la patología de la AR, por lo que es pertinente realizar la siguiente pregunta de investigación:

Tagetes lucida... ¿Tendrá efecto antiinflamatorio y antiartrítico por modificar los niveles de citocinas pro y antiinflamatorias con mono artritis experimental inducida con carragenina/caolín en ratones?

4 Hipótesis

Si *Tagetes lucida* posee propiedades antiinflamatorias, entonces, el extracto hexánico y los compuestos aislados de éste tendrán un efecto antiinflamatorio y antiartrítico reduciendo la inflamación articular y la concentración de citocinas en un modelo con mono artritis experimental inducida por carragenina/caolín.

5 Objetivos

5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiinflamatorio y antiartrítico del extracto TIH y compuestos aislados de *Tagetes lucida*, en el ensayo de edema auricular y en el modelo de mono artritis inducido con carragenina/caolín.

5.2 Objetivos específicos

1. Aislar e identificar diferentes tipos de compuestos de *T. lucida* por cromatografía y métodos espectrométricos.
2. Medir el efecto antiinflamatorio del extracto y los compuestos aislados de *T. lucida* en el ensayo de edema auricular en ratón inducido con el éster de forbol (TPA).
3. Evaluar el efecto que el extracto TIH y los compuestos aislados de *T. lucida* tienen sobre la inflamación articular de ratones con C/C
4. Calcular el peso de bazo y pulmón de ratones con artritis experimental con C/C como medida de inflamación y comparar los grupos con y sin tratamiento.
5. Determinar el efecto analgésico del extracto TIH y de los compuestos aislados de *T. lucida* administrados a ratones con artritis experimental y expuestos al ensayo de la placa caliente
6. Cuantificar el nivel de citocinas pro y antiinflamatorias en la articulación, bazo y pulmón de ratones con artritis experimental inducida con carragenina/caolín.

6 Metodología

6.1 Análisis químico

6.1.1 Material vegetal

Las partes aéreas de *Tagetes lucida* fueron compradas en Xochitepec Morelos, México. El ejemplar de este material fue depositado en el Jardín Botánico y el Museo de Medicina Tradicional y Medicina Herbaria del INAH-Morelos para su identificación, la cual cuenta con número de registro 2081.

Finalmente, el material vegetal fue transportado al Centro de Investigación Biomédica del Sur del Instituto Mexicano del Seguro Social (CIBIS-IMSS).

6.1.2 Preparación de extracto

Las partes aéreas de *Tagetes lucida* fueron colocadas en camas de secado en oscuridad y a temperatura ambiente, para posteriormente molerse y macerarse con *n*-hexano (7 L, Merck) durante 24 horas a temperatura ambiente, tres veces consecutivas. El extracto de hexano se concentró (Heidolph Laborota G3, Alemania) a presión reducida a 40–45 °C hasta que se eliminó todo el disolvente y después se liofilizó (LABCONCO®), para obtener finalmente un extracto que se nombró TIH y se almacenó para su posterior uso en farmacología.

6.1.3 Aislamiento de compuestos

Con base en un estudio previo, en el que se encontró que el extracto TIH y dos cumarinas aisladas presentaron actividad antiinflamatoria en un modelo de edema local (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2019). Se reprodujo la misma metodología de separación de compuestos, para su evaluación en el modelo de mono artritis experimental.

Aplicando las técnicas cromatográficas convencionales, se empacó en una columna cromatográfica, llamada columna 1, 2.7 gr del extracto TIH que fue sometido a separación sucesiva. Se utilizó el método de percolación con sílica gel de fase normal (Merck), para

extraer 50 fracciones (en volúmenes de 15 mL) del extracto. Se hizo un seguimiento por cromatografía en capa fina (CCF) de sílica gel de fase normal (Merck), lo que permitió el análisis de compuestos contenidos en las fracciones obtenidas, usando reveladores específicos para terpenos (4-hidroxibenzaldehído). Se utilizó una mezcla de los solventes n-hexano (CH_6H_{14})/ acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) variando la proporción entre ellos, permitiendo aumentar gradualmente la polaridad del sistema y de esta manera separar los diferentes compuestos contenidos en TIH.

Columna 2, se utilizaron 124.5 mg de la fracción TICbC1-F7 que fueron adsorbidos en 1 gr de sílica (0.5 gr fase normal y 0.5 gr fase reversa) en una columna de vidrio empacados en 10 gr de sílica fase reversa. El sistema de elución fue de acetonitrilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$)/ agua (H_2O), recolectando fracciones de 10 ml del cual también se fueron variando la proporción entre solventes para disminuir gradualmente la polaridad del sistema con el fin de limpiar el compuesto cero que previamente había sido observado en CCF como el mayoritario durante el procedimiento de separación con la columna 1. Así, de la columna 2 se realizaron 44 colectas que fueron posteriormente concentradas y almacenadas en viales.

Columna 3, se utilizaron 145.3 mg de la fracción TICbC1-F9 que fueron adsorbidos en 1 g de sílica (0.5 gr fase normal y 0.5 gr fase reversa), que fueron empacados en una columna de plástico con 10 g de sílica de fase reversa. Se utilizó un sistema de elución de acetonitrilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$)/agua (H_2O), variando la proporción entre solventes.

Columna 4, se tomaron 100 mg de la fracción TICbC3-F2 con la finalidad de purificar al compuesto cero, la fracción se adsorbió en 1 gr de sílica fase normal que fueron empacados una columna de vidrio con 8 gr de sílica fase normal, recolectando fracciones de 10 ml. El sistema de elución fue de n-hexano (CH_6H_{14})/ acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema.

Columna 5, de la columna 1 se tomaron las fracciones TICbC1-F7, TICbC1-F8 y TICbC1-F9 para hacer la columna 5, dando un total de 1.38 gr que fueron adsorbidos en 2 gr de sílica fase normal y empacados en una columna de vidrio con 10 gr de sílica fase

normal. Se utilizó un sistema de elución n-hexano (CH_6H_{14})/ acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema

Columna 6, de la fracción TICbC1-F18 se realizó la columna 6, en la cual se adsorbieron 353.3 mg en 1 gr de sílica fase normal en una columna de vidrio donde se empacaron 10 gr de sílica fase normal. El sistema de elución fue de diclorometano (CH_2Cl_2) /acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema.

Columna 7, se adsorbieron 73.3 mg de las fracciones TICbC6-F6 y TICbC6-F7 en 1 gr de sílica fase normal en una columna de vidrio donde se empacaron con 10 gr de sílica fase normal. El sistema de elución fue de diclorometano (CH_2Cl_2) /acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$) variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema.

Columna 8, se adsorbieron 50 gr de TIH en 75 gr de sílica fase normal en una columna de vidrio dónde se empararon con 200 gr de sílica fase normal. Se utilizó un sistema de elución n-hexano (CH_6H_{14})/acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema, se recolectaron 39 fracciones de 10 ml y se obtuvieron 10 reuniones que fueron concentradas y analizadas mediante CCF.

Columna 9, se adsorbieron 1.8 gr de la fracción TICbC8-F4 en 3 gr de sílica (1.5 gr fase normal y 1.5 gr fase reversa) en una columna de vidrio empacados en 10 gr de sílica fase reversa. El sistema de elución fue de acetonitrilo ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$)/ agua (H_2O), recolectando fracciones de 10 ml del cual también se fueron variando la proporción entre solventes para disminuir gradualmente la polaridad del sistema con el fin de limpiar el compuesto 0 .

De la fracción TICbC8-F8 se realizó la columna 10, en la cual se adsorbieron 1.6 gr en 2 gr de sílica fase normal en una columna de vidrio donde se empacaron 15 gr de sílica fase normal. El sistema de elución fue n-hexano (CH_6H_{14})/acetato de etilo ($\text{CH}_3\text{COOCH}_2\text{CH}_3$) variando la proporción entre solventes para aumentar gradualmente la polaridad del sistema. Se recolectaron 103 fracciones de 10 ml y se obtuvieron 25 reuniones que fueron concentradas y analizadas mediante CCF.

Columna 11, se adsorbieron 437.9 mg de la fracción TICbC10-F11 en 1 gr de sílica (0.5 gr fase normal y 0.5 gr fase reversa) en una columna de vidrio empacados en 8 gr de sílica fase reversa. El sistema de elución fue de acetonitrilo (C_2H_3N)/agua (H_2O), recolectando fracciones de 10 ml variando la proporción entre solventes para disminuir gradualmente la polaridad del sistema, se obtuvieron 9 reuniones que fueron concentradas y analizadas mediante CCF.

Columna 12, se adsorbieron 25 mg de la fracción TICbC7-F7 en 1 gr de sílica (0.5 gr fase normal y 0.5 gr fase reversa) en una columna de plástico empacados en 5 gr de sílica fase reversa. El sistema de elución fue de agua (H_2O) /acetonitrilo (C_2H_3N)/ recolectando 29 fracciones de 10 ml fueron variando la proporción entre solventes para disminuir gradualmente la polaridad del sistema, se obtuvieron 6 reuniones que fueron concentradas y analizadas mediante CCF.

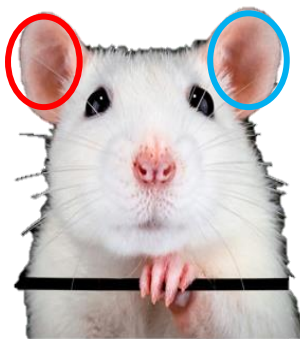
6.2 Análisis farmacológico

Se utilizaron ratones Balb-c, hembra con un promedio de peso de 20g, los cuales fueron adquiridos del bioterio del Centro médico Nacional siglo XXI-IMSS, se mantuvieron en un periodo de acondicionamiento por al menos dos semanas, en el bioterio del Centro de investigación Biomédica del Sur-IMSS, con un ciclo de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y libre acceso a agua y alimentos (pellets, Labrat, S.A de C.V.). Tres días antes del comienzo de las pruebas, los animales se acondicionaron al entorno del laboratorio y al investigador. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las Regulaciones Federales para la Experimentación y Cuidado de Animales (NOM-062-ZOO- 1999). El protocolo experimental fue sometido al Comité de Investigación del Instituto Mexicano de Seguridad Social, para su aprobación. Se emplearon el número mínimo de animales y la duración de la observación requerida para obtener datos consistentes.

6.2.1 Inflamación auricular inducida con TPA

La actividad antiinflamatoria de los extractos y fracciones se evaluó utilizando el modelo murino de edema auricular inducido por 13-acetato de 12 tetradecanoilforbol (TPA). Los ratones fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, por vía intraperitoneal) y se procedió de la manera que se describe a continuación:

Los tratamientos se aplicaron en la oreja izquierda (OI), en un volumen total de 20 μ l, 10 μ l en la parte externa y 10 μ l en la interna. Se utilizó la oreja derecha (OD) de los ejemplares como control, aplicando de la misma manera el solvente que sirvió de VEH para disolver cada uno de los tratamientos evaluados (Figura. 6). Después de 15 min, en la oreja tratada, la OI, también se le colocaron (bajo el mismo diseño de administración) 20 μ l de TPA a una concentración de 0.5 μ g/ml. Los animales fueron colocados en sus cajas y después de 4 horas, fueron sacrificados en una cámara de gases, con sobredosis de cloroformo. De cada uno de ellos, se tomaron secciones centrales de 6 mm de diámetro del pabellón auricular de ambas orejas y se calculó la diferencia de peso, entre ambas para utilizarla como parámetro de inflamación.



● Tratamientos y TPA ● Control

Figura 6. Aplicación de tratamientos, TPA y VEH en ratón Balb/c

Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- 1) **Control negativo:** Animales que solo recibieron el TPA en la oreja izquierda y acetona como VEH, en la oreja derecha.
- 2) **Control positivo:** Animales que recibieron el TPA e INDO (1mg/oreja).
- 3) **Grupo Experimental 1 (Amix):** Animales que recibieron TPA y la mezcla de amirinas (1mg/oreja).
- 4) **Grupo Experimental 2 (Esp):** Animales que recibieron TPA y espatulenol (1mg/oreja).
- 5) **Grupo experimental 3 (CF11)** Animales que recibieron TPA y compuesto CF11 (1mg/oreja).
- 6) **Grupo Experimental 4 (7-iso):** Animales que recibieron TPA y 7-isoprenyloxicumarina (1mg/oreja).
- 7) **Grupo Experimental 5 (Vir):** Animales que recibieron TPA y virgatenol (1mg/oreja).
- 8) **Grupo Experimental 6 (C7):** Animales que recibieron TPA y compuesto 7 (1mg/oreja).

6.2.2 Hiperalgnesia: prueba de la placa caliente

Se empleó una parrilla eléctrica y un vaso de precipitado como recipiente, calentado a 50°C para la realización de la prueba. Para medir el tiempo de latencia a la respuesta nociceptiva se utilizó un cronómetro.

6.2.3 Modelo de artritis inducida con C/C

Los animales fueron marcados, pesados y se agruparon en números de 7. Fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg) vía intraperitoneal (i.p). Para tener una medida basal de las articulaciones se midieron con un micrómetro digital (Mitutoyo MCD-1SB). Posteriormente en la cavidad articular del talón derecho, se les inyectó una solución de caolín (4%, 40 µl). Enseguida se realizaron flexiones y extensiones durante 15 minutos en la articulación administrada para inmediatamente inyectar carragenina (2%, 40 µl) acompañada de flexiones y extensiones 5 minutos más.

Se llevó a cabo un seguimiento de la inflamación mediante la medición del tamaño del edema articular a la 1hr, 2, 4 y 24 hrs.

Al siguiente día, se comenzó con la administración de los respectivos tratamientos, por lo que se formaron los grupos que a continuación se enumeran:

➤ **Grupo 1:** Basal (Animales que sólo fueron manipulados por el experimentador y recibieron vía articular solución salina estéril).

Los grupos abajo mencionados recibirán, vía intraarticular -i.a.-carragenina-caolín -C/C-

➤ **Grupo 2:** Control negativo o vehículo (VEH). Animales control negativo, a los que se les administró, por vía oral -v.o.- solución salina.

➤ **Grupo 3:** Control Positivo antiinflamatorio: Metotrexato a 1 mg/kg, v.o.

➤ **Grupos 4, 5:** Tratamiento experimental: Extracto hexánico de *T. lucida* (TIH) a 25 y 50 mg/kg.

➤ **Grupo 6:** Tratamiento experimental: 7-isoprenyloxicumarina a 2 mg/kg.

➤ **Grupo 7:** Tratamiento experimental: herniarina a 2 mg/kg

➤ **Grupo 8:** Tratamiento experimental: virgatenol a 2 mg/kg

➤ **Grupo 9:** Tratamiento experimental: mezcla de amirinas a 2 mg/kg.

➤ **Grupo 10:** Tratamiento experimental: espatulenol a 2 mg/kg.

Todos los tratamientos fueron administrados durante 9 días, tiempo en el cual se llevó un seguimiento de la inflamación articular mediante la medición diaria, con un micrómetro, de las dos articulaciones (con C/C y sin estímulo inflamatorio). Al final del tratamiento, los animales fueron sacrificados para extraer bazo, pulmón y articulaciones derecha e izquierda. Los bazos y pulmones fueron pesados y se calculó el índice de tamaño del órgano con respecto al peso total del animal con la siguiente fórmula:

$$\text{ÍNDICE DE ÓRGANO (\%)} = \text{Peso del órgano (g)} / \text{Peso del animal (g)} * 100$$

Las muestras fueron guardadas a una temperatura de -70°C para su posterior utilización.

6.3 Cuantificación de citocinas por el método de ELISA.

Las articulaciones fueron desintegradas con ayuda de un mortero con hielo seco. Se homogenizaron usando un politrón ULTRA TURRAX T25 agregando una solución amortiguadora de fosfatos con un pH de 7.4 y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (Inhibidor de proteasas, PMSF) al 5 mM en una proporción 3:1 con respecto a cada órgano. Las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm durante siete minutos y se recuperó el sobrenadante. El método de ELISA se llevó a cabo de acuerdo con las indicaciones del fabricante *BD Biosciences*.

6.4 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se analizaron usando un análisis de varianza (ANOVA) con una post prueba Dunnett y Bonferroni con valor de significancia de $p < 0.05$, en el programa estadístico SPSS-23.

7 Resultados

7.1 Separación y purificación de compuestos de *T. lucida*

El extracto hexánico de *T. lucida* fue separado cromatográficamente, utilizando un total de 12 columnas. De acuerdo con su parecido químico, observado por CCF, fueron agrupadas a los que se llamó “reuniones”. Cada reunión, fue nombrada de la siguiente manera: la clave de cada una se construyó iniciando con las siglas de la planta (TI), las iniciales del experimentador (Cb- Cinthya Bello), el número secuencial de columna (C1, C2...C12) y la fracción que se agrupó (F1, F2, ... etc). Finalmente, al lado de dicha clave los compuestos (C) detectados, enumerados como C0 a C7 (ver diagrama 1).

