
ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE EXTRACTOS Y FRACCIONES DE *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* Y *Physalis peruviana* EN LOS MODELOS EDEMA AURICULAR POR TPA, EDEMA PLANTAR POR CARRAGENINA Y ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO

María Cristina González Guevara¹
Luis Fernando Ospina Giraldo²
Javier Rincón Velandia²

RESUMEN

Introducción. El empleo etnofarmacológico de plantas en el manejo de procesos inflamatorios crónicos y la necesidad su caracterización farmacológica, promueven la evaluación de actividad antiinflamatoria de sustancias en modelos *in vivo*.

Materiales y métodos. Evaluación de extractos y fracciones de *Calea prunifolia* (CP), *Curatella americana* (CA), *Myrcianthes leucoxila* (ML) y *Physalis peruviana* (PP) sobre los modelos edema auricular por acetato de tetradecanoilforbol (TPA) en ratón albino ICR y edema plantar por carragenina en ratas Wistar, seleccionando un extracto para valorar su actividad antiartrítica en el modelo artritis inducida por colágeno en ratones DBA.

Resultados. Las fracciones con mayor porcentaje de inhibición del edema en el modelo edema auricular por TPA fueron ML etanólica total (82±6%), CP rica en terpenos (81±6%) y CA rica en terpenos (81±7%) (P<0,05). No se obtuvo actividad antiinflamatoria significativa sobre el modelo edema plantar por carragenina. Se evaluó la actividad antiartrítica de la fracción rica en terpenos de ML sobre el modelo artritis inducida por colágeno, sin encontrarse efecto significativo sobre edema de patas traseras, peso

corporal, escala histopatológica de severidad de artritis ni inmunohistoquímica para factor de necrosis tumoral alfa (P>0,05).

Discusión. La actividad antiinflamatoria en el modelo de inflamación aguda edema auricular por TPA para los extractos y fracciones de CP, CA y ML se puede relacionar con la afectación de mediadores relacionados con fosfolipasa A2 dado el nivel de efecto similar a indometacina encontrado. La fracción terpénica de ML no mostró actividad antiartrítica ni modificó la expresión de TNF- α en el modelo de artritis crónica autoinmune empleado, por lo cual no posee actividad inmunomoduladora ni antiinflamatoria en la dosis evaluada.

Conclusión: Las fracciones terpénicas de los extractos de CA y CP y los extractos metanólicos de ML mostraron una actividad antiinflamatoria significativa en el edema auricular inducida por TPA. Estos extractos tuvieron poca actividad sobre el edema inducido por carragenina en la pata. La fracción terpénica del extracto ML no presentó actividad antiartrítica en el modelo de artritis inducido por el colágeno

Palabras clave: actividad antiinflamatoria, artritis inducida por colágeno, edema plantar por carragenina, *Calea prunifolia*, *Curatella americana*, *Myrcianthes leucoxila*, *Physalis peruviana*.

¹ M.D. M.Sc. Profesora Asistente, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. Dirección postal: Avenida Carrera 30 No. 45-03. Ciudad Universitaria, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Edificio 450, Oficina 215. Teléfonos: 3165000 Ext. 14622. Fax: 3165060.

² Q.F. Ph.D. Profesor Asociado, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia.

ANTIINFLAMMATORY ACTIVITY OF EXTRACTS AND FRACTIONS OF *Myrcianthes leucoxila*, *Calea prunifolia*, *Curatella americana* Y *Physalis peruviana* OBTAINED FROM ON TPA-INDUCED EAR OEDEMA, CARRAGEENAN-INDUCED PAW OEDEMA AND COLLAGEN-INDUCED ARTHRITIS

ABSTRACT

Introduction. Ethnopharmacological use of plants in management of chronic inflammatory diseases and the need to have their pharmacological characterization promote the evaluation of anti-inflammatory activity over *in vivo* models.

Materials and methods. Evaluation of extracts and fractions of *Calea prunifolia* (CP), *Curatella americana* (CA), *Myrcianthes leucoxila* (ML) and *Physalis peruviana* (PP) on auricular edema by tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-in ICR albino mice and carrageenan-induced leg edema in Wistar rats selecting an extract to evaluate its anti-arthritis activity in collagen-induced arthritis model in DBA mice.

