

INFLAMACIÓN Y PLANTAS MEDICINALES

Autores: MSc. Fernando Fernández Urquiza.

MSc. Magali Torres Fuentes

INTRODUCCIÓN

Las plantas no pueden dissociarse de la historia de la humanidad. Ya en la prehistoria aparecen la paja de las chozas, las fibras de la cuerda, de los textiles, los tintes, que le daban color y una gran cantidad de plantas medicinales. Los vegetales proporcionan comida, ropa, cobijo, materiales de construcción y medicamentos. Con dióxido de carbono, agua, sol y sales minerales; las plantas fabrican moléculas a veces tan complejas que ningún laboratorio es capaz de sintetizarlas (1).

Con el desarrollo de la botánica, la química, la medicina y la farmacia, los conocimientos acerca de las plantas medicinales se fueron sistematizando y ellas ocuparon un lugar destacado en las farmacopeas. Las plantas medicinales en esta etapa constituían un importante recurso natural, pues una buena parte de los medicamentos disponibles eran producidos a partir de estas.

Con el desarrollo de la síntesis química eran producidas por los laboratorios moléculas cada vez más complejas. Sustancias que anteriormente sólo podían obtenerse a partir de fuentes naturales eran obtenidas por semisíntesis o síntesis total. Además, se desarrollaron modificaciones estructurales a moléculas de origen natural incrementando así, su actividad biológica; de esta forma los medicamentos de origen sintético fueron desplazando a las plantas medicinales.

Sin embargo, a partir de la década del 70 en el mundo comienza a producirse un incremento del consumo de medicamentos de origen natural, sobre todo producidos a partir de plantas medicinales; por ejemplo, en Francia el consumo de plantas medicinales aumentó entre 1970 y 1986 de 12 500 a 30 000 toneladas, otros países que incrementaron el consumo fueron Hungría, Bulgaria, Yugoslavia, Polonia, España, Grecia, Turquía, Egipto, Argelia, Marruecos, Argentina y Brasil. (2)

El 28 de noviembre de 1977 se celebró en Ginebra la reunión sobre Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional auspiciada por la Organización Mundial de la Salud (OMS). En ella se destacó el interés que esta medicina despertaba y de igual forma se manifestó la 30^{ma} Asamblea Mundial de la Salud, en 1977, mediante la aprobación de la resolución 30,49. Esta reunión de expertos, que representa los principales sistemas de medicina tenía como meta elaborar un plan para su

promoción y desarrollo (3).

Dentro de las causas del auge obtenido por los medicamentos naturales están:

- El renacer del interés por la naturaleza y todo lo natural.
- El sentimiento de urgencia por la desaparición de la tradición de pueblos indígenas.
- Los medicamentos modernos son a menudo muy costosos y no están al alcance de todos.
- El rechazo de los tratamientos modernos cuando el pronóstico es desfavorable.
- La iatrogenia por el uso de medicamentos sintéticos de alta potencia.

Sin embargo, se debe considerar un aspecto muy importante que está relacionado con nuevos conocimientos científicos acerca del mecanismo de acción de los medicamentos herbarios que conceden a la fitoterapia una nueva dimensión, lo cual queda expresado en el planteamiento de Pellever. "Una especie vegetal no puede resumirse enumerando unos cuantos principios activos, porque en fitoterapia hay que tener en cuenta la planta en su totalidad. La acción de una droga jamás se debe únicamente a su componente principal debido a que además de los principios activos principales existen en la planta, los llamados principios activos adyuvantes que modifican la acción de los primeros" (4).

En la planta, se producen interacciones entre un grupo de principios activos que favorecen el efecto terapéutico. La clínica y la experimentación farmacológica demuestran que la acción de una planta no puede explicarse por uno de sus principios activos. La acción de la planta se debe a fitocomplejos donde están comprendidos los principios activos junto a moléculas aparentemente inactivas. Las características generales de los fitocomplejos son (5):

- Sus componentes aislados muestran una acción fisiológica, modificada, reducida, o anulada.
- Son entidades bioquímicas, dinámicas y unitarias con interrelaciones entre sus componentes.
- Las funciones biológicas de las diferentes moléculas son complementarias.
- Los fitocomplejos no pueden ser estudiados por el método analítico sin destruir la unidad.

Esto hace que los medicamentos producidos a partir de plantas medicinales tengan hoy día una gran demanda. La OMS estima que más del 80 % de la población

mundial los utiliza (6). Por tanto, las plantas medicinales vuelven a ser un recurso natural de gran importancia en la elevación del nivel de salud y por supuesto de la calidad de vida.