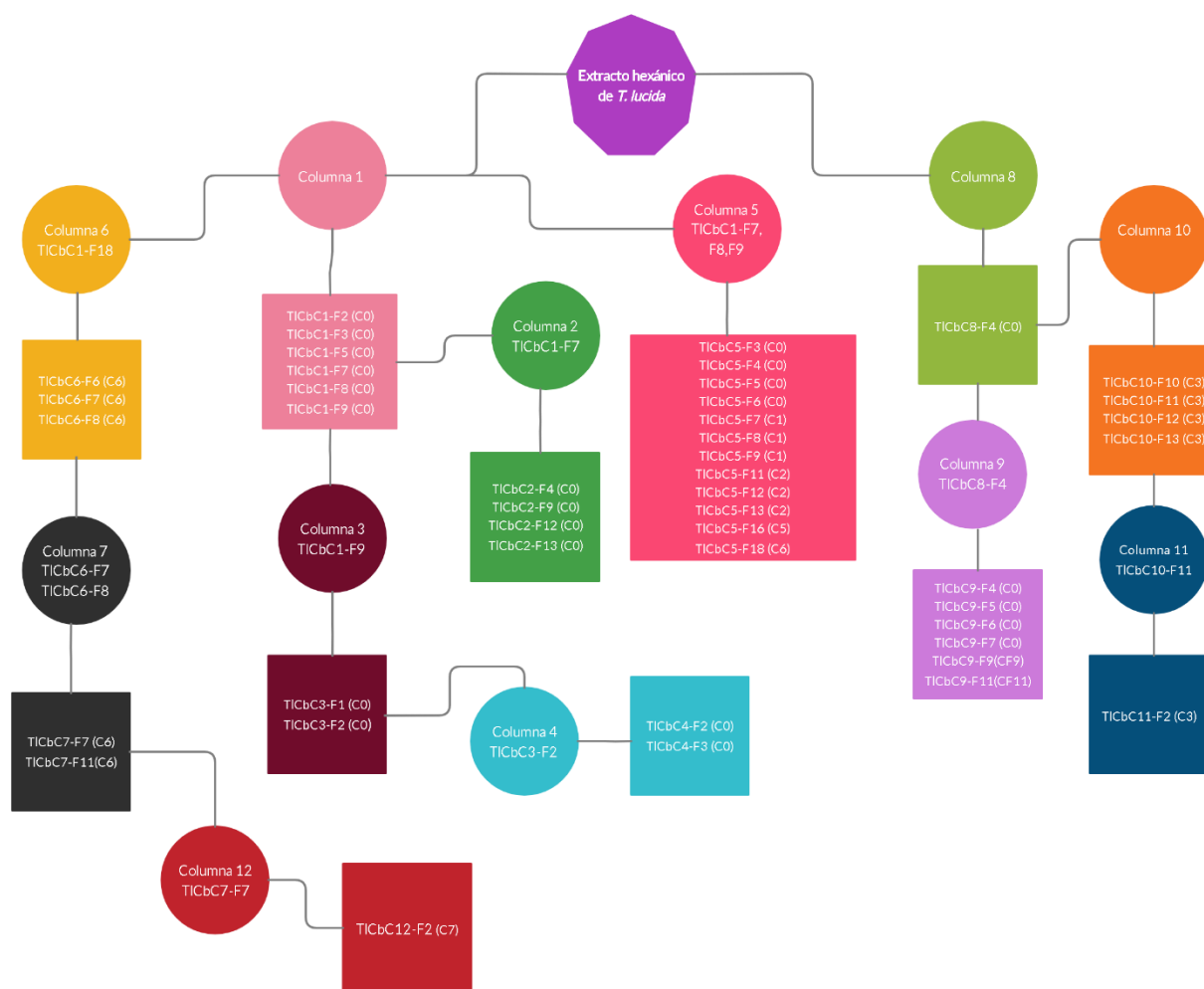


Diagrama 1. Resumen del procedimiento de separación de compuestos de *T. lucida*

Con variaciones de la metodología propuesta por Monterrosas-Brisson *et al.*, (2019), se aislaron las cumarinas C1, C2, C3 y C5 (Cuadro 1). Cabe destacar que además de éstos, se logró la separación de otros compuestos.

Cuadro 1. Cumarinas aisladas de *T. lucida* (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2019)

Clave del compuesto	Nombre químico de la cumarina
C1	7-isoprenyloxycumarina
C2	Herniarina
C3	6-methoxy-7-isopreniloxycumarina
C4	6,7,8-trimethoxycumarina
C5	Escoparona

A continuación, se describe el procedimiento de cada una de las columnas de separación que se montaron.

Columna 1. Los resultados y análisis de los productos de esta columna y por comparación cromatográfica con los compuestos de referencia C1, C2 y C5, indicaron que la fracción TICbC1-F7 observada a la luz UV tiene un compuesto diferente a las cumarinas ya mencionadas en el cuadro 1 (Figura 7). De acuerdo con la polaridad del sistema de elución y a la presencia de dicho compuesto (Figura 7, flecha amarilla) es anterior que C1, se nombró como C0 (antes de su elucidación estructural). Como se observa en la figura 7, el compuesto no está completamente separado, por lo que para su aislamiento se utilizó una segunda columna.

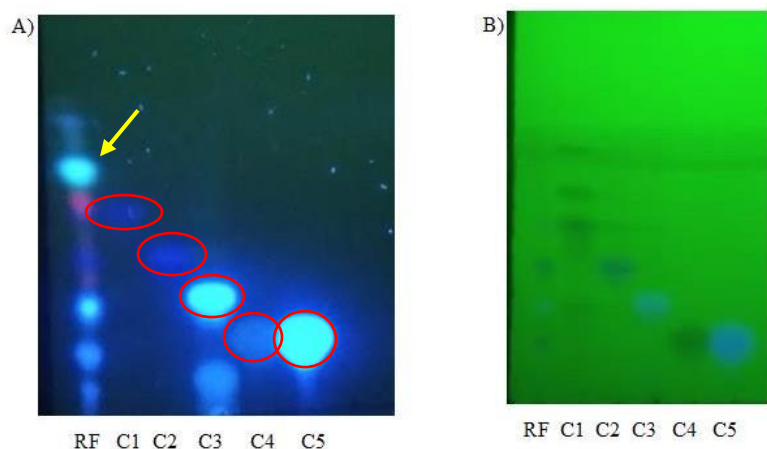


Figura 7. Fotografía de una CCF que muestra los compuestos C0 a C5. Cromatografía de fase normal con un sistema *n*-hexano/AcOEt (70:30); A) $\lambda = 400$ nm; B) $\lambda = 520-570$ nm

Columna 2. El muestreo de cada una de las colectas cromatográficas, por CCF, permitieron hacer 21 reuniones de acuerdo con la similitud química. De acuerdo con la figura 8, las fracciones TICbC2-F4, TICbC2-F9, TICbC2-F12 y TICbC2-F13 contienen el compuesto C0.

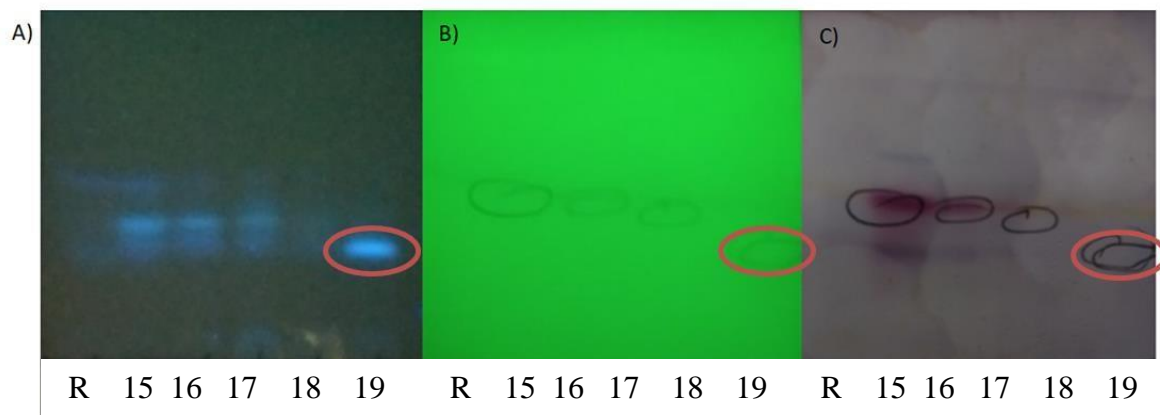


Figura 8 Fotografía de una placa de CCF que indica que la fracción 19 de TICbC2-F9 contiene al compuesto C0. Sistema *n*-hexano /AcOEt (90:10). A) $\lambda = 400$ nm; B) λ 520–570 nm; C) Revelado con 4-hidroxibenzaldehído

Columna 3. Posteriormente, se tomó la fracción TICbC1-F9 que contenía C0, con el propósito de obtener una mayor cantidad del compuesto. De esta columna, se obtuvieron 35 colectas de 10 ml, cada una de las cuales se analizó con CCF, lo que permitió reunir las en 7 fracciones. Se observó que TICbC3-F1 también contenía el C0.

Columna 4. Para esta columna se obtuvieron 32 fracciones, que fueron concentradas y analizadas mediante CCF, logrando obtener 5 reuniones. Se seleccionaron TICbC4-F2 y TICbC4-F3, por ser las de menor complejidad química, de las cuales se obtuvo un total de 5 mg de C0.

Columna 5. En este procedimiento se recolectaron 73 fracciones de 10 ml, que fueron concentradas, para la obtención de 20 reuniones, que por comparación con estándares usando reveladores químicos en CCF, se observó la presencia de C0, C1, C2 y C5. Pero además se detectó una presencia extra de un compuesto diferente a los ya mencionados, que fue nombrado entonces como C6 (antes de su elucidación estructural).

Columna 6. Se obtuvieron 34 fracciones de 10 ml, que fueron concentradas y agrupadas en 11 reuniones, que sirvieron para la obtención del compuesto C6 (Figura 9).

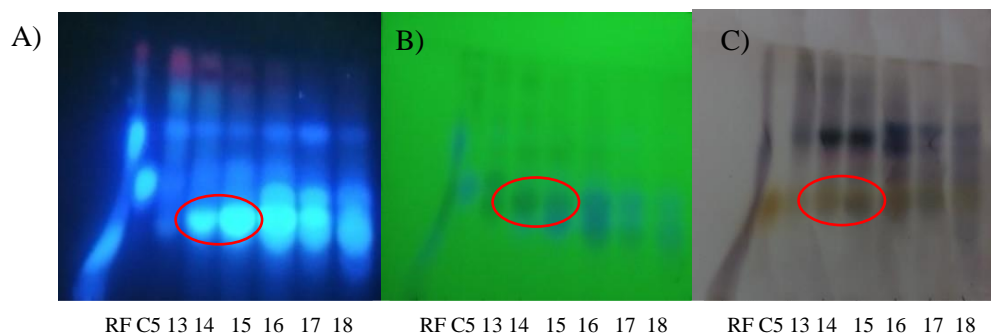


Figura 9 Fotografía de las fracciones 14-15 pertenecientes a TICbC6-F6, muestreadas en una placa de CCF de fase normal. Sistema: *n*-hexano/AcOEt (50:50). A) $\lambda = 400$ nm; B) $\lambda = 520-570$ nm; C) Revelado con 4-Hidroxibenzaldehído

Columna 7. El proceso permitió la obtención de 52 fracciones de 10 ml cada una, que con el análisis por CCF se conjuntaron 15 reuniones, así de la fracción TICbC7-F7 se separó C7 como mayoritario (Figura 10).

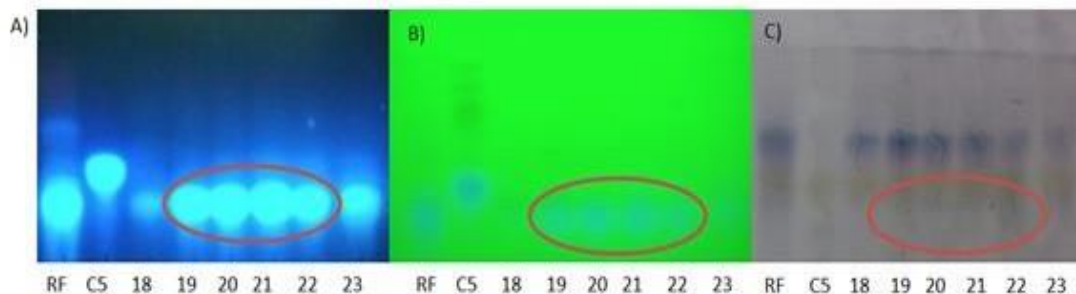


Figura 10. Fotografía de las fracciones 19-22 pertenecientes a TICbC7-F7, muestreadas en una placa de CCF de fase normal. Sistema: *n*-hexano/AcOEt (50:50). A) $\lambda = 400$ nm; B) Longitud de onda 520-570 nm; C) Revelado con 4-Hidroxibenzaldehído

Columna 8. De esta columna se obtuvo la fracción TICbC8-F4, de la que se separó también al compuesto C0.

Columna 9. Así, de ésta se realizaron 39 colectas que fueron posteriormente concentradas y almacenadas en viales. Cada muestra se analizó mediante CCF, para hacer 12 reuniones de acuerdo a la similitud química, de esta manera las fracciones TICbC9-F4, TICbC9-F6, TICbC9-F7, TICbC9-F9 presentaron al compuesto C0, no obstante, aunque

algunas fracciones mostraron tener similitud química, eran diferentes físicamente, un tipo de grasa aceitosa para la fracción TICbC9-F9 a la que se le nombró CF9 (antes de su elucidación estructural) (Figura 11) y una grasa sólida para la fracción TICbC9-F11 que se nombró CF11 (antes de su elucidación estructural) (Figura 12).

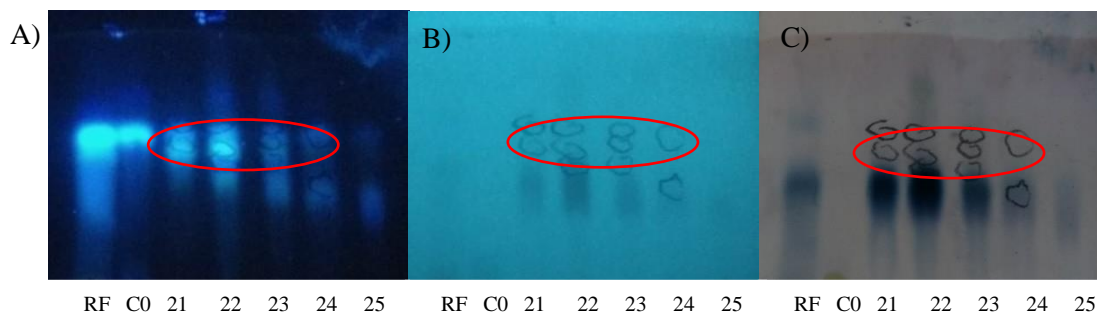


Figura 11. Fotografía de las fracciones 21-24 pertenecientes a TICbC9-F9, muestreadas en una placa de CCF de fase normal. Sistema: acetonitrilo/agua (90:10). A) $\lambda = 400$ nm; B) $\lambda = 520-570$ nm; C) Revelado con 4-Hidroxibenzaldehído

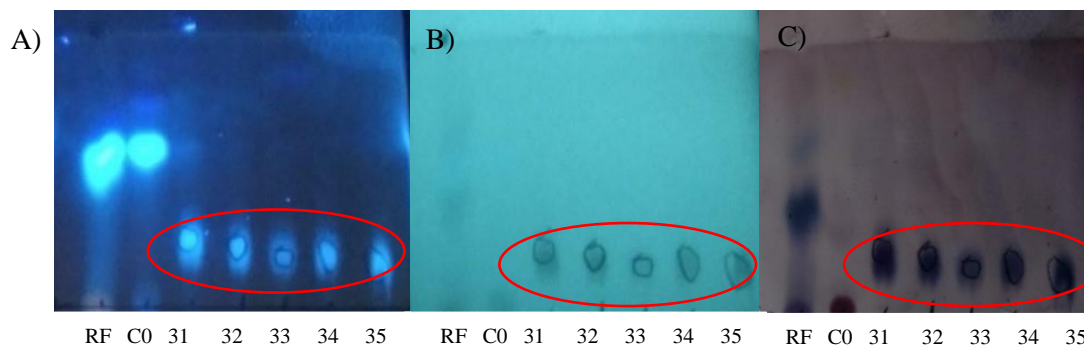


Figura 12. Fotografía de las fracciones 30-35 pertenecientes a TICbC9-F11, muestreadas en una placa de CCF de fase normal. Sistema: acetonitrilo/agua (90:10). A) $\lambda = 400$ nm; B) $\lambda = 520-570$ nm; C) Revelado con 4-Hidroxibenzaldehído

Columna 10 De esta columna se obtuvieron 103 fracciones, con 25 reuniones entre ellas, la TICbC10-F11 contenía al C3 (Figura 13).