Results. The fractions with greater edema inhibition percentage on TPA-induced ear edema included whole ethanolic fraction of ML (82±6%), CP terpenes rich fraction (81±6%) and CA terpenes rich fraction (81±7%) (P<0.05).

Significant antiinflammatory activity was not obtained on the carrageenan-induced leg edema. Evaluation of antiarthritic activity of the ML terpenes rich fraction was carried out on collagen induced arthritis. Without finding any significant effect on back leg edema, corporal weight, arthritis histopathology severity scale or immunohistochemical tumoral necrosis factor alfa immunohistochemical evaluation (P>0.05).

Discussion. Anti-inflammatory activity in TPA-induced acute ear edema model for CP, CA, and ML extracts and fractions can be interfered by phospholipase A2 related mediators due to similar effect with indomethacin was found. The ML terpenes rich fraction neither show any anti-arthritis activity nor affected TNF- α expression on the autoimmune chronic arthritis model used, reason why it does not have immunomodulatory/anti-inflammatory effect on the evaluated dose.

Conclusion. CA and CP terpenic rich fractions and ML ethanol extract showed significant anti-inflammatory activity in TPA-induced ear edema. They did have some activity in carrageenan-induced leg edema. The ML terpenic rich fraction did not have anti-arthritis activity in the collagen-induced arthritis model

Key words: anti-inflammatory activity, collagen-induced arthritis, carrageenan-induced paw oedema, *Calea prunifolia*, *Curatella americana*, *Myrcianthes leucoxila*, *Physalis peruviana*.

INTRODUCCIÓN

El manejo farmacológico actual disponible para la artritis reumatoidea (AR) presenta, entre otras características, respuesta no predecible entre pacientes frente a los fármacos antirreumáticos modificadores de enfermedad (FAME), riesgo de reacciones adversas, y alto costo (1). Debido a lo anterior, se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas y/o complementarias para dicha entidad, dentro de las cuales están

los productos derivados de fuentes naturales (2, 3). Teniendo en cuenta la diversidad vegetal colombiana y el empleo etnofarmacológico de sustancias obtenidas de fuentes naturales para diversas patologías, entre ellas procesos inflamatorios crónicos, se hace necesaria su evaluación en modelos biológicos. Dentro de las plantas de uso común para dichas entidades se encuentran: *Calea prunifolia*, *Curatella americana*, *Myrcianthes leucoxila* y *Physalis peruviana* (4), sobre las cuales se ha descrito en trabajos

previos actividad antiinflamatoria, antioxidante e inmunomoduladora (5, 6, 7, 8, 9, 10). Se considera necesario como complemento de la caracterización de actividad biológica, la valoración de la capacidad antiartrítica en modelos de inflamación crónica, para lo cual la literatura describe diversas metodologías en murinos (11, 12), dentro de las cuales se encuentran modelos espontáneos e inducidos de artritis. Dentro de estos últimos, se incluye el modelo artritis inducida por colágeno (Collagen-induced arthritis, CIA), descrito en 1977 por Trentham y cols. en ratas y en 1980 por Courtenay y cols. en ratones (13), el cual se caracteriza por la inducción de una reacción inmunológica frente a componentes del cartílago articular al aplicar colágeno II (CII) (homólogo o heterólogo). La susceptibilidad al modelo varía según la cepa de roedor, siendo la cepa de ratón DBA una para las que se describe alta respuesta artrítica (13). El modelo CIA presenta similitud en cuanto a fisiopatología y curso clínico con AR en humanos y es útil en la evaluación de sustancias con actividad inmunomoduladora, entre otras ventajas (14, 15, 16).