La inflamación es una señal de alerta al organismo sin embargo, la prolongación del proceso inflamatorio puede provocar daño a células y tejidos. En este trabajo se presentan los principales mediadores químicos de la inflamación, se destacan algunos de los metabolitos secundarios antiinflamatorios presentes en las plantas medicinales y su relación con los mediadores químicos de la inflamación. Además, se valoran algunos métodos para determinar actividad antiinflamatoria.

DESARROLLO

I.1. El proceso inflamatorio.

El proceso inflamatorio es una respuesta del organismo ante un estímulo. La misma tiene lugar en el tejido conjuntivo vascularizado e implica cambios vasculares, eventos celulares, y la producción de mediadores químicos de la inflamación. Todos estos componentes del sistema, están estrechamente vinculados. La inflamación presenta dos fases bien diferenciadas: aguda y crónica. La fase aguda se caracteriza por su breve duración, la exudación de líquido y de proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos, predominantemente neutrófilos. La fase crónica se caracteriza por la duración mayor, la presencia de linfocitos y macrófagos, la proliferación de vasos sanguíneos, la fibrosis y la necrosis (7).

En el proceso inflamatorio después de una breve contracción de las arteriolas se produce vasodilatación que es la causa del aumento de flujo sanguíneo que a su vez es causa de rubor y calor, y un incremento de la permeabilidad vascular. Como consecuencia de estos eventos vasculares se torna lenta la circulación que hace que los leucocitos se dirijan hacia la periferia, proceso conocido como marginación. Estos leucocitos marginados se sitúan sobre el endotelio vascular, lo que se conoce como rodamiento, se produce la adhesión leucocitaria y posteriormente, la trasmigración que es el proceso mediante el cual los leucocitos (fundamentalmente neutrófilos en la inflamación aguda) abandonan la circulación mediante diapédesis (7).

Una vez fuera del sistema vascular se produce el fenómeno de quimiotaxis, migrando los leucocitos hacia la zona de lesión. Los factores quimiotácticos pueden ser exógenos o endógenos. Entre los exógenos están los productos bacterianos como los péptidos; entre los endógenos están los componentes del complemento,

productos de lipoxigenasa y las citoquinas.

En la zona de lesión, diversos factores favorecen la activación leucocitaria como las sustancias quimiotácticas en concentraciones elevadas, la fagocitosis y complejos antígeno-anticuerpo. La activación leucocitaria se caracteriza por la producción de metabolitos del ácido araquidónico (AA) debido al incremento de la actividad de fosfolipasa A₂ (FLA₂) por diacilglicerol (DAG) y calcio, generación de especies reactivas del oxígeno (ERO) y liberación del contenido lisosomal a causa de la lisis celular, lo cual conduce al daño celular y tisular.

La influencia de los mediadores químicos sobre el proceso inflamatorio es un tema objeto de intenso estudio. Los mediadores se originan del plasma o de las células, la mayor parte de ellos realizan su actividad biológica mediante unión a receptores. Un mediador químico puede actuar sobre uno o múltiples tipos de células dianas, la duración de su acción es corta y la mayor parte de ellos pueden producir efectos perjudiciales. Los mediadores más importantes hasta el momento son los siguientes:

La histamina es una amina producida por basófilos y células cebadas, estimulan su liberación la bradiquinina y las fracciones del complemento C3a y C5a. Se produce liberación de esta amina con una lesión celular inespecífica. Su acción es mediada por tres tipos de receptores (H1, H2 y H3) y como mediador químico del proceso inflamatorio estimula la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la adhesión leucocitaria (7).

La serotonina se encuentra en las plaquetas y células enterocromofines así como de los mastocitos de los roedores. Su liberación de las plaquetas se estimula cuando estas se agregan tras su contacto con el colágeno, la trombina, el adenosín difosfato (ADP) y los complejos antígeno-anticuerpo. Como mediador químico del proceso inflamatorio estimula la permeabilidad vascular (7).

Las prostaglandinas (PG) se producen a partir del AA, el cual es liberado de las membranas por la FLA₂. Se ha demostrado que la FLA₂ de tipo secretoria (FLA_{2s}), que es inducida, juega un papel importante en la inflamación. La expresión de esta enzima se incrementa con la activación del factor de transcripción nuclear kappa B (FNkB) (8-12).