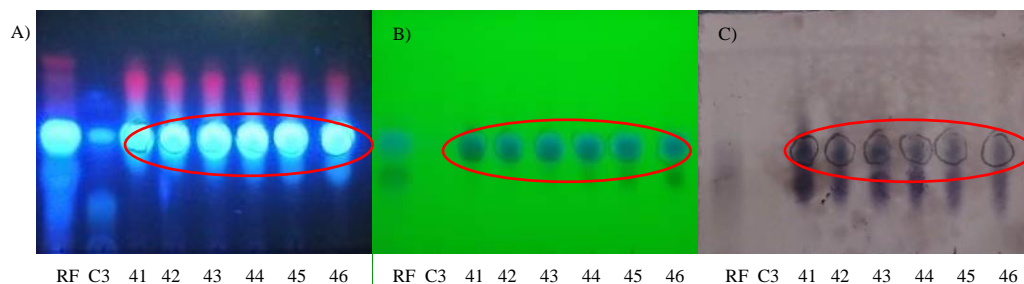


Figura 13. Fotografía de las fracciones 41-46 pertenecientes a TICbC10-F11, muestradas en una placa de CCF de fase normal. Sistema: *n*-hexano/AcOEt (50:50). A) $\lambda = 400$ nm; B) $\lambda = 520-570$ nm; C) Revelado con 4-Hidroxibenzaldehído

Columna 11 Se adsorbió la fracción TICbC10-F11, este proceso permitió la purificación de C3 (Figura 14).

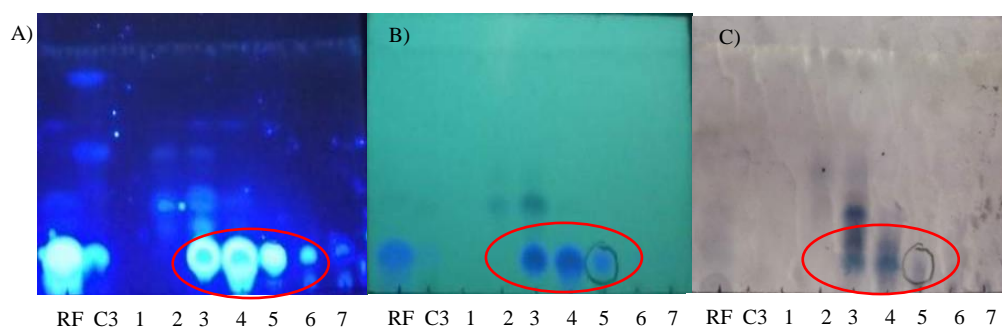


Figura 14. Fotografía de las fracciones 3-6 pertenecientes a TICbC11-F2, muestradas en una placa de CCF de fase reversa. Sistema: acetonitrilo/agua(50:50). A) $\lambda = 400$ nm; B) $\lambda = 520-570$ nm; C) Revelado con 4-Hidroxibenzaldehído

Columna 12 De esta columna se adsorbió la fracción TICbC7-F7 que contiene a C7 con la finalidad de purificarlo, se realizaron 29 fracciones que fueron concentradas y analizadas mediante CCF, obteniendo de esta forma 6 reuniones.

Cuadro 2. TIH

Columna 1- C0					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	
Hexano 100%	1-12	4	TICbC1-F2	12.9	
		5-6	TICbC1-F3	21.9	
		11-13	TICbC1-F5	1.6	
Hexano/AcOEt 95:5	13-20	14	TICbC1-F7	124.3	
		16-19	TICbC1-F8	75.1	
Hexano/AcOEt 90:10	21-25	20-21	TICbC1-F9	145.3	
Columna 2- C0					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	
Acetonitrilo/Agua 70:30	7-12	10	TICbC2-F4	1.2	
Acetonitrilo/Agua 90:10	19-24	19	TICbC2-F9	1.0	
		22	TICbC2-F12	96.9	
		23-25	TICbC2-F13	153.3	
Columna 3- C0					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	
Acetonitrilo/Agua 50:50	1-6	1-9	TICbC3-F1	2.1	
Acetonitrilo/Agua 70-30	7-12	10-12	TICbC3-F2	100	
Columna 4- C0					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	
Hexano/AcoEt 97:3	17-22	17	TICbC4-F2	2.2	
		18-22	TICbC4-F3	2.8	
Columna 5- C0, C1, C2, C5 y C6					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	Compuesto
Hexano/AcoEt 90:10	13-18	14	TICbC5-F3	15.2	C0
		15	TICbC5-F4	1.3	C0
		16-17	TICbC5-F5	21.9	C0
Hexano/AcoEt 85:15	19-24	18-21	TICbC5-F6	27.4	C0
		22	TICbC5-F7	13.3	C1
		23	TICbC5-F8	20.9	C1
Hexano/AcoEt 80:20	25-30	24-27	TICbC5-F9	64.5	C1
Hexano/AcoEt 75:25	31-36	30-31	TICbC5-F11	54.5	C2
		32-35	TICbC5-F12	241.9	C2
Hexano/AcoEt 70:30	37-42	36-39	TICbC5-F13	169.3	C2
Hexano/AcoEt 65:35	43-48	46-49	TICbC5-F16	26.8	C5
Hexano/AcoEt 55:45	55-60	56-61	TICbC5-F18	33.3	C6

Columna 6- C6					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	
Diclorometano /Acetona 90:10	11-15	14-15	TICbC6-F6	41.1	
Diclorometano /Acetona 85:15	16-20	16-18 19-21	TICbC6-F7 TICbC6-F8	32.2 22.8	
Columna 7- C7					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	
Diclorometano /Acetona 94:6	18-34	19-22	TICbC6-F7	26.7	
Diclorometano /Acetona 92:8	35-46	31-38	TICbC6-F11	6.2	
Columna 8- C0,C3					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	Compuesto
Hexano/AcoEt 80:20	11-15	13-14	TICbC8-F4	1,800	C-0
Hexano/AcoEt 50:50	25-29	27-30	TICbC8-F8	1,600	C-3
Columna 9- C0,CF9,CF11					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	Compuesto
Acetonitrilo/Agua 60:40	10-15	13-14	TICbC9-F4	45	C0
Acetonitrilo/Agua 70:30	16-21	16-19 20	TICbC9-F6 TICbC9-F7	92.7 24.2	C0 C0
Acetonitrilo/ Agua 80:20	22-27	21-24 21-24	TICbC9-F8 TICbC9-F9	99 207.6	C0 CF9
Acetonitrilo/Agua 90:10	30-35	30-35	TICbC9-F11	110	CF11
Columna 10- C3					
Sistema de elución	Fracción	Reunión	Clave	Cantidad (mg)	
Hexano/AcOEt 70:30	35-52	37-40 41-46 47-48	TICbC10-F10 TICbC10-F11 TICbC10-F12	203.9 437.9 116.2	
		49-53	TICbC10-F13	292.5	

<i>Columna 11- C3</i>				
<i>Sistema de elución</i>	<i>Fracción</i>	<i>Reunión</i>	<i>Clave</i>	<i>Cantidad (mg)</i>
Acetonitrilo/Agua 70:30	1-6	3-6	TICbC11-F2	347.7
<i>Columna 12- C7</i>				
<i>Sistema de elución</i>	<i>Fracción</i>	<i>Reunión</i>	<i>Clave</i>	<i>Cantidad (mg)</i>
Agua /Acetonitrilo 80:20	1-7	3-7	TICbC12-F2	3.5

Cuadro 3. Rendimiento y cantidad total de TIH en las 12 columnas

Compuesto	Cantidad obtenida	Rendimiento (%)
0	2.8673 gr	347.26
1	98.7 mg	7.143
2	465.7 mg	33.72
3	2.9982 gr	177.04
5	26.8 mg	1.942
6	129.4 mg	29.6
7	36.4 mg	57.97
F9	209.6 mg	11.53
F11	110 mg	6.11

Nombres de los compuestos: mezcla de amirinas (0), 7-isoprenyloxycumarina (1), herniarina (2), 6-methoxy-7-isopreniloxicumarina (3), 6,7,8-trimethoxicumarina (5), virgatenol (6), espatulenol (F9), F11.

7.2 Resultados de análisis gases-masas (G-M) de las fracciones de *T. lucida*

Cuadro 4. Análisis de C0 de la fracción TICbC5-F4 a través de G-M			
Tiempo de retención	Peso molecular	Compuesto	% en la muestra
36.248	426	β -Amirina	9.243
37.674	426	α -amirina	85.429

Cuadro 5. Análisis de CF9 de la fracción TICbC9-F9 a través de G-M			
Tiempo de retención	Peso molecular	Compuesto	% en la muestra
15.091	220	Espatulenol	31.951
15.445	220	Triciclo [5.2.2.0 (1,6)] undecan-3-ol, 2-metileno-6,8,8 trimetil-	5.500
15.754	220	Tetraciclo [6.3.2.0 (2,5) .0 (1,8)] tridecan-9-ol, 4,4-dimetil-	5.366
15.951	220	Cicloisolongifoleno, 8-hidroxi-, endo-	14.227
16.148	220	Óxido de cariofileno	7.272
16.332	220	7R, 8R-8-Hidroxi-4-isopropilideno-7-metilbiciclo undeceno	17.925

El análisis por G-M, indica que la fracción TICbC5-F4 contiene 7 compuestos, de los cuales la α -amirina predomina con un 85.429% y β -amirina con 9.243%, son los mayoritarios.

Estos dos productos naturales poseen capacidad antiinflamatoria, actúan como antinociceptivos, hepatoprotectores y gastroprotectores. Es importante señalar que en el presente trabajo se está reportando por vez primera la presencia de ambas sustancias en *T. lucida* Cav.

Entre los compuestos aislados, α -amirina y β -amirina se han detectado un efecto antiartrítico de estas sustancias, en diferentes ensayos se observó que la α -amirina y su palmitato inhiben el crecimiento de células de osteosarcoma en rata, con una reducción de la proliferación sinovial e invasión de las articulaciones, menor infiltración de leucocitos además también disminuye la capacidad enzimática de colagenasa tipo I (Kweifio-Okai *et al.* 1994).

Recientemente, se mostró que β -amirina en diferentes dosis administradas a ratas con artritis experimental, disminuye los cambios asociados al daño articular, como el peso corporal, el edema y eritema de la pata. El análisis histológico indica disminución significativa de erosión del cartílago, quiste subcondral (Hennet *et al.*, 2020). Estos datos indican que la capacidad antiinflamatoria y antiartrítica de *T. lucida* se debe al contenido de estos terpenos

Con la técnica de G-M, se determinó que la fracción TICbC9-F9 contiene 14 compuestos de los cuales los mayoritarios son: espatulenol (31.951%), un sesquiterpeno, el cual también se está reportando por vez primera en la especie *T. lucida*. Datos en la literatura, indican que especies del mismo género, también lo contienen como *T. mandonii* Sch (Senatore y De Feo, 1999) y *T. terniflora* HBK (De Feo et al., 2005).

La muestra, además contiene a los compuestos 7R,8R-8-Hidroxi-4-isoprenilideno - 7-metilbicyclo undeceno (17.925%); Cycloisolongifolene,8-hydroxy-, endo- (14.227%), el cual ya ha sido reportado con anterioridad para *T. lucida* (Zarate-Escobedo *et al.*, 2018); Caryophyllene oxide (7.272 %); Tricyclo[5.2.2.0(1,6)]undecan-3-ol,2-methylene-6,8,8,trimethyl (5.500%) y Tetracyclo [6.3.2.0(2,5).0(1,8)]tridecan-9-ol, 4,4-dimethyl- (5.366%).

El compuesto que inicialmente fue nombrado C6, fue elucidado químicamente con el apoyo del Dr. Manases González Cortazar del CIBIS-IMSS y con ayuda de análisis espectrométricos de primera y segunda dimensión se logró elucidar la estructura, que corresponde a una cumarina con nombre (R)-7-((2- hidroxi-3-metilbutenoxil-3oxi)-6-metroxi-2h-cromen-2-ona o también llamado Virgatenol (Figura 15) (Debenedetti *et al.*, 1998).

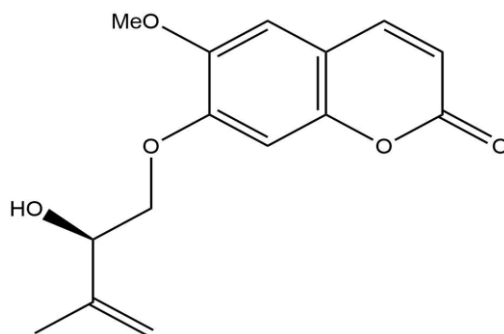


Figura 15. Estructura química de Virgatenol

7.3 Actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de *T. lucida*

La administración local de TPA, induce un edema, medido en mg de 8.7 efecto que fue contrarrestado por el fármaco control, Indo, en un 43 %. De los compuestos aislados de TIH, se observa en el cuadro 6 que la mezcla de amirinas, bloqueo la inflamación en un 90%, seguido de virgatenol, espatulenol, CF11 y finalmente C7. Los grupos que recibieron la mezcla de amirinas o 7-isoprenyloxicumarina, tienen diferencia estadística con el VEH. Cabe señalar que de 7-isoprenyloxicumarina, ya había sido demostrada su actividad antiinflamatoria en este ensayo (Monterrosas-Brisson, 2019).

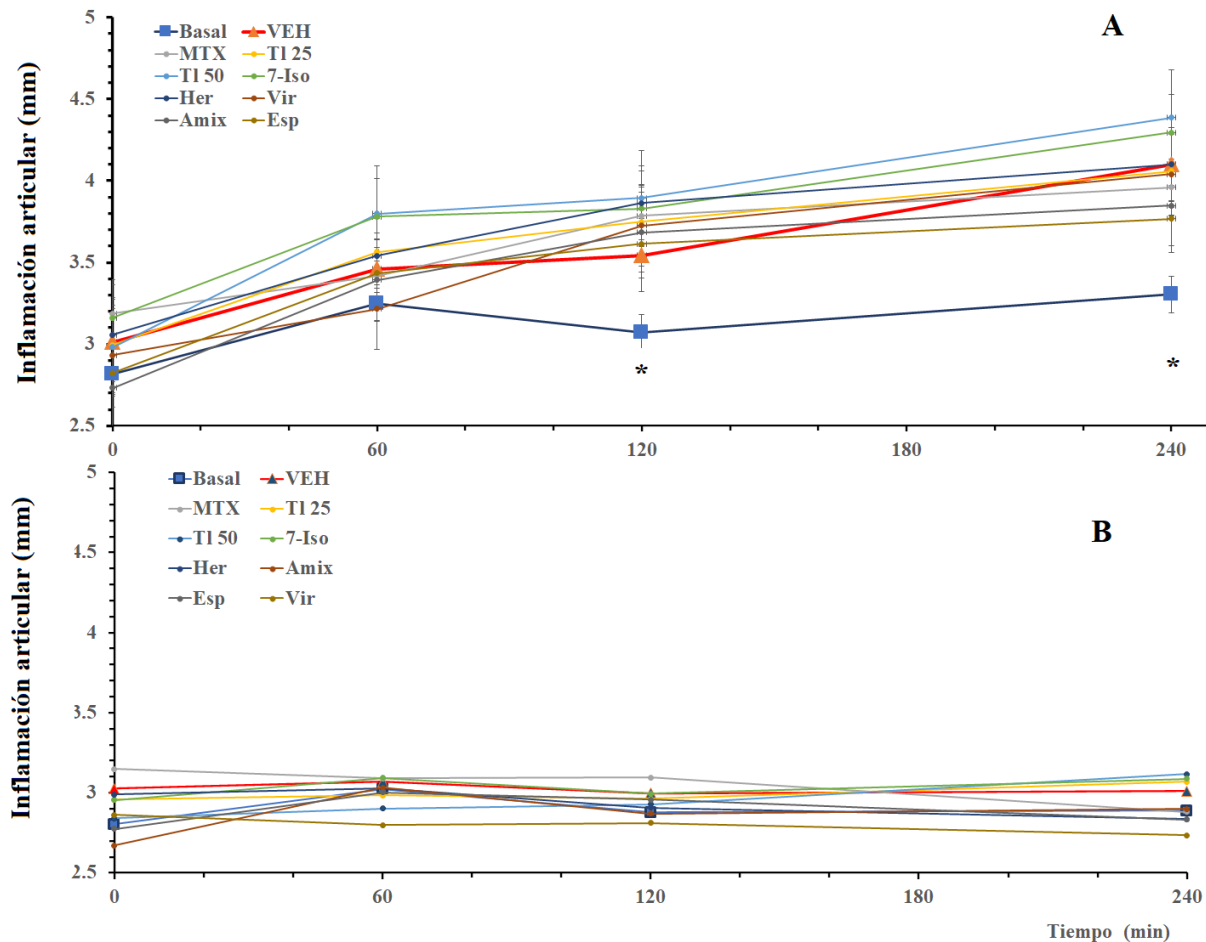
Cuadro 6. Efecto antiinflamatorio de los compuestos aislados del extracto TIH a dosis de 1.0 mg/oreja e indometacina (Indo) en el modelo de edema auricular inducido con TPA.

Tratamiento	Edema (mg) Media ± DE	Inhibición del edema (%)
Grupo control		
TPA	8.67 ± 2.23	-----
Indo	4.94 ± 4.55	43
Compuestos		
7-iso	2.6 ± 2.0*	70
Vir	4.28 ± 2.56	50
Amix	0.84 ± 0.48*	90
Esp	5.72 ± 2.71	34
CF11	6.64 ± 3.67	23
C7	7.86 ± 1.6	9

ANOVA, posprueba Dunnet (n=5 ±DE, * $p < 0.05$ cuando se compara con VEH. Amix=mezcla de amirinas, Esp=espatulenol, 7-iso=7-isoprenyloxicumarina, Vir = virgatenol.