Para continuar la caracterización de la actividad antiinflamatoria de productos obtenidos de plantas colombianas, el presente estudio evaluó sobre los modelos edema auricular inducido por 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (EATPA) en ratón y edema plantar por carragenina en rata (EPC), extractos y fracciones de *C. prunifolia*, *C. americana*, *M. leucoxila* y *P. peruviana*. Sobre dichos resultados, se seleccionó el extracto con potencial efecto antiinflamatorio para la valoración de su actividad antiartrítica en el modelo artritis inducida por colágeno en ratón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Calea prunifolia (CP): se evaluó el extracto etanólico total, fracción rica en flavonoides y fracción rica en terpenos, obtenidos de partes aéreas.

Curatella americana (CA): se evaluaron una fracción rica en flavonoides y otra rica en terpenos, obtenidas de corteza.

Myrcianthes leucoxila (ML): se evaluó el extracto etanólico total y una fracción rica en terpenos.

Physalis peruviana (PP): se evaluó el extracto etéreo total A y su fracción primaria EtOH-H₂O D, obtenidas previamente por Franco y cols. (6).

Modelos evaluados

Edema auricular inducido por TPA en ratón (EATPA)

Se emplearon ratones albinos ICR machos de 28 a 40 g, entre siete a diez semanas (n = 6-10), suministrados por el Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia (DFUNC), mantenidos en condiciones estándar. Se administró el irritante 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA, 2,5 µg/oreja) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) junto con indometacina 500 µg/oreja como patrón (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) o con la sustancia evaluada (fracción o extracto 500-1000 mg/oreja) disueltas en acetona (Mallinckrodt Chemicals) vía tópica en la oreja derecha (volumen total: 20 µL/oreja, 10 µL/cara). La oreja izquierda se empleó como control. Transcurridas 4 horas se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvo muestra de cada pabellón auricular por sacabocado (7 mm de diámetro) (17). Se calculó la diferencia de peso entre oreja tratada y no tratada [Delta de peso (mg) = Δ peso (mg) = peso tratada - peso no tratada]. Finalmente se expresaron los resultados como porcentaje de inhibición del edema calculado con la fórmula:

% de inhibición: $100 * (\Delta \text{ peso grupo control} - \Delta \text{ peso tratamiento}) / (\Delta \text{ peso grupo control})$.

Se considera como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 35 al 65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65%.

Edema plantar por carragenina (EPC)

Se emplearon ratas Wistar hembras, peso entre 100-320 g, 7 a 14 semanas de edad (n = 6-10) suministradas por el DFUNC. Previo ayuno de 12 horas, se administró vía oral el tratamiento a evaluar (patrón indometacina) (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) 10 mg/kg; sustancia a evaluar (extracto o fracción 250 a 1000 mg/kg); vehículo (glicerina, propilenglicol, tween 80 y solución salina normal) (17). A la hora se administra carragenina λ al 3% como agente inductor de inflamación (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA) suspendida en solución salina (0,1 ml) en la pata trasera derecha. Se realiza la evaluación del efecto en la primera, tercera y quinta horas tras la aplicación del irritante mediante la determinación del desplazamiento de volumen que producen las patas de los animales en el pletismómetro digital (Ugo Basile 7140). Se calcula la diferencia de desplazamiento entre la pata derecha irritada (tratada) con la izquierda (no tratada). Los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del edema aplicando la fórmula (siendo V desplazamiento de volumen):

$$\% \text{ de inhibición} = 100 * [(V_t - V_{nt}) \text{ grupo control} - (V_t - V_{nt}) \text{ tratamiento}] / (V_t - V_{nt}) \text{ grupo control}.$$

Se considera como actividad antiinflamatoria moderada la inhibición del edema del 30 al 65% y como buen efecto antiinflamatorio un valor mayor de 65%.

Artritis inducida por colágeno (CIA)

Animales de experimentación: ratones DBA/1 machos (Harlan Sprague Dawley, Inc, Chicago, IL, USA) de 10 a 11 semanas al inicio de la inducción de la artritis, previa cuarentena, mantenidos en el bioterio del DFUNC en condiciones estándar, con la administración de la comida empleada por el proveedor de los animales (Global 18% Sterilizable Rodent Diet. Cod. 1304, lote No. 010108, Harlan Teklad, Madison, WI, USA).