La ciclooxigenasa es la enzima que actúa sobre el ácido araquidónico de la cual se conocen dos formas denominadas 1y2 (Cox-1 y Cox-2). La Cox-1 es constitutiva y la Cox-2 es inducida por citoquinas y factores de crecimiento. Se ha comprobado que la activación del FNkB está implicada en el incremento de la expresión de esta

enzima (13-16). El producto final de la cicloxigenasa es un endoperóxido (PGH_2) que por la acción de isomerasas es transformado en prostaglandinas. Su principal efecto sobre la inflamación es incrementar la vasodilatación por la PGE_2 y la PGD_2 .

La bradiquinina es un péptido que se produce a partir de dos proteínas que se sintetizan en el hígado. Diferentes proteasas provocan la formación de bradiquinina pero la calicreína es la específica. Las propiedades biológicas de la bradiquinina son mediadas por dos tipos de receptores B1 y B2. La bradiquinina como mediador químico de la inflamación estimula: la vasodilatación, la permeabilidad vascular, la liberación de interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral (FNT) por los macrófagos, promoción de la síntesis de prostaglandinas y dolor (7).

Los leucotrienos (LT) son eicosanoides (vía de la 5-lipoxigenasa). El leucotrieno B_4 (LTB_4) se obtiene por hidrólisis enzimática del leucotrieno A (LTA) en neutrófilos, eosinófilos, monocitos, macrófagos, células cebadas y queratinocitos. Las funciones del LTB_4 son: ligando de receptores celulares, adhesión leucocitaria, quimiotaxis, activación leucocitaria y aumento de la permeabilidad vascular.

Los leucotrienos C_4 , D_4 , y E_4 (LTC_4 , LTD_4 y LTE_4) se obtienen en polimorfonucleares (PMN), eosinófilos, monocitos, macrófagos, células cebadas y queratinocitos. El LTC_4 se obtiene por la adición enzimática de glutatión a LTA . El LTD_4 se obtiene a partir de LTC por adición enzimática de ácido glutámico. El LTE_4 se obtiene a partir de LTD por la eliminación enzimática de glicina, todo ello en las células ya nombradas. Estos provocan vasodilatación (7).

El factor activador de plaquetas (FAP) es un mediador bioactivo derivado de los fosfolípidos. Desde el punto de vista químico el FAP es una acetil-gliceril-éter-fosforilcolina. Realiza sus efectos a través de un receptor acoplado a proteína G. Diversas células como plaquetas, basófilos y mastocitos, neutrófilos, monocitos-macrófagos y células endoteliales pueden elaborar FAP en forma secretada y en forma intracelular. Sus efectos en la inflamación son: vasodilatación potente, aumento de la permeabilidad por contracción de las células del endotelio de las vénulas y es mil veces más potente que la histamina y la bradiquinina, factor quimiotáctico, estimula la adhesión leucocitaria (7).

IL-1 y $\text{FNT}\alpha$ son producidos por los macrófagos activados y por las células T activadas. La IL-1 es sintetizada además por monocitos, macrófagos, células de Langerhans, células gliales, astrocitos, células epiteliales, células endoteliales, células mesangiales glomerulares, PMN y linfocitos B. Debido a estímulos muy

diversos tales como microorganismos, activadores de macrófagos y complejos antígeno-anticuerpo. Su secreción puede estar estimulada por endotoxina, inmunocomplejos, toxinas, lesiones físicas y diversos procesos inflamatorios. Sus principales efectos en la inflamación son: aumento de la permeabilidad vascular y aumento de la quimiotaxis (7).

El óxido nítrico (NO) es un mediador pleiotrópico de la inflamación. Es sintetizado por las células endoteliales, macrófagos y grupos neuronales específicos del cerebro. El NO tiene un mecanismo de acción paracrino sobre las células dianas mediante la inducción de guanosín monofosfato cíclico (GMPc) que, a su vez, inicia una serie de acontecimientos intracelulares que dan lugar a una respuesta como la relajación de las células musculares lisas de la pared vascular. El NO se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular, nicotinamín adenin dinucleótido fosfato hidrogenado (NADPH) y otros cofactores por la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa. Se ha comprobado que la activación del FNkB está implicado en el incremento de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducida (NOSi) (17-21). El NO desempeña un papel importante en la función vascular durante las respuestas inflamatorias y provoca, aumento de la vasodilatación, la permeabilidad vascular y la quimiotaxis.

El sistema del complemento está constituido por 20 proteínas que aparecen inactivas en el plasma. Las funciones biológicas del complemento se incluyen en dos categorías generales: lisis celular por el complejo de ataque a membrana (MAC) y efectos biológicos de los fragmentos proteolíticos del complemento. El paso más importante para la realización de las funciones biológicas del complemento es la activación de su tercer componente C3a. La fragmentación de C3a ocurre por dos vías: una vía clásica que se inicia con la fijación de C1a a un anticuerpo unido a un antígeno y una vía alternativa que se puede activar por las superficies de los microorganismos.