7.4 Actividad de *T. lucida* sobre artritis-inducida con C/C

Todos los grupos que recibieron vía intraarticular C/C, en la pata izquierda (Gráfica 1A) presentan un incremento en el nivel de inflamación, que es gradual conforme avanzan los minutos, y cuyos datos no fueron estadísticamente diferentes al grupo VEH (* $p > 0.05$).



Gráfica 1. Curva temporal de las primeras 4 hrs (240 min), después de la administración del estímulo intraarticular con C/C o SSF (basal) en la pata izquierda (A), en comparación la pata derecha (B) que no recibió nada. VEH=vehículo, MTX=metotrexato, T1=extracto hexánico de *T. lucida* (25 y 50 mg/kg), 7-Iso=7-isoprenyloxycumarina, Her=herniarina, Amix=mezcla de amirinas, Esp=espatulenol, Vir=virgatenol. ANOVA, postprueba Dunnet (n=7, promedio \pm DE, * $p < 0.05$ en comparación con el VEH)

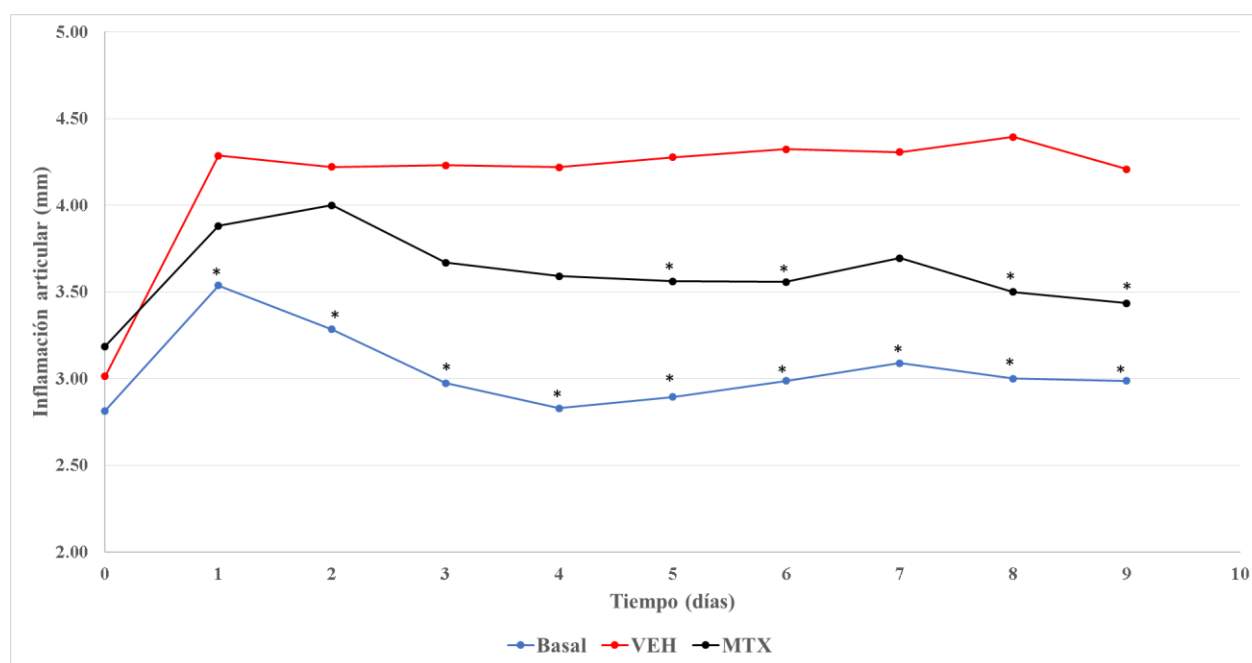
Debido a que ninguno de los grupos recibió tratamiento alguno hasta pasadas las 24 hrs (gráfica 2). Mientras que el grupo basal, que sólo recibió por la misma vía SSF tiene un comportamiento similar, pero con una pendiente menor, mostrando diferencia significativa con todos los otros grupos (* $p < 0.05$).

Por otro lado, en la gráfica 1B se muestra que la pata derecha, que no recibió el estímulo con C/C o SSF, de todos los grupos, no presentan cambios en el tamaño de la articulación, durante los primeros 240 minutos después de iniciado el ensayo.

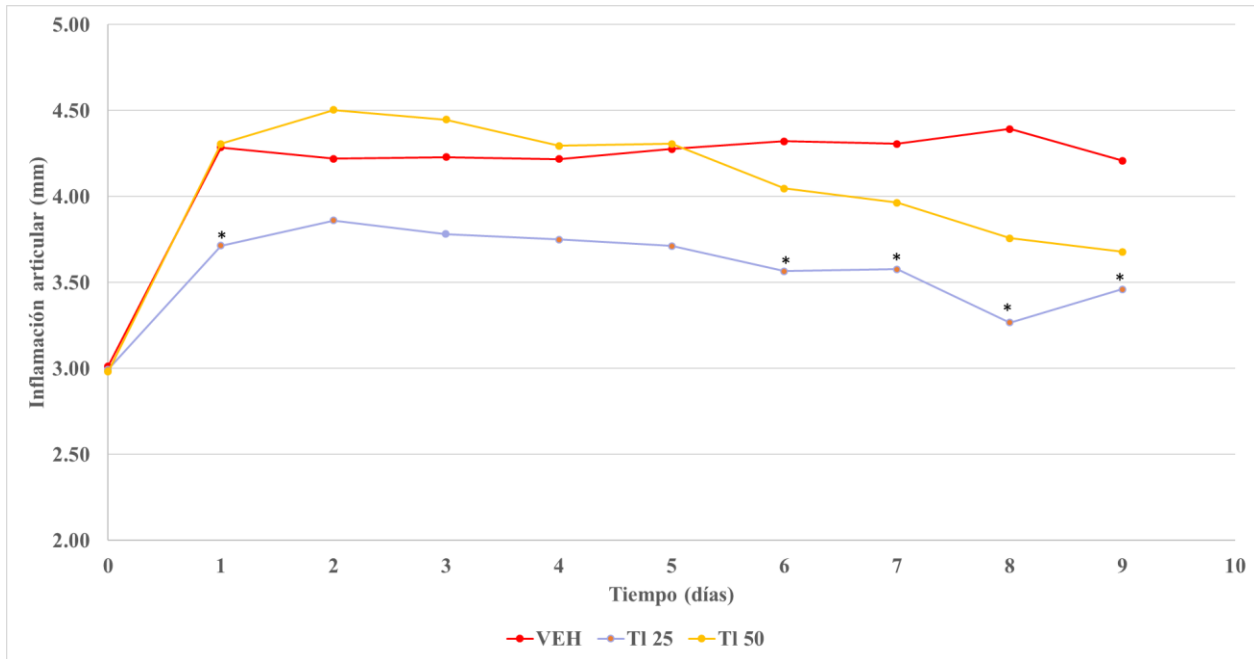
Veinticuatro horas después de la aplicación de C/C, se midió la articulación y se inició el tratamiento, los resultados de una segunda curva temporal de dicho momento y hasta el final del experimento se muestran en las siguientes gráficas (2 a 5).

En la gráfica 2 se puede observar que, en el grupo basal, el nivel de inflamación continúa disminuyendo durante toda la experimentación. Mientras que, en el grupo con VEH, sucede lo contrario, ambos fueron estadísticamente diferentes en cada punto de la curva. El fármaco de referencia, MTX, durante los primeros 3 días muestra un comportamiento similar al VEH, no obstante, a lo largo de los siguientes días logra disminuir el proceso respecto al VEH.

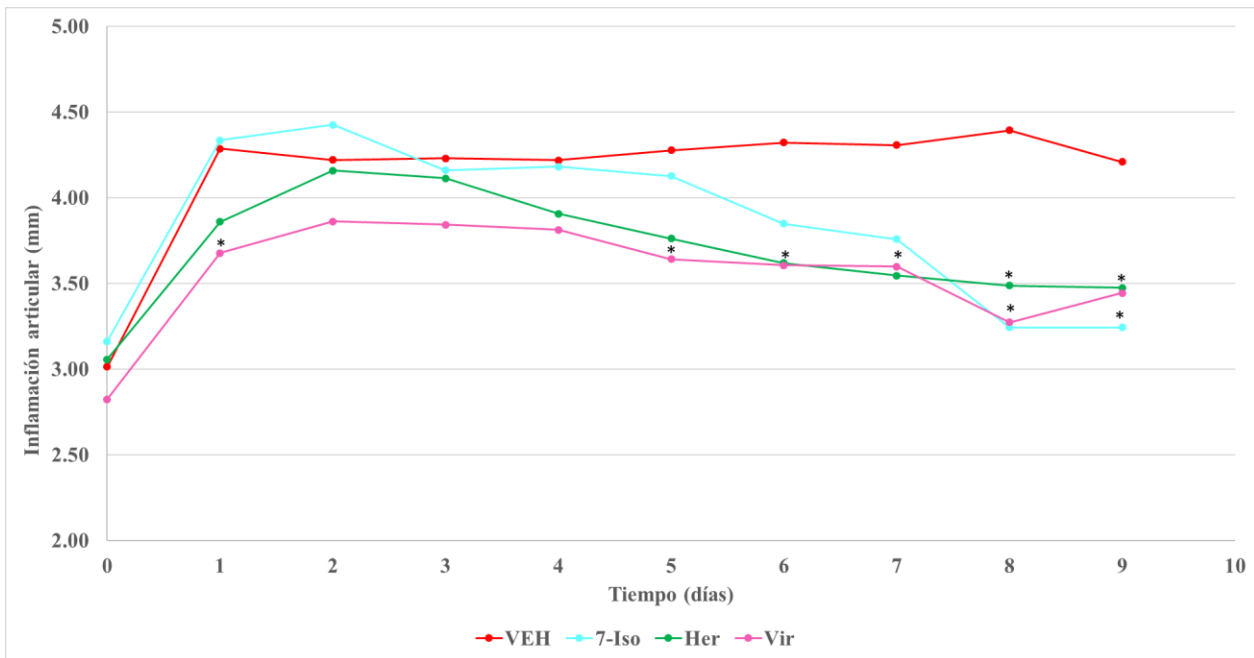
Un comportamiento similar al del MTX, fue observado con la dosis de 25 mg/kg del extracto TIH, con diferencia estadística al grupo VEH desde el día 1 (* $p < 0.05$). No sucedió así con 50 mg/kg cuya actividad antiinflamatoria fue menor y se presentó tardíamente, siendo diferente al grupo daño sólo desde día 7 y hasta el final del experimento (Gráfica 3, * $p < 0.05$).



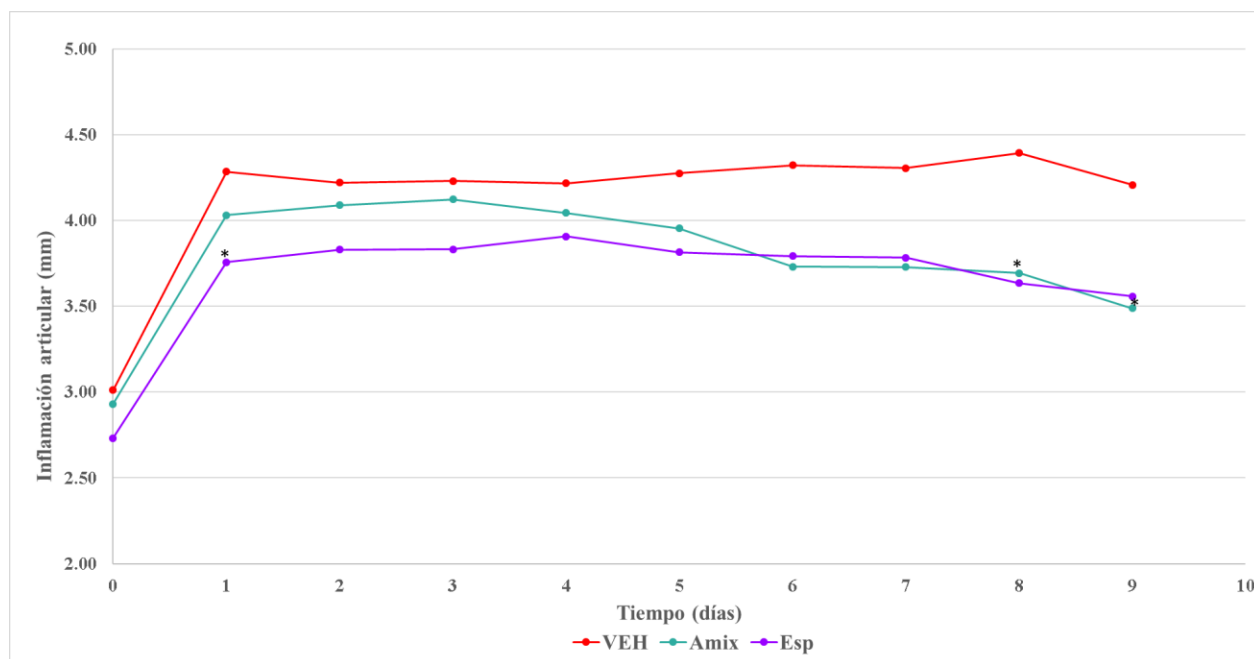
Gráfica 2. Curso temporal de inflamación articular inducida con C/C, de los grupos control. Basal= sin C/C; VEH= Vehículo; MTX=metotrexato 1mg/kg. ANOVA, postprueba Dunnet (n=7, promedio \pm DE, * $p < 0.05$ en comparación con el VEH)



Gráfica 3. Curso temporal de la inflamación articular inducida con C/C en ratones que recibieron el extracto hexánico de *T. lucida* (Tl), en comparación con el grupo de daño (VEH). ANOVA, postprueba Dunnet (n=7, promedio \pm DE, * $p < 0.05$ en comparación con el VEH)



Gráfica 4. Curso temporal de la inflamación articular inducida con C/C en ratones que recibieron 7-isoprenyloxycumarina, herniarina y virgatenol, en comparación con el grupo de daño (VEH). ANOVA, postprueba Dunnet /n=7, promedio \pm DE, * $p < 0.05$ en comparación con el VEH)



Gráfica 5. Curso temporal de la inflamación articular inducida con C/C en ratones que recibieron la mezcla de amirinas y espatulenol en comparación con el grupo de daño (VEH). ANOVA, postprueba Dunnet (n=7, promedio \pm DE, * $p < 0.05$ en comparación con el VEH)

El efecto de las cumarinas 7-isoprenyloxicumarina, herniarina y virgatenol, sobre la inflamación articular, se muestran en la gráfica 4. Los tres compuestos ejercen una actividad antiinflamatoria similar, que es diferente estadísticamente con el grupo VEH, hasta el día 9 (* $p < 0.05$). También, el grupo de terpenos aislados de *T. lucida*, Amix (la mezcla de amirinas) y el espatulenol, un terpeno del grupo de los aceites esenciales de la planta (Gráfica 5), induce un efecto antiinflamatorio gradual que es diferente al VEH, también hasta el día 9 (* $p < 0.05$).

La administración de C/C provocó la inflamación local de la articulación, que fue aumentando durante los primeros días y se mantuvo a lo largo del tiempo (Figura 16). Todos los tratamientos lograron disminuir la inflamación, a excepción del extracto a 50 mg/kg, todos los demás presentaron diferencias estadísticamente significativas (* $p < 0.05$), principalmente desde el día 6 y hasta el 9.

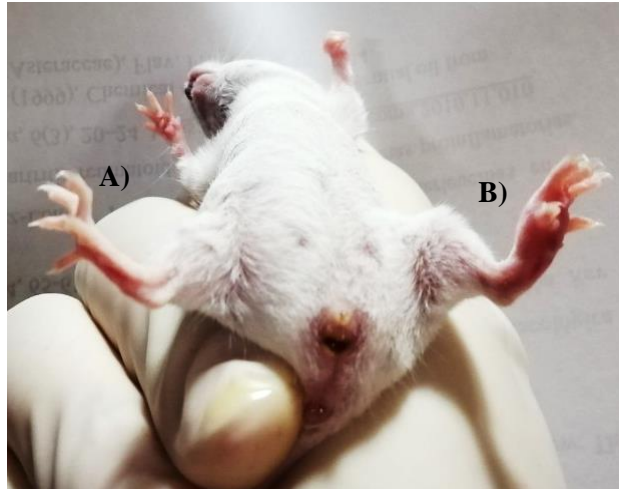


Figura 16. Fotografía en la que se observa la inflamación articular entre la pata que no recibió el estímulo dañino (A) y a la que se le administró C/C (B).

En la figura 17, se muestra una fotografía representativa de la zona de daño, en la que se puede observar signos notables de inflamación tanto de los tejidos que rodean los huesos de la pata, así como en la zona tarsiana y metatarsiana.



Figura 17. Fotografía en la que se observa la inflamación que rodean los tejidos de la pata que recibió C/C, así como en la zona tarsiana y metatarsiana

7.5 Índice de peso de bazo y pulmón

Una vez terminado el tratamiento se llevó a cabo el sacrificio para extraer la articulación de la pata con el daño, así como órganos como el bazo y el pulmón. La artritis reumatoide no solo produce afectaciones a nivel articular sino también sistémicas. El bazo es un órgano formado por sangre y células, esencialmente linfocitos. Forma parte del sistema linfático y del inmune contribuyendo a la elaboración de anticuerpos por el organismo (Mebius y Kraal, 2005).