Preparación del antígeno: se disolvió el CII (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA, cód. C9301) en ácido acético 10 mM a una concentración de 4 mg/ml (100 μ g de CII) para la inmunización inicial y de 2 mg/ml para el refuerzo mediante agitación continua durante un periodo de 8 horas a 4°C. Se preparó el adyuvante completo de Freund (Complete Freund's adjuvant, CFA) mediante la molida de 100 μ g de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Becton Dickinson Diagnostic Systems ® MD, USA. Código. 231141) en mortero y su mezcla con adyuvante incompleto de Freund (Incomplete Freund's adjuvant, IFA, Becton Dickinson Diagnostic Systems ® MD, USA, Codigo. 263910) hasta una concentración final de 4 mg/ml. Posteriormente, se preparó la emulsión de CII/CFA para la inmunización y de CII/IFA para el refuerzo (13).

Protocolo de inmunización: se realizó vía intradérmica en la base de la cola. El día cero se inyectaron 50 μ L de la emulsión del antígeno (CII/CFA, 100 μ g de CII) y se administró dosis de refuerzo en la semana 6 de la emulsión CII 50 μ g en IFA (13Rosloniec) a un lote de 40 ratones.

Administración de sustancias a evaluar: durante las ocho semanas de inducción se evaluó el desarrollo de artritis mediante la escala visual de severidad de artritis (16) para cada extremidad (0 si no hay evidencia de edema ni eritema; 4 si eritema y edema severo alrededor del tobillo, pata y dedos). En la semana 9 se distribuyeron al azar los animales que presentaron signos de artritis en grupos, para la administración oral diaria durante dos semanas de la fracción seleccionada (ML fracción rica en terpenos disuelta en vehículo, 100 mg/kg) con grupo patrón blanco y control vehículo (coprecipitado de polivinilpirrolidona (PVP) (1:4), glicerina, polietilenglicol y tween), dando por terminado el estudio en la semana 10.

Parámetros de evaluación de actividad antiartrítica

Desplazamiento de volumen de patas traseras: se empleó pletismómetro digital (Ugo Basile 7140) para cuantificar el desplazamiento de la solución

conductora contenida en el receptáculo donde se introduce la pata sumergida, hasta que el tobillo estuviera a la altura de la línea inferior impresa en el receptáculo. Se midió el volumen de las dos patas por duplicado. El grado de desplazamiento de volumen se relaciona con el grado de edema de cada pata. Se registraron datos previos al inicio de la administración de extractos, y luego cada dos días durante la administración de las sustancias evaluadas. Los resultados se expresaron como desplazamiento volumétrico (mL).

Peso corporal: cada dos días se registró el peso corporal en la balanza de platillo externo (Triple Beam Balance OHAUS®).

Evaluación histopatológica: una vez finalizado el periodo de administración y evaluación de actividad antiartrítica (semana 10), se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se obtuvieron muestras de patas mediante disección siguiendo el protocolo de manejo y envío de muestras del Laboratorio de Patología, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia. El material para estudio histopatológico se fijó en formalina bufferada al 4%, se realizó procesamiento automatizado del tejido en procesador automatizado de tejidos Citadel 2000®, con deshidratación mediante alcohol etílico en concentración ascendente, aclaramiento con xilol e imbibición en parafina de punto de fusión controlado (56 a 58 grados centígrados) y posterior inclusión y corte del tejido para obtener láminas histológicas de 3 a 4 micras de espesor que se colorearon con hematoxilina-eosina. El material se montó en medio resinoso y se interpretó con un microscopio óptico Nikon YS100.

Inmunohistoquímica para TNF alfa: se empleó un anticuerpo policlonal anti-factor de necrosis tumoral elaborado en conejo. Se realizaron cortes de los bloques de parafina en láminas cargadas, recuperación antigénica mediante el uso de calor, bloqueo de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno al 3% en metanol, incubación del tejido con el anticuerpo primario por una hora y lavados con buffer fosfato de

pH 7. El sistema de visualización utilizado fue el cromógeno aminoetil carbazol. Se realizó contraincubación con hematoxilina de Mayer y se montó en medio resinoso. Se montaron paralelos a todo el procedimiento los correspondientes controles positivos y negativos de la técnica. La interpretación de la inmunoreactividad se hizo con un microscopio óptico Nikon YS100 estableciendo el tipo de célula presente.