Los factores liberados del complemento afectan a diversos fenómenos en la inflamación: fenómenos vasculares que se ven afectados por C3a y C5a y aumentan la permeabilidad vascular y producen vasodilatación principalmente mediante la liberación de histamina desde los mastocitos. C5a activa la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico en los neutrófilos y monocitos, adhesión leucocitaria, quimiotaxis y activación leucocitaria son fenómenos afectados por los factores liberados del complemento. En especial, C5a tiene un potente efecto

quimiotáctico para neutrófilos, monocitos, eosinófilos y basófilos (7).

Interleuquina 8 (IL-8) es una quimiocina que estimula la quimiotaxis y la activación leucocitaria, la activación del FNkB incrementa la expresión de esta quimiocina (7).

Las enzimas lisosomales contenidas en neutrófilos y monocitos pueden ser liberadas y contribuir a la respuesta inflamatoria, su liberación es consecuencia de la lisis celular. Los neutrófilos presentan dos tipos de gránulos: los gránulos específicos o secundarios y los gránulos azurófilos o primarios. Los gránulos específicos contienen lisozima, colagenasa, gelatinasa, lactoferrina, activador del plasminógeno, histaminasa y fosfatasa alcalina; los gránulos azurófilos contienen mieloperoxidasa, factores bactericidas (lisozima, defensinas), hidrolasas ácidas, proteasas neutras (elastasa, catepsina G, colagenasas inespecíficas y proteinasa (7).

Las proteasas neutras pueden degradar colágeno, membranas basales, fibrina, elastina, y cartílago dando lugar a la característica destrucción tisular de los procesos inflamatorios purulentos y deformantes. Los monocitos y los macrófagos contienen hidrolasas ácidas, colagenasa, elastasa, fosfolipasa, y activador del plasminógeno (7).

Peroxinitrito (Pn) se produce por la reacción de ERO y el NO (22). Se considera que está implicado en el síndrome de fatiga crónica, en desórdenes postraumáticos y que juega un papel significativo en el daño cerebral (22-26).

Los receptores de adhesión leucocitaria pertenecen a cuatro familias de moléculas: las selectinas, las inmunoglobulinas, las integrinas y las glucoproteínas de tipo mucina (7).

Las selectinas, cuya denominación se debe a que se caracterizan por presentar una región N-terminal extracelular relacionada con las lectinas de mamíferos fijadoras de azúcares son: E-selectina conocida como ELAM-1 que está confinada al endotelio, P-selectina conocida como GMP140 o PADGEM y que está presente en el endotelio y en las plaquetas, L-selectina conocida como LAM-1 y que está en la mayor parte de los tipos de leucocitos. Las selectinas se unen a las formas sialiladas de los oligosacáridos que, a su vez, están unidos de forma covalente a diferentes glucoproteínas de tipo mucina.

Las inmunoglobulinas son la molécula de adhesión endotelial intracelular tipo 1 (MAIC- 1) y la molécula de adhesión celular vascular de tipo 1(MACV-1).

Las integrinas son glucoproteínas heterodiméricas de adhesión transmembrana, y

que también actúan como receptores de la matriz extracelular. Las integrinas FA-1 y MAC-1 son receptores para la MAIC-1 y las integrinas $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4) y $\alpha 4\beta 7$ para la MACV-1 (8). Se ha demostrado que la transducción de señales mediadas por integrinas incrementa la expresión de la IL-1, incrementa la activación del FNkB generando mediadores de la inflamación, retarda el mecanismo de apoptosis en neutrófilos y favorece la quimiotaxis (27-33).

Molécula de adhesión plaqueta- célula endotelial (MACP-1) pertenece a la superfamilia de los genes codificadores de inmunoglobulinas y es una de las moléculas de adhesión homófilas que están presentes en las uniones intercelulares del endotelio y juega un papel importante en la transmigración a través de las uniones intercelulares.

Un elemento importante en el mecanismo molecular de la inflamación es el FNkB. La activación de esa familia de factores de transcripción juega un papel central en este proceso ya que conduce a la activación de genes proinflamatorios incrementando la expresión de citoquinas, Cox - 2, NOSi y FLA₂s (34).