El índice de bazo aumenta cuando se administra C/C a comparación de los ratones basales, se observan diferencias significativas (* $p < 0.05$) para el grupo basal y el extracto hexánico a 50 mg/kg, cuyo índice es el más elevado.

En cuanto al índice del pulmón, todos los grupos mantienen un índice promedio sin observarse diferencias significativas. El índice de bazo y pulmón se muestran en el cuadro 7.

Cuadro 7. Peso de órganos, bazo y pulmón, medido como porcentaje respecto al peso total del animal.

Grupo/Tratamiento (mg/kg)	Bazo (Índice, %)	Pulmón (Índice, %)
Basal	0.498±0.10*	0.775±0.05
VEH	0.649±0.05	0.808±0.05
MTX (1.0)	0.540±0.03	0.711±0.06
TIH (25)	0.691±0.00	0.702±0.07
TIH (50)	0.848±0.13*	0.711±0.12
7- Iso (2.0)	0.687±0.08	0.704±0.06
Her (2.0)	0.646±0.04	0.801±0.12
Vir (2.0)	0.666±0.02	0.773±0.12
Amix (2.0)	0.545±0.03	0.675±0.05
Esp (2.0)	0.626±0.05	0.856±0.07

n=7, promedio ±DE, ANOVA post prueba de Dunnet con * $p < 0.05$ en comparación con el VEH. VEH=vehículo MTX=metotrexato; TI=extracto hexánico de *T. lucida* (25 y 50 mg/kg), 7-Iso=7-isoprenyloxicumarina, Her=herniarina, Amix=mezcla de amirinas, Esp=espatulenol, Vir=virgatenol

7.6 Actividad de *T. lucida* sobre la hiperalgesia

Los ratones con mono artritis experimental, fueron expuestos a una prueba de hiperalgesia a través del estímulo de la placa caliente. El TIH en ambas dosis y los compuestos aislados, con excepción de Virgatenol, incrementan el tiempo de latencia cuando se comparan con el VEH. Mientras que el MTX, no tiene efecto antinociceptivo.

El TIH a dosis de 50 mg/kg y Herniarina, son los tratamientos que tienen diferencias significativas al compararlos con el VEH ($*p < 0.05$), lo que muestra su acción analgésica en este modelo experimental. (Cuadro 8).

Cuadro 8. Efecto de tratamientos de *T. lucida* sobre ratones en el ensayo de plato caliente.

Grupo	Media ± DE
Control	3.42 ± 0.78
VEH	2.42 ± 1.13
MTX	2.14 ± 0.37
TI25	4.14 ± 1.46
TI50	5.15 ± 1.72*
7-Isoprenyloxycumarina	4 ± 1.41
Herniarina	7 ± 3.31*
Virgatenol	2.42 ± 0.78
Amirina	3.85 ± 1.95
Espatulenol	2.71 ± 0.48

Tiempo de latencia (seg), n=7, promedio ±DE. ANOVA, post prueba Dunnet con $*p < 0.05$ comparado con VEH

7.7 Concentración de citocinas pro- y anti-inflamatorias en diferentes órganos

A continuación, se describirán los resultados de la cuantificación de citocinas en articulación, bazo y pulmón.

A) **IL-17**. En el cuadro 9, se puede observar los resultados obtenidos para esta citocina. La concentración en la articulación, el bazo y el pulmón en el grupo de animales que recibieron carragenina intra-articular (VEH) es mayor que la del grupo sin daño (sanos, BASAL), presentándose diferencia significativa entre ambos en los órganos del bazo y pulmón. (* $p < 0.05$).

En los animales que recibieron el fármaco modificador de la enfermedad, MTX, se observó una disminución significativa respecto al grupo VEH (* $p < 0.05$) en el pulmón. En el caso de la articulación izquierda, hubo una disminución de ésta sin presentarse diferencias significativas, mientras que en el bazo, la concentración de IL-17 fue mayor que el VEH teniendo diferencias significativas (* $p < 0.05$).

En el mismo cuadro (9), se muestra que el extracto TIH a las dosis administradas (25 y 50 mg/kg), disminuye significativamente la concentración de IL-17 respecto al grupo VEH en el pulmón; mientras que en la articulación izquierda la concentración es menor respecto al grupo VEH, sin embargo, no se presentaron diferencias significativas. Los altos niveles pulmonares de esta citocina fueron contrarrestados con la 7-isoprenyloxycumarina, la herniarina y la mezcla de amirinas (* $p < 0.05$). En la articulación, sólo la mezcla de amirinas mejoró dicha condición respecto al VEH no obstante no se encontraron diferencias significativas y el espatulenol, lejos de aminorar incrementó significativamente la citocina inflamatoria (* $p < 0.05$). Para el bazo, de los compuestos aislados sólo los terpenos (amirinas y espatulenol), disminuyeron la concentración, pero no presentaron cambios significativos.

Cuadro 9. Efecto de diferentes tratamientos de *T. lucida* sobre la concentración local de IL-17

IL-17 [pg/g de proteína)	Articulación izquierda	Bazo	Pulmón
Tratamiento (mg/kg)			
Basal	22406.2 ± 7165.2	28888.1 ± 27595.8*	8294.9 ± 2106.9 *
VEH	110781.0 ± 62755.5	435852.4 ± 79846.6 &	65991.8 ± 17982.2 &
MTX	23439.6 ± 14446.2	97139.4 ± 88233.0 *	5660.7 ± 2429.3 *
TIH25	22753.9 ± 20380.5	518997.5 ± 100137.5	23391.4 ± 8809.8 *

TIH50	24447.7 ± 17045.3	291304.7 ± 22031.8	24628.2 ± 10137.1 *
7-iso	54582.9 ± 34539.5	475098.3 ± 102666.9	19423.7 ± 11758.0 *
Her	113436.0 ± 86949.8	360442.3 ± 50726.8	20668.1 ± 10406.8 *
Vir	65513.0 ± 40339.0	363527.1 ± 201769.9	40930.1 ± 20814.2
Amix	18520.2 ± 9498.1	251819.3 ± 108006.3	14350.7 ± 6019.4 *
Esp	373940.1 ± 72948.2*	221033.0 ± 73438.8	57925.1 ± 16416.6

ANOVA post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo VEH y $^{\&} p < 0.05$ cuando se compara con el Basal; los datos representan el $\bar{x} \pm DE$ con $n=7$. VEH=Vehículo, MTX=metotrexato, TIH=extracto hexánico de *T. lucida*, 7-iso=7-isoprenyloxycumarina, Her=herniarina, Vir= virgatenol, Amix= mezcla de amirinas, Esp= espatulenol.

B) TNF- α . En el cuadro 10 se indican los valores obtenidos de esta citocina proinflamatoria. La concentración de TNF- α , en la articulación y el bazo fue mayor en el grupo VEH, mientras que para el caso del pulmón los niveles fueron menores, en comparación con el Basal, no obstante, no se presentaron diferencias significativas para ninguno de los 3 órganos. El MTX disminuyó esta molécula inflamatoria sólo en la articulación, mientras que en los otros dos órganos los niveles fueron mayores que el VEH (* $p < 0.05$). En el cuadro, se muestra que TIH a las dos dosis evaluadas, disminuyeron la concentración articular de esta citocina, no obstante, no se presentaron diferencias estadísticamente significativas. En el bazo sólo la dosis de 50 mg/kg fue diferente; en la columna del pulmón se observa que la dosis de 50 mg/kg incrementó dicha variable respecto al grupo de daño (* $p < 0.05$). Los compuestos de *T. lucida* provocaron un incremento de TNF- α en pulmón y articulación; Por otro lado, en el bazo, el virgatenol y espatulenol disminuyeron estadísticamente los niveles (* $p < 0.05$).

Cuadro 10. Efecto de diferentes tratamientos de *T. lucida* sobre la concentración local de TNF- α .

TNF- α [pg/g de proteína)	Articulación izquierda	Bazo	Pulmón
Tratamiento (mg/kg)			
Basal	107930.88 ± 17767.14	600513.45 ± 118615.31	275464.5 ± 66745.1
VEH	183989.5 ± 33020.6	934490.90 ± 8420.87	154540.2 ± 31722.8
MTX	125414.1 ± 31819.3	1566627.0 ± 297102.9*	477332.9 ± 70992.0*
TIH25	110250.98 ± 13443.79	1076680.14 ± 206296.98	390261.0 ± 83361.0
TIH50	71611.51 ± 26431.49	557437.08 ± 185011.24*	474540.0 ± 101448.0*
7-iso	352456.52 ± 148533.38	859718.75 ± 24813.34	423709.3 ± 106538.9*
Her	649935.6 ± 200074.8*	1153351.42 ± 213368.20	450062.7 ± 110985.6*
Vir	847402.0 ± 83548.7*	454777.5 ± 139581.67*	346224.7 ± 102328.8

Amix	656404.49 ± 200636.46 *	655871.61 ± 239782.02	265759.6 ± 75989.8
Esp	553245.2 ± 192987.7*	382319.7 ± 220425.1*	359525.6 ± 146600.1

ANOVA post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo VEH y $\& p < 0.05$ cuando se compara con el Basal; los datos representan el $\bar{x} \pm DE$ con $n=7$. VEH=Vehículo, MTX=metotrexato, TIH=extracto hexánico de *T. lucida*, 7-iso=7-isoprenyloxycumarina, Her=herniarina, Vir= virgatenol, Amix= mezcla de amirinas, Esp= espatulenol.

C) **IL-1 β** . En el cuadro 11, se indican los datos de la concentración de esta citocina proinflamatoria en diferentes órganos.

Se puede observar una diferencia estadísticamente significativa, entre los grupos Basal y VEH, ya que la administración intraarticular de C/C induce un incremento de esta molécula en los tres órganos analizados (* $\& p < 0.05$). La administración de MTX fue capaz de reducir los niveles de dicha citocina en la articulación y el bazo (* $p < 0.05$), sin embargo, en el pulmón provocó un efecto contrario, al incrementarse la concentración. Un comportamiento similar a MTX se observa en la articulación, en los grupos que recibieron las dos dosis de TIH, pero también se puede apreciar que para el bazo sólo la dosis alta (50 mg/kg) induce dicha actividad (* $p < 0.05$); mientras que para el pulmón no hay cambios estadísticamente importantes.

La elevada concentración de IL-1 β en pulmón, fue significativamente contrarrestada por la administración oral de la mayoría de los compuestos aislados de *T. lucida* (* $p < 0.05$), a excepción del efecto de 7-isoprenyloxycumarina (* $p > 0.05$). Para la articulación, la 7-isoprenyloxycumarina, la herniarina, el virgatenol y la mezcla amirinas disminuyen los niveles de esta proteína inflamatoria cuando se comparan con el VEH (* $p < 0.05$); con el espatulenol solo se observa una tendencia para bajar dicha variable sin lograr ser estadísticamente significativo. Finalmente, en el bazo todos los compuestos fueron capaces de reducir esta citocina (* $p < 0.05$).

Cuadro 11. Efecto de diferentes tratamientos de *T. lucida* sobre la concentración local de IL-1 β .

IL-1β [pg/g de proteína)	Articulación izquierda	Bazo	Pulmón
Tratamiento (mg/kg)			
Basal	25039.52 ± 8043.7*	4049.61 ± 1945.4*	32949.96 ± 3542.85*
VEH	57579.66 ± 10965.1 ^{&}	25565.00 ± 3348.7 ^{&}	73585.00 ± 11217.49 ^{&}
Mtx	29777.11 ± 9081.2*	12003.63 ± 730.1 *	109698.23 ± 10772.087*
TIH25	25275.15 ± 9346.5 *	21027.92 ± 5407.6	93127.34 ± 19100.074
TIH50	33466.8 ± 4282.1*	13613.47 ± 4315.6*	87217.34 ± 16717.03

7-iso	38770.1 ± 3234.4*	15804.34 ± 3223.0*	111120.56 ± 16593.740*
Her	19442.9 ± 10761.4 *	4703.77 ± 2359.4*	51356.84 ± 10974.40
Vir	15038.2 ± 4293.7 *	1390.74 ± 1015.1*	21822.19 ± 7118.29*
Amix	21121.7 ± 4009.0 *	257.33 ± 133.9*	38308.05 ± 12846.3*
Esp	43331.8 ± 11044.7	1153.52 ± 1022.8*	52031.63 ± 9166.31

ANOVA post-prueba Bonferroni, * $p < 0.05$ cuando se compara con el grupo VEH y & $p < 0.05$ cuando se compara con el Basal; los datos representan el $\bar{x} \pm DE$ con $n=7$. VEH=Vehículo, MTX=metotrexato, TIH=extracto hexánico de *T. lucida*, 7-iso=7-isoprenyloxicumarina, Her=herniarina, Vir= virgatenol, Amix= mezcla de amirinas, Esp= espatulenol.

D) IL-10. En el cuadro 12, se señala la concentración de IL-10 en cada órgano analizado.

La concentración de citocina IL-10, disminuyó en el grupo de animales con daño articular y sin tratamiento (VEH), respecto al grupo Basal, de tal manera que ambos grupos entre sí, fueron estadísticamente diferentes, en la articulación, el bazo y el pulmón (* $\&p < 0.05$).

El fármaco MTX, fue capaz de incrementar la concentración de la molécula antiinflamatoria después de la exposición a daño articular inducido con C/C, para los tres órganos en comparación con el VEH, no obstante, sólo en la articulación hubo diferencias estadísticas (* $p < 0.05$).

De forma similar, el extracto TIH de *T. lucida* incrementa, respecto al VEH (* $p < 0.05$), dicha citocina en cada una de las muestras analizadas cabe señalar que su actividad disminuye a la dosis mayor. Las tres cumarinas aisladas (7-isoprenyloxicumarina, herniarina y virgatenol) incrementan esta variable de manera significativa cuando se comparan con VEH, en el pulmón (* $p < 0.05$), lo que no sucede en la articulación, mientras que, en el bazo, la 7-isoprenyloxicumarina aumentó los niveles de esta citocina (* $p < 0.05$). Los terpenos de la mezcla de amirinas no mostraron diferencias significativas en los tres órganos analizados, mientras que el espatulenol aumenta el nivel de esta citocina antiinflamatoria en articulación y pulmón (* $p < 0.05$).

Cuadro 12. Efecto de diferentes tratamientos de *T. lucida* sobre la concentración local de IL-10

IL-10 [pg/g de proteína)	Articulación izquierda	Bazo	Pulmón
Tratamiento (mg/kg)			
Basal	713211.08 ± 145047.50	394266.2 ± 40996.7	12241.63 ± 2113.63
VEH	312293.86 ± 68953.19	205980.8 ± 85112.5	6077.79 ± 729.27
Mtx	887151.04 ± 104770.96*	408551.7 ± 81784.5	17179.5 ± 2990.8

TIH25	1421643.50 ± 302816.56*	579088.1 ± 160534.4*	34984.67 ± 4071.72*
TIH50	750140.11 ± 149641.43	451855.9 ± 119768.90	21348.61 ± 8029.99
7-iso	674906.10 ± 264222.04	670129.31 ± 302287.5*	26900.10 ± 2782.53*
Her	670412.17 ± 243834.89	491173.0 ± 125336.15	34325.12 ± 10341.76*
Vir	676869.91 ± 177454.01	179971.3 ± 68509.7	30859.2 ± 5628.1 *
Amix	672545.40 ± 244090.75	287534.86 ± 129411.7	8453.18 ± 2368.42
Esp	1157570.60 ± 156697.94*	302622.7 ± 99719.5	30221.4 ± 7271.8*

ANOVA post-prueba Bonferroni, *p< 0.05 cuando se compara con el grupo VEH y & p< 0.05 cuando se compara con el Basal; los datos representan el $\bar{x} \pm DE$ con n=7. VEH=Vehículo, MTX=metotrexato, TIH=extracto hexánico de *T. lucida*, 7-iso=7-isoprenyloxycumarina, Her= herniarina, Vir= virgatenol, Amix= mezcla de amirinas, Esp= espatulenol.

8. Discusión

Como ya se ha mencionado la AR es una enfermedad crónica asociada a daño articular, principalmente, aunque otros órganos también se ven afectados por lo que se pueden observar manifestaciones multiorgánicas. La fisiopatología involucra el desequilibrio de moléculas como las citocinas, provocando infiltración de células inmunes en el sinovio, perpetuando el proceso inflamatorio y destrucción progresiva de los tejidos. En el presente trabajo se midió la concentración de estos mediadores celulares en la articulación dañada, en el bazo y el pulmón de los ratones expuestos a la acción de C/C, con la intención de observar el efecto que los diferentes tratamientos provenientes de *T. lucida* pudieran provocar sobre la inflamación de órganos involucrados en la AR.

Dentro de las manifestaciones extraarticulares en este padecimiento, se encuentra las afectaciones de las vías respiratorias como la enfermedad pulmonar intersticial, que cursa con inflamación de este órgano volviéndose rígido, limitando el suministro de oxígeno al torrente sanguíneo. Si bien en el presente trabajo no se evaluó el desempeño pulmonar de los ratones con monoartritis, si se realizó el análisis de su perfil de citocinas en el órgano de estos individuos.