La evaluación histopatológica e inmunohistoquímica se realizó por un patólogo experimentado quien realizó una lectura ciega del material histológico, usando una escala semicuantitativa mediante cuatro parámetros: infiltración de células inflamatorias, hiperplasia sinovial, daño de cartílago y erosión ósea (0: ausente, 1: leve, 2: moderada, 3: severa).

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm desviación estándar. Para los datos de delta de peso de orejas (EATPA) y delta de volumen de patas (EPC), se realizó análisis de varianza univariado seguido de prueba Tukey para comparaciones múltiples. Respecto a parámetros del modelo CIA, para comparar los cambios dependientes del tiempo para el desplazamiento volumétrico de patas traseras y peso corporal, se empleó el análisis de varianza de medidas repetidas que evalúa tanto el efecto del tiempo (día de medición) como el efecto de las sustancias evaluadas, con posterior prueba de Tukey de comparaciones múltiples. El puntaje histopatológico se analizó con estadística no paramétrica (prueba de Kruskal-Wallis). Se consideraron valores $P < 0,05$ como significativos. Los datos fueron analizados empleando el programa SPSS 18.0®.

Consideraciones éticas

Todos los experimentos se realizaron cumpliendo con los requerimientos acerca del empleo de animales con fines experimentales en la legislación colombiana vigente y con la normativa de la Universidad Nacional de Colombia.

RESULTADOS

En el modelo EATPA en ratón, los extractos con mayor actividad antiinflamatoria fueron ML etanólica total, CP terpenos y CA terpenos (Tabla 1), confirmando dicha actividad en un tercer ensayo obteniéndose similar actividad antiinflamatoria (alrededor del 81% de inhibición). Para el modelo EPC en rata, los extractos evaluados no mostraron actividad antiinflamatoria significativa al comparar con vehículo ($P > 0,05$). La fracción que mostró el menor desplazamiento de volumen correspondió a ML fracción rica en terpenos en la quinta hora (Δ volumen = 242 ± 23), aunque no presentó diferencias significativas respecto al control vehículo (Δ volumen = 370 ± 57). Esta fracción fue seleccionada para evaluación sobre el modelo

CIA. La incidencia de artritis (% de animales que dentro de cada grupo desarrolló cualquier signo de artritis sin importar la severidad) en la semana 8 después de la primera inmunización fue de 50% (20 de 41). Durante las dos semanas de evaluación de actividad antiartrítica, no se observaron diferencias significativas en el desplazamiento de volumen de patas traseras ni en el peso corporal entre tratamientos ($P < 0,05$).

El análisis histopatológico presentó puntajes sin diferencia significativa entre tratamientos (ver Tabla 2) al igual que la tinción para TNF alfa por inmunohistoquímica, la cual evidenció inmunorreactividad en macrófagos, fibroblastos y algunas células endoteliales presentes en los cortes respectivos.

Tabla 1. Actividad antiinflamatoria sobre el edema auricular inducido por 13-acetato de 12-tetradecanoilforbol (TPA) en ratón.

SUSTANCIA	DOSIS ($\mu\text{g}/\text{oreja}$)	Delta de peso (mg)	% de inhibición
ENSAYO 1			
Vehículo		17 \pm 3	NA
Indometacina	500	6 \pm 1*	67 \pm 7
<i>Physalis peruviana</i> , fracción D	500	13 \pm 1*	24 \pm 6
<i>Physalis peruviana</i> , fracción A	500	13 \pm 1*	22 \pm 4
<i>Myrcianthes leucoxila</i> , terpenos	500	11 \pm 1*	36 \pm 5
<i>Myrcianthes leucoxila</i> , etanólica	1000	10 \pm 1*	45 \pm 6
<i>Calea prunifolia</i> , etanólica	1000	13 \pm 1*	26 \pm 4
ENSAYO 2			
Vehículo		19 \pm 3	NA
Indometacina	500	7 \pm 2*	63 \pm 8
<i>Calea prunifolia</i> , flavonoides	1000	16 \pm 1	14 \pm 3
<i>Calea prunifolia</i> , terpenos	1000	8 \pm 2*	58 \pm 11
<i>Curatella americana</i> , flavonoides	1000	13 \pm 2*	30 \pm 8
<i>Curatella americana</i> , terpenos	1000	8 \pm 2*	59 \pm 9
ENSAYO 3			
Vehículo		15 \pm 3	NA
Indometacina	500	3 \pm 1*	81 \pm 7
<i>Calea prunifolia</i> , terpenos	500	3 \pm 1*	81 \pm 6
<i>Curatella americana</i> , terpenos	500	3 \pm 1*	81 \pm 7
<i>Myrcianthes leucoxila</i> , etanólica	500	3 \pm 1*	82 \pm 6

Ensayo 1 y 2 n = 6. Ensayo 3 n = 10. Datos expresados como media \pm D.S. w

* Test de Tukey significativo ($P < 0,05$) al comparar con control (vehículo). NA: no aplica.

Tabla 2. Puntaje histopatológico e inmunohistoquímico para TNF alfa en cortes de articulación de ratones con artritis inducida por colágeno.

PARÁMETRO HISTOLÓGICO*	Vehículo	ML terpénica (100 mg/kg)	Blanco
Infiltración células inflamatorias	2±1	2±2	0±0
Hiperplasia sinovial	1±1	1±1	0±0
Tejido de granulación	1±1	1±1	0±0
Daño del cartílago	1±1	1±1	0±0
Erosión ósea	1±1	1±1	0±0

Los ratones recibieron vía oral el tratamiento durante 15 días después de la instauración del proceso artrítico. n = 4-5. * Cada parámetro histopatológico se valoró siguiendo una escala de severidad de 0 (ausente) a 3 (severo), evaluación realizada por un patólogo ciego al tratamiento de cada espécimen. Los valores correspondientes tanto a la tinción por hematoxilina-eosina como por TNF alfa por inmunohistoquímica son similares. Datos presentados como media ± desviación estándar. No diferencias significativas según Kruskal-Wallis. ML: *Myrcianthes leucoxila*.

DISCUSIÓN

Los extractos de CA y CP ricos en terpenos y ML etanólico, mostraron buena actividad antiinflamatoria en el modelo EATPA similar a lo referido en estudios previos (9, 10, 18) en un rango comparable a la indometacina. La aplicación de TPA en la oreja de ratón se relaciona con activación de fosfolipasa A2, producción de prostaglandinas y leucotrienos (17, 19), mediadores que podrían intervenir en el efecto hallado para dichos extractos. En estudios previos sobre CA se refiere la presencia de triterpenos con capacidad captadora de radicales libres (8). Se ha comunicado para otras especies de *Calea* la presencia de sesquiterpenlactonas, que podría estar relacionada con dicha actividad (9, 20). Asimismo, para otras especies de *Calea* se ha reportado actividad antiinflamatoria en otros biomodelos de inflamación aguda y subaguda

(21, 22). En relación a extractos etanólicos de ML se describe actividad antiinflamatoria en modelos de inflamación aguda (10), y actividad antioxidante e inhibidora de la vía clásica y terminal del sistema del complemento (23), mecanismos que podrían vincularse con el potencial antiinflamatorio/inmunomodulador de dichas sustancias.

Se ha descrito el perfil de mediadores implicados en cada fase para el modelo EPC, con liberación inicial de serotonina e histamina, en la fase intermedia predominio de cininas y con participación de prostaglandinas en la tercera fase (18). La literatura reporta para otras especies de *Calea* actividad importante sobre este modelo (21, 22). En el presente estudio, ninguna de las sustancias evaluadas mostró actividad antiinflamatoria. El extracto que mostró la mayor actividad, aunque no significativa, en la quinta hora correspondió a la fracción terpénica de ML, la cual se consideró que por su mayor concentración en terpenos tendría un mayor potencial antiinflamatorio y fue evaluada en el modelo CIA.