Por otro lado, el bazo es uno de los órganos más afectados en la AR, ya que en términos de inflamación se sabe que esta estructura es capaz de responder activamente a repetidas infecciones, por ejemplo, ya que en él se combinan las acciones del sistema inmune innato y el adaptativo, a través de mediadores como las citocinas.

Se ha observado que la administración de C/C induce tanto en el bazo, como en las articulaciones un incremento significativo de citocinas proinflamatorias, como la IL-1 β , el TNF- α y la IL-17.

Se ha demostrado que la interleucina IL-17, juega un papel importante en esta enfermedad, es secretada por una variedad de células inmunes e incluso algunas no-inmunes. Se encuentra en niveles elevados en pacientes con AR, y la concentración de ésta se correlaciona con la gravedad de la enfermedad (Chabaud *et al.*, 1999). IL-17, es un iniciador temprano de la inflamación y es capaz de inducir la liberación de algunas otras citocinas en fibroblastos, osteoblastos, sinoviocitos, macrófagos y células endoteliales, dentro de dichas sustancias están el

TNF- α , la IL-1 β , e IL-10 (Benedetti y Miossec, 2014). Como se observa en la sección de resultados, esta proteína se encuentra en concentraciones elevadas, respecto al grupo que no recibe C/C en bazo y articulación en los que se midió, indicando su participación en el proceso

inflamatorio de acuerdo a lo citado en la literatura. El sinovio de la articulación con AR se caracteriza por la expresión de una gama amplia de citocinas que incluyen, además de la IL-17, al TNF, IL-1 e IL-10, que se encuentran no reguladas por periodos de tiempo prolongados explicando con ello la cronicidad de la inflamación en dicho padecimiento (Brennan, *et al.*, 1989).

En concordancia con esto, en el modelo de monoartritis con C/C del presente proyecto, se presentó el incremento de TNF- α e IL-1 β ; mientras que la IL-10 la proteína catalogada como antiinflamatoria se observa disminuida en el grupo con daño. Estos resultados podrían ser parte de un mecanismo de regulación mediada por IL-17 (Benedetti y Miossec *et al.*, 2014).

Analizando la respuesta de los ratones con daño mono-articular, ante los diferentes tratamientos. El fármaco MTX en este modelo de C/C, se observa que es capaz de disminuir la concentración de las 3 citocinas proinflamatorias en la articulación, los niveles de IL-17 son abatidos por esta sustancia en el pulmón, sin embargo, en el bazo esta incrementa; mientras que en el órgano linfoide aumenta TNF- α y en el pulmón provoca una mayor concentración de ésta y de IL-1 β . En el grupo con MTX, la IL-10 se observó arriba de los niveles del grupo VEH. El metotrexato es un tratamiento de elección para varios padecimientos autoinmunes, por lo que fue seleccionado como control positivo en esta investigación. Y aun cuando modula la patogénesis de varias enfermedades, aun no se conoce de forma certera la extensión de su actuación sobre la producción de citocinas por las células inmunes.

Se ha publicado, por ejemplo, que disminuye la expresión de IL-17, TNF- α e IL-1 β en biopsias de sinovio de pacientes con AR (Dolhain *et al.*, 1998). Se propone que MTX pudiera estar interfiriendo con la unión IL-1 β sobre su receptor IL1, inhibiendo con ello la respuesta a esta citocina. El tratamiento con éste disminuye la proporción de células CD4+ positivas a TNF- α en sangre de enfermos, e incrementa en número de células positivas a IL-10 (Rudwaleit *et al.*, 2000). Los datos aquí presentados son congruentes con datos de la literatura, en pulmón se ha observado que MTX es un agente implicado en la enfermedad pulmonar intersticial provocando infiltración de neutrófilos, infiltración linfocítica, alveolitis, eventos y síntomas que se comparten con los problemas pulmonares en la AR. Así que, la sospecha de eventos pulmonares asociados al consumo de este fármaco lleva a eliminarlo como parte del tratamiento de la AR (Conway *et al.*, 2014). Si bien, no se ha definido que en el modelo de C/C usado, haya daño pulmonar se podría suponer que el incremento en la concentración de dos citocinas proinflamatorias en el

pulmón de ratones que recibieron MTX (TNF- α e IL-1 β), se deba en parte al que dicha sustancia induce efectos de inflamación pulmonar. Diferentes estudios aportan para definir que el MTX es una sustancia que disminuye el daño articular actuando en órganos como el bazo, en el que por ejemplo disminuye la actividad de la enzima gamma glutamil transferasa (marcador inflamatorio) en el bazo y modifica el tamaño de éste (Feketeová *et al.*, 2012).

La administración de las dos diferentes dosis del extracto hexánico de *T. lucida*, provocó efectos similares en los niveles de citocinas, con ligeras diferencias que se asumen como un efecto que puede depender de la dosis. Así TIH induce un incremento importante en los niveles de IL-10 en los tres órganos, este incremento correlaciona positivamente con una propuesta de que el extracto podría estar modulando la respuesta articular ante el estímulo con C/C, ya que la concentración de IL-17 e IL-1 β disminuyeron localmente en este grupo experimental, algo similar sucedió en el bazo por lo menos a la dosis de 50 mg/kg. Mientras que en pulmón la asociación es menos lineal. IL-10 se expresa en una gran variedad de células, actuando como un transductor de señales, jugando un papel importante en prevenir una respuesta inflamatoria exagerada, protegiendo en la mayoría de los casos de daño inmune (Trinchieri, 2007). De tal manera que es posible que TIH, sea capaz de actuar en alguna vía de esta regulación inflamatoria y que es probable que al incrementar la concentración de IL-10 se module con ello la cascada inflamatoria que provoca la liberación de IL-17, TNF- α e IL-1 β . Por ejemplo, en esplenocitos deficientes de IL-10 y de su receptor y que son cultivados bajo condiciones polarizantes hacia Th17, la concentración de IL-17 se incrementa, y que la adición de IL-10 revierte esto, implicando la correlación entre ambos mediadores en el que IL-10 dirige la expresión de las células productoras de la citocina proinflamatoria (Gu *et al.*, 2008). El efecto modulador de TIH sobre la respuesta inflamatoria en los órganos mencionados, después de un estímulo de daño articular, podría estar mediado en parte por la concentración de cumarinas y terpenos producidas por *T. lucida*. Como se ha mencionado a lo largo del texto, esta planta y particularmente el extracto poco polar tiene efecto antiinflamatorio y la demostración de éste, estuvo acompañado del aislamiento de 5 cumarinas de las cuales 7-isoprenyloxycumarina y herniarina fueron las más activas (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2019). Por lo que, ambas fueron aisladas durante el desarrollo de la presente propuesta para ser evaluadas en el modelo de monoartritis, junto con otra cumarina aislada por vez primera en la planta, el virgatenol. En la sección de resultados se muestra que los tres compuestos tienen efectos variados sobre la concentración de cada órgano,

que podría además correlacionarse con el efecto de disminución de la inflamación articular que todos provocaron. Así, en este tejido y en pulmón la concentración de IL-10 se elevó con el tratamiento de 7-isoprenyloxicumarina, herniarina y virgatenol, aunque en bazo dicha acción sólo fue inducida con 7-isoprenyloxicumarina. Un punto significativo de resaltar de estos compuestos es que ninguno de los 3 tiene efectos sobre la concentración de IL-17, ni en articulación o bazo, únicamente 7-isoprenyloxicumarina y herniarina tienen efecto al disminuir la concentración en el pulmón. Pero los tres compuestos disminuyen significativamente los niveles de IL-1 β en articulación y bazo por otro lado solo el virgatenol disminuyó en el pulmón, no obstante, incrementan TNF- α en articulación y pulmón. Se podría proponer que los compuestos modulan la respuesta asociada a IL-10 y que la respuesta antiinflamatoria, la ejercen por incrementar ésta y disminuir IL-1 β específicamente.

Podría en este sentido haber una relación del efecto modulador de la respuesta inmune con las sutiles diferencias estructurales entre los compuestos, en su acción sobre cada uno de los órganos afectados por la inflamación inducida localmente con C/C. Se ha mencionado que para el efecto antiinflamatorio-local, la posición 7 del anillo aromático de la cumarina 7-isoprenyloxicumarina incrementa dicha actividad respecto a la herniarina, la diferencia estructural en ambas es que en dicha posición la primera posee un radical isoprenilo, mientras que la segunda un metoxilo (Monterrosas-Brisson *et al.*, 2019). La modulación en la concentración de citocinas, en los tejidos analizados, indica que las dos sustancias tienen un patrón similar, lo que no pasa con el virgatenol cuya estructura química es un poco más compleja que los dos anteriores, conteniendo en la posición 7 un radical complejo (2-hidroxi-3-metilbutenoxilo) además de un grupo metoxilo en la posición 6, y sea tal vez lo que provoque inactividad por lo menos sobre la citocina IL-17. Algunos estudios indican la actividad antiinflamatoria de herniarina, además del ensayo de TPA-local (Monterrosas-Brisson, 2019), se ha mostrado que inhibe, aunque en una baja proporción, la liberación de PGE2 y de leucotrieno (LTC4) en un cultivo de macrófagos peritoneales (Silván *et al.*, 1996). No existen datos de la actividad sobre los mecanismos antiinflamatorios de estos compuestos, como lo es la modulación de mediadores de daño.

Para los otros dos compuestos aislados de *T. lucida*, se observó que tanto la mezcla amirinas como el espatulenol (alcohol sesquiterpénico) provocan una actividad similar en el bazo de los animales expuestos a C/C, modulando principalmente a la baja la concentración de

citocinas pro-inflamatorias IL-17, IL-1 β e TNF- α , lo que puede a su vez tener influencia sobre la respuesta observada directamente en la articulación, ya que en el bazo no hay modificación de IL-10, pero esta molécula se incrementó significativamente en la articulación. La mezcla de amirinas disminuye la concentración de IL-17 e IL-1 β tanto en articulación como pulmón, mientras que para TNF- α ambos compuestos tienen actividad antiinflamatoria en la articulación.

La presencia de espatulenol se ha demostrado previamente en algunas especies del género *Salvia* como *S. yosgadensis*, (Topcu *et al.*, 1996) *S. rhytidea* (Sajjadi y Ghannadi, 2005) y *S. sclarea* (Ulubelen *et al.*, 1994) sus efectos antiinflamatorios y en *Cinnamomum osmophloeum* que contiene 15,7% de espatulenol, inhibió eficazmente la producción de IL-1 β e IL-6, pero no de TNF- α , lo que sugiere su bioactividad antiinflamatoria *in vitro* (Chao *et al.*, 2005) Además, el aceite volátil obtenido de la cáscara de la fruta de *Garcinia brasiliensis* con 8,7% de espatulenol se evaluó a través del modelo de edema de pata de rata inducido por carragenina y se observó inhibición del proceso inflamatorio después de la administración de carragenina (Martins *et al.*, 2008). En este trabajo se pudo comprobar dicha actividad antiinflamatoria en este modelo experimental al inhibir la producción de IL-1 β únicamente en el bazo pero además se observó una disminución de TNF- α en la articulación.

La mezcla de α y β amirinas, ya tienen descripción de su actividad sobre algunos mecanismos antiinflamatorios, por ejemplo, se mostró que en un ensayo *in vitro* la α -amirina inhibe la diferenciación de células Th17 extraídas de ratones C57BL6 hacia el fenotipo de células T-CD4+, estos linfocitos conducen a la inflamación relacionada con enfermedades autoinmunes como la AR (Seo *et al.*, 2019). En el ensayo de TPA, causa un efecto dependiente de la concentración sobre el edema auricular y el flujo de células polimorfonucleares (Otuki *et al.* 2005)

En el modelo de edema plantar-inducido por carragenina en rata se observó que la β -amirina disminuye la inflamación de una manera dosis-dependiente, además este terpeno inhibió la secreción de PGE2, IL-6 y la activación de NF- κ B de células mononucleares de sangre periférica humana-estimuladas con LPS (Kripa *et al.*, 2014). La actividad antiinflamatoria de este terpeno fue evaluada en la línea de macrófagos celulares RAW264.7 estimuladas con LPS en concentraciones de 1-100 nM, observándose una inhibición en la secreción de TNF- α (Ding *et al.* 2010), efecto no observado para la α -amirina en las mismas células (Ding *et al.* 2009)

Se ha reportado a *Tagetes patula* tener una actividad sobre el modelo *in vivo* de artritis

inducido en ratas hembra. En este experimento se observó un daño menor en la articulación, menor infiltración de linfocitos y como resultado una disminución en la inflamación plantar (Jabeen *et al.*, 2016). De los resultados aquí mostrados, se puede señalar que para *Tagetes lucida* es la primera vez que se demuestra su efecto antiinflamatorio en un modelo de artritis experimental, en el que se observa que el extracto hexánico y los compuestos aislados poseen en diferente medida la actividad buscada, al modular los niveles de citocinas pro- y antiinflamatorias en tres estructuras sensibles de los eventos fisiopatológicos asociados a la AR además de su capacidad analgésica del extracto hexánico en diferente dosis y algunos de los compuestos aislados.

9 Conclusiones

1. Se logró el aislamiento de diferentes compuestos, 7-Isoprenyloxycumarina, herniarina, virgatenol, espatulenol, entre otros encontrados en las mezclas.
2. El extracto TIH, la 7-isoprenyloxycumarina, herniarina, virgatenol, y la mezcla de amirinas, disminuyen la inflamación auricular –inducida con TPA.
3. El extracto TIH, la 7-isoprenyloxycumarina, herniarina, virgatenol, espatulenol y la mezcla de amirinas, disminuyen la inflamación articular de ratones con C/C.
4. No hubo cambios significativos en el porcentaje de bazo o pulmón, entre los animales que recibieron algún tratamiento de *T. lucida* en comparación con el grupo de daño.
5. El extracto TIH y la herniarina fueron capaces de disminuir el dolor de ratones con artritis inducida con C/C en el ensayo de hiperalgesia.
6. Los tratamientos derivados de *T. lucida*, fueron capaces de modular la concentración de las citocinas IL-10, TNF- α , IL-1 β , IL-17 en diferentes niveles, sobre los tres órganos analizados, cabe señalar que el tratamiento con mayor consistencia fue el TIH a 50 mg/kg. Sin embargo, todos ejercen un nivel de modulación

10 Perspectivas

- Llevar a cabo un análisis histológico de articulaciones, pulmón y bazo de ratones con artritis experimental, con el mejor tratamiento derivado de *T. lucida*.
- Evaluar los mejores tratamientos en un modelo de células in vitro, para tratar de acercarse al mecanismo de acción por el cual TIH y los compuestos disminuyen la inflamación articular y modulan la concentración de citocinas.
- Investigar la interacción entre los compuestos y otros fármacos sobre su efecto anti-artrítico y anti-inflamatorio.

Glosario

Agreganastas: Familia de proteasas extracelulares conocidas como ADAMTS, estas son enzimas importantes en la destrucción articular.

Antígeno: Cualquier sustancia que haga que el cuerpo produzca una respuesta inmunitaria contra ella.

Artritis psoriásica: Es una forma de artritis que afecta a algunas personas que tienen psoriasis, una afección que presenta manchas rojas en la piel cubiertas con escamas plateadas.

Autoanticuerpo: Anticuerpo dirigido contra moléculas del propio organismo. Pueden ser específicos o de moléculas localizadas en distintos órganos o sistemas.

Bioterio: Conjunto de instalaciones, muebles e inmuebles destinados al alojamiento y manutención de animales de laboratorio durante una o varias de las fases de su ciclo vital; esto es, nacimiento, desarrollo, reproducción y muerte.

Células dendríticas (CD): células que juegan un papel fundamental en la regulación de la respuesta inmune. Son las principales células presentadoras antigénicas, por su capacidad de capturar, procesar y presentar antígenos de forma óptima a linfocitos T, y generar respuestas inmunes específicas.

Células T CD4: Las células T CD4 son un subgrupo de los linfocitos T que ayudan a coordinar la respuesta inmunitaria al estimular a otros inmunocitos, como los macrófagos, los linfocitos B.

Células T CD8: pertenecen a la línea de los linfocitos T encargados de las funciones efectoras de la inmunidad celular. Neutralizan células infectadas por microorganismos intracelulares.

Ciclooxigenasa-2 (COX-2): La COX2 se expresa tras inducción de agentes como lipopolisacáridos o citocinas proinflamatorias, y regula la producción de los prostanoïdes que participan en la inflamación y en otros procesos no inflamatorios, tanto fisiológicos como patológicos.

Condrocitos: Son el elemento celular único del cartílago y son los responsables de la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular.

Corticosteroides: Los glucocorticoides o corticosteroides son fármacos antiinflamatorios, antialérgicos e inmunosupresores derivados a partir del cortisol.

Efecto sinérgico: Interacción de dos o más sustancias que produce un efecto total mayor que la suma de los efectos particulares de cada uno.

Eicosanoides: Sustancias de corta vida media, alta potencia local y producen amplia variedad de efectos al unirse a receptores celulares específicos son derivados de ácidos grasos de 20 átomos de carbono (principalmente del ácido araquidónico)

Eosinófilo: Célula fagocítica del grupo de los leucocitos (glóbulos blancos), que contiene y libera una serie de enzimas en la reacción inflamatoria; por tal razón se le considera un modulador de la inflamación.