En el modelo CIA se observó una incidencia de artritis menor y más tardía a la reportada en la literatura (13, 24, 25), a pesar del seguimiento del protocolo usualmente empleado para la inducción de CIA, que incluyó en el desarrollo de este estudio aspectos como empleo de una cepa de ratón susceptible, tipo de CII, protocolo de inmunización, condiciones de

mantenimiento de los animales, entre otros. La severidad de artritis clínica y de inflamación tisular, no se afectó frente a la administración diaria de 100 mg/kg de la fracción terpénica de ML. No se encontraron reportes de evaluación sobre modelos de artritis crónica en las fuentes consultadas para ML. La literatura refiere que el modelo CIA tiene como ventaja especial el ser empleado para la evaluación de inhibidores de citoquinas, que han incluido evaluación de inhibidores de interleucina 1 (IL-1), IL-4 y factor de necrosis tumoral (TNF), entre otros (16), constituyéndose en uno de los modelos base de evaluación de potenciales antiartríticos para el empleo en humanos de terapias biológicas en AR, al demostrarse que el bloqueo de TNF- α e IL-1 β disminuye la severidad clínica e histológica de la enfermedad en otros estudios (26). En el presente estudio, la expresión tisular de TNF- α no fue afectada por el extracto de ML, demostrando que no posee actividad inmunomoduladora frente a esta citoquina en el modelo de artritis autoinmune empleado.

CONCLUSIÓN

Este estudio demostró actividad antiinflamatoria en el modelo EATPA de las fracciones ricas en terpenos de CP, CA y fracción etanólica total de ML. No mostraron las muestras evaluadas actividad sobre el modelo edema plantar por carragenina, y la fracción terpénica de ML no presentó efecto antiartrítico sobre el modelo artritis inducida por colágeno en ratón.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se desarrolló como parte de las actividades del proyecto de investigación: "Estudio farmacológico de posibles antiartríticos de origen natural en un modelo murino", financiado por la División de Investigación de Bogotá de la Universidad Nacional de Colombia (UNC) (Proyecto QUIPU 20301007495).

REFERENCIAS

1. Van Vollenhoven RF. Treatment of rheumatoid arthritis: state of the art 2009. *Nat Rev Rheumatol* 2009 Oct; 5(10):531-41.
2. Patwardhan B, Gautam M. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. *Drug Discov Today* 2005 Apr 1; 10(7):495-502.
3. Zhang P, Li J, Han Y, Yu XW, Qin L. Traditional Chinese medicine in the treatment of rheumatoid arthritis: a general review. *Rheumatol Int.* 2010 Apr; 30(6):713-8. Epub 2010 Mar 5.
4. García Barriga H. Flora Medicinal Colombiana. Botánica médica. Colciencias; 1975. Tomo II, p. 207, 303. Tomo III, p. 33, 83, 303.
5. Rodríguez M, Vergel N, Ospina LF, Calle J y Pinzón R. Evaluación de actividades enzimáticas elastasa y mieloperoxidasa como marcadores de degranulación leucocitaria en modelos de inflamación aguda. *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.* 2004; 34: 35-45.
6. Franco LA, Matiz GE, Calle J, Pinzón R, Ospina LF. Actividad antiinflamatoria de extractos y fracciones obtenidas de cálices de *Physalis peruviana* L. *Biomédica* 2007; 27:110-5.
7. Martínez W, Ospina LF, Granados D, Delgado G. *In vitro* studies on the relationship between the anti-inflammatory activity of *Physalis peruviana* extracts and the phagocytic process. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2010 Mar; 32(1):63-73.
8. Duarte E, Castañeda JA. Estudio fitoquímico y de la actividad inmunomoduladora de las fracciones más activas obtenidas del extracto etanólico de la corteza de *Curatella americana* (Tesis). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2003.
9. Ospina LF, Cardozo CM, Mora AC, Calle J, Pinzón R. Screening de actividades antioxidante y antiinflamatoria de plantas medicinales colombianas. En: Fresquet JL, Aguirre CP, eds. 5º Coloquio Europeo de Etnofarmacología - El Mestizaje cultural en etnofarmacología: de los saberes indígenas a los científicos. *Revista de Fitoterapia* 2005; 5(Supl.1): 212.
10. González MC, Ospina LF, Calle J, Rincón J. Evaluación de extractos y fracciones de plantas colombianas en modelos de inflamación aguda, subcrónica y crónica *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.* 2007; 36(2):166-174.
11. Kerwar SS, Oronsky AL. Rheumatoid arthritis, experimental models. In: Roitt IM, Delves PJ, eds. *Encyclopedia of immunology*. London: Academic Press; 1992. p. 1332-36.
12. Crofford LJ, Wilder RL. Arthritis and autoimmunity in animals. In: McCarty DJ, Koopman WJ, eds. *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology*. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p. 525-531.
13. Rosloniec EF, Cremer M, Kang A, Myers LK. Collagen-induced arthritis. In: *Current protocols in immunology*. New York: John Wiley and Sons; 1996. p. 15.5.1-15.5.24.
14. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.* 1997; 61(19):1861-78.
15. Holmdahl R, Bockermann R, Bäcklund J, Yamada H. The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice- a model for rheumatoid arthritis. *Ageing Res Rev* 2002 Feb; 1(1):135-47.
16. Wooley PH. The usefulness and the limitations of animal models in identifying targets for therapy in arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2004 Feb; 18(1):47-58.