Erosión ósea: Degradación del hueso por procesos patológicos

Espondiloartritis: Tipo de artritis que ataca la columna y, en algunas personas, las articulaciones de brazos y piernas. También puede involucrar la piel, los intestinos y los ojos.

E-selectina: Glicoproteína que se expresa exclusivamente en las células endoteliales activadas, en respuesta a citoquinas inflamatorias, permitiendo la adhesión y migración de macrófagos y leucocitos al endotelio activado.

Factor estimulante de colonias de granulocitos (CSF): Proteína que estimula la producción y desarrollo en la médula ósea de neutrófilos (glóbulos blancos)

Fibroblastos: Tipo celular característico y más abundante del tejido conectivo y su función principal es la síntesis y mantenimiento de la matriz extracelular de dicho tipo de tejido.

Fosfolipasa (PLA2): Las fosfolipasas A2 (FLA2) forman una familia de enzimas claves en el recambio de los fosfolípidos de membranas y en la generación de diversas sustancias bioactivas como ácidos grasos libres y mediadores lipídicos de la inflamación

Hepatotoxicidad: Lesión o daño al hígado causado por la exposición a un medicamento u otros agentes no farmacológicos.

Interferón (IFN): Proteínas producidas por células de vertebrados ante diferentes estímulos biológicos. La función inmunomoduladora del IFN es clave para la regulación de la presentación antigénica, la diferenciación a células Th1 o Th2 y la regulación de la migración celular a los sitios de inflamación.

Leucotrieno (LTB4): Los leucotrienos son moléculas derivadas del ácido araquidónico por la vía de la 5-lipooxigenasa, procedentes de diversas células; participan en algunos

procesos que dañan órganos y tejidos, juegan un papel importante en la inflamación, El LTB₄ causa adhesión, quimiotaxis de leucocitos, estimula la agregación, liberación enzimática y generación de superóxido en neutrófilos.

Líquido sinovial: Fluido viscoso transparente que constituye un ultrafiltrado del plasma que contiene diversos componentes que le confieren propiedades lubricantes, metabólicas y regulatorias, que disminuyen la fricción y desgaste del cartílago articular.

Linfocitos B: Los linfocitos B son los leucocitos de los cuales depende la inmunidad mediada por anticuerpos con actividad específica de fijación de antígenos

Macrófago: Los macrófagos son células de la respuesta inmune especializadas en la detección, fagocitosis y destrucción de bacterias y otros organismos dañinos. Además, pueden presentar antígenos a las células e iniciar el proceso inflamatorio mediante la liberación de citocinas, que activan otras células.

Mastocitos: Los mastocitos son células residentes de los tejidos, con una larga vida media y son un componente clave de las respuestas inflamatorias debido a que pueden activarse y liberar una gran variedad de mediadores gracias a diversos antígenos, como alérgenos, patógenos y mediadores fisiológicos.

Membrana sinovial: Capa de tejido conjuntivo que recubre las cavidades de las articulaciones, las envolturas del tendón y las bolsas llenas de líquido entre tendones y huesos. La membrana sinovial produce el líquido sinovial, que actúa como lubricante

Metabolito secundario: Las plantas, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa. Estos compuestos derivados del metabolismo secundario se denominan metabolitos secundarios, presentan propiedades biológicas, ecológicas y se caracterizan por sus diferentes usos y aplicaciones como medicamentos, insecticidas, herbicidas, perfumes o colorantes, entre otros.

Metaloproteínas: Las metaloproteinasas (MMPs) intervienen en diversos procesos fisiológicos y patológicos del organismo. Regulan las vías de señalización que controlan el crecimiento celular, la inflamación y la angiogénesis. Participan en el procesamiento de moléculas bioactivas como citoquinas, quimiocinas y factores de crecimiento

Nódulos reumatoides: Manifestación morfológica más típica de la artritis reumatoide, son protuberancias óseas abultadas que aparecen en las articulaciones de los dedos de manos,

pies, codos y tobillos habitualmente.

Perennifolio: En botánica, se conocen como árboles perennifolios o de hoja perenne a los árboles que mantienen su follaje durante todo el año.

Pericarditis: Inflamación de una doble membrana que rodea al corazón, llamada pericardio.

Pleuritis: Inflamación de los tejidos que recubren los pulmones y la cavidad torácica.

Proteoglicanos: moléculas formadas por proteínas y glucosaminoglicanos que se disponen entre las fibras de colágeno.

Prostaglandina: Son sustancias de carácter lipídico derivadas de los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides), juegan un papel importante en regular diversas funciones como la presión sanguínea, la coagulación de la sangre, la respuesta inflamatoria y la actividad del aparato digestivo.

Sinovitis: Inflamación aguda o crónica de la membrana sinovial que recubre la articulación de la rodilla.

Síndrome de Sjogren: Trastorno autoinmunitario en el cual se destruyen las glándulas que producen las lágrimas y la saliva. Este trastorno puede afectar muchas partes diferentes del cuerpo, incluyendo los riñones y los pulmones

Terpenos: Los terpenos son compuestos orgánicos aromáticos y volátiles que están constituidos por la unión de unidades de un hidrocarburo de 5 átomos de carbono, llamado isopreno. Los terpenos son los metabolitos secundarios que dan las características organolépticas (aroma y sabor) de las plantas y que constituyen la mayor parte del aceite esencial producido por las plantas aromáticas

Referencias

- Aguillón J.C., Cruzat A., Contreras-Levicoy J., Dotte A., Pesce B., Aravena O., Salazar L., Catalán D., Abello P., Aguirre A., Llanos C. y Cuchacovich M. (2005) Terapias emergentes en Artritis reumatoide, *Rev Méd Chile*, 133: 969-976.
- Aquino R., Cáceres, A., Moreli, S. y Rastrelli, L. (2002) An extrac of *Tagetes lucida* and its phenolic constituents as antioxidants, *J. Nat Prod*, 65;1773-1776.
- Arthritis foundation (2016), Artritis reumatoide, recuperado de <http://espanol.arthritis.org/espanol/disease-center/arthritis-reumatoide/> el 12 de marzo del 2019
- Asquith D.L., Miller A.M., McInnes I.B., y Liew F.Y. (2009). Animal models of rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology*, 39(8), 2040–2044. <https://doi.org/10.1002/eji.200939578>
- Ávalos-García A., Pérez-Urria y Carril E. (2009) Metabolismo secundario de plantas, *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145
- Azcón J. y Talón M. (2000). *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. Buenos Aires, Argentina: Editorial McGraw Hill S.A. Interamericana. 851
- Bendele A. (2001). Animal models of rheumatoid arthritis. *Journal of Musculoskeletal & Neuronal Interactions*, 1(4), 377–385.
- Benedetti F. y Miossec P. (2014) Interleukin 17 contributes to chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid Arthritis, *Eur. J. Immunol*, 44:339-347), DOI: 10.1002/eji.201344184
- Biblioteca digital de la Medicina Tradicional Mexicana (2014), Recuperado de <https://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php> el 2 de abril del 2019
- Blivis D., Mentis G.Z., O'Donovan M.J., Lev-Tov A. (2007). Differential effects of opioids on sacrocaudal afferent pathways and central pattern generators in the neonatal rat spinal cord. *Journal of Neurophysiology*, 97:2875–2886.
- Boers M, Verhoeven A.C, Markusse H.M, Van de Laar M.A, Westhovens R, Van Denderen J.C, (1997) Randomised comparison of combined step-down prednisolone, methotrexate and sulphasalazine with sulphasalazine alone in early rheumatoid arthritis. *Lancet*, (350):309-318

- Bonilla J.H, Guadarrama-Cruz G, Alarcón-Aguilar F.J, Limón-Morales O. y Vázquez-Palacios G. (2015) Antidepressant like activity of *Tagetes lucida Cav* is mediated by 5-HT (1A) and 5-HT (2A) receptors, *J Nat Med*, 69:463-470
- Brennan F.M, Chantry D, Jackson A.M, Maini R.N y Feldmann M. (1989) Cytokine production in culture by cells isolated from the synovial membrane., *J. Autoimmun.* 2 Suppl 177–186, DOI: 10.1016/0896-8411(89)90129-7
- Bressolle F, Kinowski J.M, Morel J, Pouly B, Sany J, Combe B. (2000) Folic acid alters methotrexate availability in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol.*; 4:2110–2127
- Céspedes C.L., Ávila J.G, Martínez A., Serrato B., Calderón-Mujica J.C. y Salgado-Garciglia R. J., (2006) *Agric Food Chem*, 17; 3521-3527
- Chabaud M., Durand J. M., Buchs N., Fossiez F., Page G., Frappart L. y Miossec, P. (1999) Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium *Arthritis Rheum*, 42 (5): 963–970, DOI:10.1002/1529-0131(199905)42:5<963::AID-ANR15>3.0.CO;2-E
- Chao LK, Hua KF, Hsu HY, Cheng SS, Liu JY y Chang ST. (2005) Study on the antiinflammatory activity of essential oil from leaves of *Cinnamomum osmophloeum*. *J Agric Food Chem* 53: 7274–7278.
- Choy S., Fernández W., Morocho S., Pérez L., Rojas C., Vargas Y., Yzazaga B. y Zúñiga, A. (2015) Nivel de conocimientos y uso fitoterapeuta en Artritis Reumatoide en el Hospital Nacional Sergio E. Bernales Durante el periodo Abril-Junio 2015, *Revista científica alas peruanas*, 2 (1) 1-26
- Ciccio J.F. (2004) A source of almost pure methyl chavicol: volatile oil from aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica, *Rev Biol Trop*, 52: 853-857
- Cisneros-Caballero A.F., Felgueres-Planells M.J., Vela-Jarquín E., Gómez-Martin D., (2017) Estrategias terapéuticas para la artritis reumatoide: hacia las terapias biotecnológicas, *Investigación en Discapacidad*, 6 (2) 69-87.
- Conabio (2017) Recuperado de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-lucida/fichas/ficha.htm> el 31 de marzo del 2019
- Conway R., Low C., Coughlan R. J., O'Donnell M. J., Carey J. J., (2014) Methotrexate and

lung disease in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of randomized controlled trials, *Arthritis Rheumatol*;66(4):803-12, DOI: 10.1002/art.38322.

Coordinadora Nacional de Artritis (2010) Artritis reumatoide: Información actualizada para pacientes y familiares, recuperado de http://www.conartritis.org/wp-content/uploads/2012/05/informacion_actualizada_pacientes_familiares.pdf el 12 de marzo del 2019

Coordinadora Nacional de Artritis (2014) Recuperado de <http://www.conartritis.org/todo-sobre-artritis/que-es-la-ar/que-es-la-artritis-reumatoide/> 2 de marzo del 2019

Crespo M.E y Navarro M.C. (2012) La raíz de harpagofito en el tratamiento de afecciones reumáticas, *Rev Fitoterapia*, 12(1): 5-14

Cronstein B.N. (1997) The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am*;23:739–755

De Feo V., Soria E.U., Soria R.U. y Pizza C., (2005). Composition and in vitro toxicity of the essential oil of *Tagetes terniflora* HBK (asteraceae), *Flav. Fragr. J.*, 20, pp. 89-92.

De Young L.M., Kheifets J.B., Ballaron S.J., Young J.M (1989) Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separated and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents Actions*;26:335-41.

Debenedetti S. L, Nadinic E.L, Coussio J. D, De Kimpet N. y Boeykenst M. (1998) Two 6,7-dyoxygenated coumarins from *Pterocaulon virgatum*, *Phytochemistry*, 48 (4) 107-110

Ding Y., Chun L, Kim J.H, Lee Y.M, Hyun J.H., Kang HK, Kim J.A, Min B.S y Kim YH (2010) Triterpene compounds isolated from *Acer mandshuricum* and their anti-inflammatory activity. *Bioorg Med Chem Lett*. 1;20(5):1528-31), DOI: 10.1016/j.bmcl.2010.01.096

Ding Y., Nguyen H.T, Kim S.I, Kim H.W y Kim Y.H (2009). The regulation of inflammatory cytokine secretion in macrophage cell line by the chemical constituents of *Rhus sylvestris*. *Bioorg Med Chem Lett.*, 1;19(13):3607-10), DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.04.129

Dolhain R.J., Tak P.P., Dijkmans B.A., De Kuiper P., Breedveld F.C. y Miltenburg A.M., (1998) Methotrexate reduces inflammatory cell numbers, expression of monokines

and of adhesion molecules in synovial tissue of patients with rheumatoid Arthritis, Br. J. Rheumatol., 37, 502–508, DOI: 10.1093/rheumatology/37.5.502.

Domínguez-Baena L., Lisbona-Muñoz M., y Montero C. (2015) Artritis Reumatoide, Rotación del residente de Medicina Familiar y Comunitaria por Reumatología, Madrid, España, You & Us, S.A, 13-25

Edno L, Bressolle F, Gomeni R, Bologna C, Sany J y Combe B. (1996) Total and free methotrexate pharmacokinetics in rheumatoid arthritis patients. The Drug Monit.;18:128–134.

El Bahri D.M., Meddeb N. y Sellami S. (2007) Rheumatoid arthritis: current status of therapy, Tunis Med, 85(1):1-8

Etherton K, P.M., Hecker, K. D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., y Hilpert, K.F (2002). Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. American Journal of Medicine 113: 71-88

Feketeová L, Jančová P, Moravcová P, Janegová A, Bauerová K, Poništ S, Mihalová D, Janega P y Babál P. (2012) Effect of methotrexate on inflammatory cells redistribution in experimental adjuvant Arthritis, Rheumatol Int.;32(11):3517-23), DOI: 10.1007/s00296-011-2177-3.

Filella X., Molina R., y Ballesta A, M. (2002). Estructura y función de las citocinas. Medicina Integral: Medicina Preventiva y Asistencial En Atención Primaria de La Salud., 39(2), 63–71. <https://doi.org/0210-9433>

Flores-García Y. y Talamas-Rohana P., (2012) Interleucina 17, funciones biológicas y su receptor, REB 31(1): 3-9

Fragoso J. M., Alarcón G. V. y Morales S. J. (2013). El factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en las enfermedades autoinmunes (EA): biología molecular y genética, Gaceta Medica de México 149(5) 521-530

Goicoechea-García C. (2016) Farmacología del metotrexato, Reumatol Clin Supl.;11(1):3-7

Goldbach-Mansky R, Wilson M y Fleischmann R. (2009) Comparison of *Tripterygium wilfordii* Hook F versus sulfasalazine in the treatment of rheumatoid arthritis: a randomized trial, Ann Intern Med, 151: 229-240

Gómez H., Gonzales K. y Medina J. (2011) Actividad antiinflamatoria de productos naturales. Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas,

10:182-217

González-Pineda, A. (2012) Monoartritis aguda, *Rev Invest Med Sur Mex.*; 19 (2): 106-110

Gu Y, Yang J, Ouyang X, Liu W, Li H, Bromberg J, Chen S, Mayer L., Unleess J. C. y

Xiong H. (2008) Interleukin 10 suppresses Th17 cytokines secreted by macrophages and T cells. *Eur J Immunol*; 38:1807–13, DOI: 10.1002/eji.200838331

Hamilton J.A y Tak P.P. (2009) The dynamics of macrophage lineage populations in inflammatory and autoimmune diseases, 60: 1210-1221.

Hansra P., Moran E. L., Fornasier V. L., y Bogoch E. R. (2000). Carrageenan-induced arthritis in the rat. *Inflammation*, 24(2), 141–155.

<https://doi.org/10.1023/A:1007033610430>

Hegen M., Keith J. C., Collins M., y Nickerson-Nutter C. L. (2008). Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 67(11), 1505–151

<https://doi.org/10.1136/ard.2007.076430>

Hennet I.T, Huang B., Musayev F.N, Hashimi R.A., Safo M.K, Armah F.A, Ameyaw E.O, Adokoh C.K, Ekor M. y Zhang Y. (2020) Structural Elucidation and in Vivo Anti-Arthritic Activity of β -Amyrin and Polpunonic Acid Isolated From the Root Bark of *Ziziphus Abyssinica* Hochst Ex. A Rich (Rhamnaceae). *Bioorg Chem* Vol. 98, 103744

Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (2016) Día mundial de la artritis [Mensaje en un blog]. Recuperado de <https://www.gob.mx/issste/articulos/dia-mundial-de-la-artritis-72879?idiom=es> el 11 de marzo del 2019

Instituto Mexicano del Seguro Social (2009) Evaluación de los Riesgos Considerados en el Programa de Administración de Riesgos Institucionales, Recuperado de <http://www.imss.gob.mx/sites/all/statics/pdf/estadisticas/PARI/parievaluacion2009.pdf> el 11 de marzo del 2019

Instituto Nacional de la Salud (2014) Artritis reumatoide, Recuperado de <https://www.niams.nih.gov/es/informacion-de-salud/artritis-reumatoide> 22 de marzo del 2019

- Jabeen A., Mesaik M.A., Simjee S.U., Lubna., Bano S., y Faizi S. (2016) Anti TNF- α and anti- arthritic effect of patulein: A rare flavonoid from *Tagetes Patula*. Int. Immunopharmacol, 36: 232- 240
- Jaillier J.C.R., Arango A.M.P y Pérez D.A.M. (2015) Challenges faced in Latin America for the implementation of an ideal health-care model for rheumatoid arthritis patients: are we ready? Clin Theumatol 34:79.doi:10.1007/s10067-015-3034-7.
- Keystone E., Fleischmann R., Emery P., Furst D.E., Van Vollenhoven R. y Bathon, J. (2007) Safety and efficacy of additional courses of rituximab in patients with active rheumatoid arthritis: an open label extension analysis, Arthritis Rheum, 56:3896-3908
- Kripa K, Mathew L.E, Vijayalakshmi N.R., y Helen A. (2014) Anti-inflammatory potential of β -amyryn, a triterpenoid isolated from *Costus igneus*. Inflammopharmacology.;22(6):373-8, DOI: 10.1007/s10787-014-0218-8
- Kweifio-Okai G, De Munk F, Rumble B.A, Macrides T.A, y Cropley M. (1994) Antiarthritic mechanisms of amyryn triterpenes. Res Commun Mol Pathol Pharmacol. Jul;85(1):45-55
- Lam J., Takeshita S., Barker J. E., Kanagawa O., Ross F. P. y Teitelbaum S. L. (2000) TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand, J Clin Invest; 106:1481–1488
- Le Bars D., Gozariu M., y Cadden S.W. (2001). Animal models of nociception. Pharmacological Reviews, 53:597-652
- Lebbe C, Beyeler C, Gerber N.J, y Reichen J. (1994) Intraindividual variability of the bioavailability of low dose methotrexate after oral administration in rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis; 53:470-475
- Lemaire I., Assinewe V., Cano P., Awang D.V.C. y Arnason J. T. (1999) Stimulation of interleukin-1 and -6 production in alveolar macrophages by the neotropical liana, *Uncaria tomentosa* (Uña de Gato). J Ethnopharmacol, 64:109-115.
- Marcio C., Oliveira B., Sakata R. K., Issy A. M., y Gerola L. R. (2011). Citocinas y Dolor. 61, 137–142.
- Martin D., (2018) Los compuestos fenólicos: un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica, Revista de Investigación Agraria y Ambiental, Vol. 9, Núm. 1,

DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.1968>

- Martins F.T, Doriguetto A.C, De Souza T.C, D., De Souza KR, Dos Santos M.H, Moreira M.C.E y Barbosa L.C.A (2008). Composition, and anti-inflammatory and antioxidant activities of the volatile oil from the fruit peel of *Garcinia brasiliensis*. *Chem Biodivers* 5: 251–258
- McInnes I. B. y Schett G. (2007). Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid Arthritis, *Nat Rev Immunol*, 7(6):429-42. doi: 10.1038/nri2094.
- Mebius R. y Kraal G. (2005) Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 5, 606–616, <https://doi.org/10.1038/nri1669>
- Merskey H. y Bogduk N. (1994) Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. En: Merskey H., Bogduk N. (eds.), Part III. Classification of Chronic Pain, 2a. ed. IASP Press. Seattle. p. 209-214
- Miossec P., Korn T. y Kuchroo V. K., (2009) Interleukin-17 and type 17 helper T cells, *N Eng J Med*; 361, 888-898
- Mitogen K. M., (2004) Activated protein kinases as target for development of novel anti-inflammatory drugs, *Ann Rheum Dis*, 63:62-64
- Monroy-Ortiz C y Castillo-España P. (2017) Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, 405
- Monterrosas-Brisson N., Herrera-Ruiz M., Jiménez-Ferrer E., Bahena-Pérez R., Avilés-Flores M., Fuentes-Mata M., Martínez-Dunker I., y Gonzales-Cortazar M. (2019) Anti-inflammatory activity of coumarins isolated from *Tagetes lucida* Cav, *Natural Product Reseach*, DOI: 10.1080/14786419.2018.1553172
- Morales-López A. (2013) Artritis reumatoide, *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 70(607) 523-528.
- Murakawa M, Yamaoka K, Tanaka Y, y Fukuda Y. (2006) Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-o-tetradecanohylphorbol-13-acetate (TPA) induced skin edema in mice. *Biochemical pharmacology*, (71): 1331:1336
- Nature Reviews Immunology*, 7(6), 429–442. <https://doi.org/10.1038/nri2094>
- Neira F. y Ortega J. L. (2006) Tratamiento del dolor en la artritis reumatoide fundamentado en medicina basada en la evidencia, *Rev. Soc. Esp. Dolor*, 8: 561-566
- Noa-Puig M., Más-Ferreiro R., Mendoza-Castaño S. y Valle-Clara M. (2011).

- Fisiopatología, tratamiento y modelos experimentales de artritis reumatoide. Revista Cubana de Farmacia, 45(2), 297–308.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Recuperado de <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/principal/archivos/062ZOO.PDF> el 2 de abril del 2019
- Núñez-Ponce C., Lozada-Requena I., Akamine-Panez I., Carbajal-Arroyo L., y Aguilar-Olano J. L. (2008) Efecto de *Uncaria tomentosa* (Uña de gato) sobre la población y activación de células dendríticas en sangre periférica de pacientes con artritis reumatoidea, Acta méd. Peruana, 25 (3) Lima jul./set. 2008
- Otuki M.F, Vieira-Lima F, Malheiros A, R, Yunes R.A., y Calixto J.B. (2005) Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. Eur J Pharmacol.10;507(1-3):253-9), DOI: 10.1016/j.ejphar.2004.11.012
- Payá M., Ferrándiz M., Sanz M.J., Bustos G., Blasco R., Ríos J.L., y Alcaraz MJ., (1993) Study of the antioedema activity of some seaweed and sponge extracts from the Mediterranean coast in mice. Phytotherapy Research, 7:159-162
- Pérez-Hernández, J. C., y Ochoa, J. P. (2012). Intoxicación por metotrexato en una paciente con artritis reumatoide. A propósito de un caso. Archivos de Medicina de Urgencia de México, 4(3)
- Pérez, N. y Jiménez, E. (2011). Producción de metabolitos secundarios de plantas mediante el cultivo in vitro. Biotecnología Vegetal, 11(4)
- Pérez-Ortega G., Gonzales-Trujano M.E., Angeles-Lopez G.E., Brindis F., Vibrans H. y Reyes-Chilpa R., (2016) *Tagetes lucida* Cav: Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of its tranquilizing properties, J. Ethnopharmacol, 181: 221-228
- Picerno V., Ferro F., Adinolfi A., Valentini E. y Tani C., (2015) One year in review: The pathogenesis of rheumatoid arthritis. Clin Exp Rheumatol, 33:551–558
- Pinto-Tasende Ja, Lives-Deán M., Fernández-Sueiro J.L, Galdo-Fernández F., y Blanco-García F.J (2003) El papel de la IL-1 en la destrucción del cartílago y el hueso subcondral, Revista Española de Reumatología Suplementos, 2(1): 20-24
- Porras, A. y López, A. (2009). Importancia de los grupos fenólicos en los alimentos. Temas

selectos de Ingeniería de Alimentos, 3(1), 121-124

Restrepo L.F, Giraldo R., London J., Pinzón C., Cortes A., Ballesteros G. y Santos A. M. (2016) Farmacogenética del metotrexato en artritis reumatoide, rev colomb reumatol, 23(2):102–114.)

Rudwaleit M, Yin Z., Siebert S., Grolms M., Radbruch A., Braun J. y Sieper J. (2000) Response to methotrexate in early rheumatoid arthritis is associated with a decrease of T cell derived tumour necrosis factor, increase of interleukin 10, and predicted by the initial concentration of interleukin 4. Ann. Rheum. Dis., 59, 311–314), DOI: 10.1136/ard.59.4.311.

Sajjadi S.E y Ghannadi A. (2005). Essential oil of the Persian sage, *Salvia rhytidea* Benth. Acta Pharm 55: 321–326

Sánchez-Ramón S., López-Longo F.J., y Carreño L. (2010). Interleucinas en la fisiopatología de la artritis reumatoide: más allá de las citocinas proinflamatorias. Reumatología Clínica, 6(3), 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.reuma.2010.11.010>

Sawynok J. (2003). Topical and peripherally acting analgesics. Pharmacological Reviews, 55:1-20.

Schiff M., Pritchard C., Huffstutter J.E., Rodríguez-Valverde V., Durez P. y Zhou X. (2009) Extended report. The 6-month safety and efficacy of abatacept in patients with rheumatoid arthritis who underwent a washout after anti-tumor necrosis factor therapy or were directly switched to abatacept: the ARRIVE trial, Ann Rheum Dis, 68(11) 1708-1714

Secretaria de Salud, (2011) Artritis Reumatoide, Boletín epidemiológico, 28(7), 1-4.

Senatore F. y De Feo V., (1999). Chemical composition of the essential oil from *Tagetes mandonii* Sch. Bip. (Asteraceae), Flav. Fragr. J., 14, pp. 32-34

Seo D.G, Kim S, Lee D.K, Kim N.Y, Lee J.S, Hwang K.W, Park S.Y (2019) Inhibitory effect of alpha-amyrin acetate isolated from *Fraxinus rhynchophylla* on Th17 polarization..Phytomedicine, 63:153056, DOI: 10.1016/j.phymed.2019.153056

Silván A.M, Abad M.J, Bermejo P, Sollhuber M, y Villar A.J (1996) Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. Nat Prod. Dec;59(12):1183-5, DOI: 10.1021/np960422f.

Sluka K., y Westlund K. (1993) Behavioral and immunohistochemical changes in an

- experimental arthritis model in rats, *Pain*. 55(3) 367-377).
- Sociedad española de reumatología (2019) Guía de práctica clínica para el manejo de pacientes con Artritis Reumatoide, recuperado de <https://www.ser.es/wp-content/uploads/2019/03/Guia-de-Practica-Clinica-para-el-Manejo-de-Pacientes-con-Artritis-Reumatoide.pdf> el 15 de marzo del 2019
- Suárez-Garza J. (2006). Realidad social y médica de las enfermedades reumáticas, la visión de un médico en formación. *Medicina Universitaria*, 8(33), 259–262.
- Sweeney S. y Firestein G., (2004) Signal transduction in rheumatoid arthritis, *Curr Opin Rheumatol*, 16:231-237.
- Tao X, Cush J., Garret M. y Lipsky P., (2001) A phase I study acetate extract of the chinese antirheumatic herb *Tripterygium wilfordii* hook F in rheumatoid arthritis, *J Rheumatol*, 28:2160-2167.
- Tao X, Younger J, Fan F, Wang B, y Lipsky P. (2002) Benefit of an extract of *Tripterygium wilfordii* Hook F in patients with rheumatoid arthritis; A double-blind, placebo- controlled study. *Arthritis Rheum*, 46: 1735-1743
- Topcu G, Ulubelen A, Tam T.C.M, y Tao-Che C. (1996). Sesterterpenes and other constituents of *Salvia yosgadensis*. *Phytochemistry* 42: 1089–1092
- Trinchieri G. (2007) Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*;204(2) :239–243, DOI: 10.1084/jem.20070104.
- Ulubelen A, Topcu G, Eris C., Sönmez U., Kartal M., Kurucu S, y Bozok-Johansson C. (1994). Terpenoids from *Salvia sclarea*. *Phytochemistry* 36: 971–974
- Van-Vollenhoven, R.F. (2009) Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art, *Nature Rev Rheumatol*, 5:531-541.
- Vega-Ávila E., Espejo-Serna A., Alarcón-Aguilar F. y Velazco-Lezama R. (2009) Cytotoxic activity of four Mexican medicinal plants, *Proc West Pharmacol Soc*, 52:78- 82
- Venkatesha S., Berman B. y Moudgi K.,(2011) Herbal medicine products target defined biochemical molecular mediators of inflammatory autoimmune arthritis, *Bioorg Med Chem*, 19:21-29
- Viteri, M. (2012). Estimación de las emisiones de compuestos orgánicos volátiles de la vegetación del Ecuador durante el año 2010, Quito, Ecuador

Zarate-Escobedo J., Castañeda-González E.L, Cuevas- Sánchez J.A., Carrillo-Fonseca C.L, Mendoza-García E.E. y Serrato-Cruz M.A, (2018) Concentrations and application intervals of the essential oil of *Tagetes lucida* Cav. against *Nacobbus aberrans*, Rev. Mex. Cienc. Agríc vol.9 no.3

Cuernavaca, Morelos a 17 de febrero de 2021

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **Bello Peralta Cinthya**, con el título del trabajo: **Actividad antiinflamatoria y antiartrítica de *Tagetes lucida Cav.***

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación de **Trabajo de Desarrollo Profesional por Etapas**, como lo marca el artículo 33° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: BIOL. PATRICIA ESCOBAR CASTAÑEDA

SECRETARIO: DR. DANTE AVILÉS MONTES

VOCAL: DRA. GABRIELA BELÉN MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

SUPLENTE: DR. JESÚS ENRIQUE JIMÉNEZ FERRER

SUPLENTE: DRA. NAYELI MONTERROSAS BRISSON



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

NAYELI MONTERROSAS BRISSON | Fecha:2021-02-17 23:22:22 | Firmante

H+mrqkfoN9MipXJVVWAYSYgpcRC+zqfGtPeAFmoHkHyJLAhj1lFFYlQfp0dZ6ucEIB1p15un8FTvriNOqcSr8FWIGqSW3YwIthYOP/62x3GA8qWQwRxAkiBZgnPBwA6sMTIQDo+Z9TbS3LQyV/kbAlN0AS9y3E/BpciBwgwl/52SoiKupy18hCM6UcWHHe/5byY5y0bmCr966nucxJlRlqXlVWVTecHCMpyR0/Gx8bKEI8CTxzGETLHLG7vdAaiLNDWeMA3oYCj/Q2K Mbt7QB5S8634gy1vgASlboYS+1nTEjzN1NbUumama95S+Ze3TfJXnpYzvTybYJN1KDYqOpw==

DANTE AVILES MONTES | Fecha:2021-02-17 23:24:07 | Firmante

wOBZcPfh5+/QoaTritMpDD2DINQ+pG3V/GZxeU66khHuSorSUnZCXqcAo+Ws6TCq7vyB1gVpdJlhuV6pOm2613OdnMemkKg6z5tznHt21b0wer+Jw3SSaroeMwY9323DBMGc+x86d5n+IWd6ROho/WKmbFXfTtohWcx4fCd7Rv8JoDLBhXNazq1c/+SMi8lq+umZo4ptUErIPk7O9fifKDo7jAo7sp4LBrGYpbbUFYJ5D3EvF9UuFWk8qMx70N0e+3EszPttQqyeS/MZyiaVUsbnmdapSIO1uN+DKIG118jguGhNVC73k7DDpdnyqy5uZZ1w/25dHjhQOKEkhQw==





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 AUTONOMA 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

JESUS ENRIQUE JIMENEZ FERRER | Fecha:2021-02-22 07:16:58 | Firmante
hBkU3fCpImSAX7SLyn48hYrTSgBS0jUzjMwKELbIP3CU8ArQryLfuAtaEtXOOnbWwVfiG YdyOR2X S4C9lh46v0PBH Yw0S GCJDJegzBHXgt09SL+8+J2yOzUpTSP+Z21fVwVzJI
miNJgJaqqGnFFA3o7G1TOqTRmdtW08CPg7aD1TTaP88WC+xDKkLLhQJ2aMbc+ALuxtqdY1hy7lQZ7Lo0kClpwDHXhDhVgb9OK3VM13wUtH3Pk9Kbt/dbGTCi6Wali4qbH1u3N
/4pJdU9jRX72klus4tluTgQVWEqJehAU71rwZTnhbZi4Gc9xJnkHF46eDAARUDvapejOrX3ZPmw==

GABRIELA BELEN MARTÍNEZ HERNÁNDEZ | Fecha:2021-02-22 08:43:57 | Firmante
xthjlrz7DkGkMw4NIq+97PtLJKnB\$1fNLuhwASZGqIDn5eToGQCDBS8n6CXnRZF AEOercXw8TFfuWKNRjZHDloModGW38BX+ccJUL4x3f6Cq4zMtY3GLX5qvv5GMzulHwgh9uJl
/36euE89jiRq24KP4mS3cCwHze3iMixqdscf7ehTAHm7JSGGoDMGmSf0ZTsP07+371YFR9Jt2oa9cpc/ySJ1/sO1u7BuKfyDXdwSHD4tAETUABh7vPxSn5nn00bjdw9iZdd9XI/1P
+9BfzpdvbgmkajAgYp/79K118J8tObGP9zKE52niMPLbQ/gHYj4HJhpSmzpN5K5g==

NAYELI MONTERROSAS BRISSON | Fecha:2021-02-26 07:35:53 | Firmante
TsMzmR40bJoEplRatqVEcxDo0UsDQVeiNiJyN2M7cUHycl6A0arTdxG02m4chPjgFemvkqc2vUAg50qmo8owHvquetylCKVnlgNSvYPZ5mToob/giu5qttFTd8TD P+QNNuD7552
ss05Vuz5529WrgfuTNMq0DdgNkRwYXDu+thCr1wFhoTLsc1RxeUmVsettYNu/aVNI8ToCLqOEdTZI2JtQhOJ7ES/v+jEAQRBe8fQWaaahM QpbXiNjIsIFDoCTFYdL8mHJuKcn
7Y+TtxhW/Hiy5Z2K5+3EN4i3CxxTEZC0PwauvE0i6lt4AAmsromPXfI0A067S FmjiSkeTimbzg==



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

Im03Ks

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/RZhk27031hFvSY9THToHoduJQJEv86k