17. García MD, Fernández MA, Álvarez A, Sáenz MT. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. ozua (Mirtaceae). *J Ethnopharmacol* 2004 Mar; 91(1):69-73.
18. Alexandre-Moreira MS, Piuvezam MR, Araújo CC, Thomas G. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. *J Ethnopharmacol* 1999 Nov 1; 67(2):171-7.
19. Hernández V, Recio MC, Máñez S, Giner RM, Ríos JL. Effects of naturally occurring dihydroflavonols from *Inula viscosa* on inflammation and enzymes involved in the arachidonic acid metabolism. *Life Sciences* 2007; 81:480-8.
20. Bork PM, Schmitz ML, Kuhnt M, Escher C, Heinrich M. Sesquiterpene lactone containing Mexican Indian medicinal plants and pure sesquiterpene lactones as potent inhibitors of transcription factor NF-KB. *FEBS Lett* 1997; 402:85-90.
21. Venegas-Flores H, Segura-Cobos D, Vázquez-Cruz B. Antiinflammatory activity of the aqueous extract of *Calea zacatechichi*. *Proc West Pharmacol Soc* 2002; 45:110-1.
22. Segura-Cobos D, Venegas-Flores H, Baiza-Gitman LA, Vázquez-Cruz B. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the methanol extract of *Calea zacatechichi* leaves and its fractions. *Pharmacologyonline* 2010; 2:1100-1110.
23. Garnica Monroy C. Contribución al estudio fitoquímico y de la actividad inmunomoduladora del extracto etanólico de las hojas de *Myrcianthes leucoxila* (Tesis). Bogotá, Colombia: Universidad Nacional de Colombia; 2004.
24. Shin SS, Jin M, Jung HJ, Kim B, Jeon H, Choi JJ, et al. Suppressive effects of PG201, an ethanol extract from herbs, on collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatology (Oxford)* 2003 May; 42(5):665-72.
25. Lin N, Liu C, Xiao C, Jia H, Imada K, Wu H, Ito A. Triptolide, a diterpenoid triepoxide, suppresses inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis mice. *Biochem Pharmacol* 2007 Jan 1; 73(1):136-46. Epub 2006 Sep 6.
26. Williams RO. Models of rheumatoid arthritis. In: Zollner T, Renz H, Asadullah K., eds. *Animal models of T cell-mediated skin Diseases*. Ernst Schering Research Foundation, Workshop 50. New York: Springer-Verlag; 2005. p. 105-107.