Las especies reactivas del oxígeno (ERO) son especies químicas muy reactivas, a partir de las cuales se producen reacciones en cadena que provocan la alteración de biomoléculas, incrementan la peroxidación de los lípidos de membrana, dañan células y tejidos. Las especies reactivas del oxígeno son los radicales libres radical anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), y radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y las especies no radicales peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete (1O_2). Estas especies reactivas se forman en el organismo como parte de procesos metabólicos entre los que se encuentran: la cadena de transporte electrónico, la descarga respiratoria de los fagocitos, la reacción de la xantina oxidasa y el sistema enzimático del citocromo P₄₅₀. (35-38).

Cuando por determinadas razones los procesos de oxidación que generan radicales libres en el organismo se incrementan o disminuyen las defensas antioxidantes, se produce lo que se conoce con el nombre de estrés oxidativo (39). Este está vinculado a un grupo de enfermedades, de hecho la producción de radicales libres forma parte de la fisiopatología de las mismas entre las cuales se encuentran: Parkinson, Alzheimer, enfermedades cardiovasculares, daño por isquemia reperusión, choque circulatorio, insuficiencia cardíaca, aterosclerosis, diabetes, cataratas, daño por radiaciones, el síndrome de respuesta inflamatoria y envejecimiento (40-43).

Las ERO pueden ser liberadas al espacio extracelular por los leucocitos tras la exposición a agentes quimiotácticos, inmunocomplejos o estimulación fagocitaria. Su

producción depende de la activación del sistema oxidativo NADPH y provocan:

- aumento de la expresión de las citoquinas, las quimioquinas (IL-8) y de las moléculas de adhesión leucocitaria endotelial.
- Lesión de las células endoteliales con el aumento de la permeabilidad vascular provocado por el aumento de la producción de superóxido.
- La inactivación de antiproteasas.

La interacción entre especies reactivas y ciertas enzimas aumenta el repertorio de oxidantes. La mieloperoxidasa (MPO) de neutrófilos produce ácido hipocloroso, a partir de peróxido de hidrógeno y anión cloruro. La MPO de eosinófilos produce ácido hipobromoso, ya que utiliza selectivamente el ión bromuro a pesar de su baja concentración plasmática. Estas especies reaccionan entre ellas produciendo nuevos compuestos: el ácido hipocloroso que reacciona con las aminas para dar lugar a diversas cloraminas, que poseen una vida media mayor y la reacción entre el ácido hipobromoso y el peróxido de hidrógeno genera oxígeno singlete.

Se ha comprobado que el incremento de las ERO está relacionado con la activación del FNkB el cual es muy importante en la inflamación, ya que controla la transcripción de genes que codifican la expresión de IL-1, TNF- α , citoquinas, proteínas de la fase aguda, factores de crecimiento, y la expresión Cox-2, NOSi y FLA₂s (44-49).

I.2. Algunos metabolitos secundarios con propiedades antioxidantes, antiinflamatorias y analgésicas

Un amplio grupo de los metabolitos secundarios que se encuentran distribuidos en las plantas poseen actividad antioxidante y antiinflamatoria entre los que se encuentran: fenoles, flavonoides y esteroides.

Fenoles

En el reino vegetal hay una amplia gama de metabolitos secundarios que poseen núcleos fenólicos, sin embargo en este epígrafe se hará referencia a los fenoles sencillos, los cuales suelen encontrarse en forma de glicósidos. Dentro de las estructuras más representativas están: pirogalol, eugenol y los ácidos cafeico, cumárico, ferúlico, clorogénico, siríngico, vainillínico, gentísico y protoocatequínico.

Estos compuestos pueden reducir la formación de importantes mediadores de la inflamación ya que poseen propiedades antioxidantes, inhiben Cox-1 y Cox-2, inhiben la 5-LOX y la formación de NO (Tabla 1) (50-54).

Por ejemplo, el ácido cafeico posee propiedades antioxidantes y contribuye a reducir

el incremento de ERO, el cual es un mediador que causa daño celular y estimula la expresión de otros mediadores de la inflamación. Además, inhibe la producción de NO que incrementa la vasodilatación, y estimula la formación de IL-8. También inhibe la 5LOX reduciendo la producción de LTB₄.

Los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico gentísico, protocatequínico, siríngico e isovainillínico aislados del género *Scrophularia* inhiben de forma potente el edema inducido con acetato de tetradecanoil forbol (TPA) en la oreja del ratón y el inducido con carragenina en la pata de la rata (55.).

Tabla 1 Fenoles comunes en plantas medicinales y sus propiedades.

Fenoles	Propiedades
Pirogalol	Antioxidante, inhibidor de COX - 2
Eugenol	Antioxidante, inhibidor de COX - 2
Ácido cafeico	Antioxidante, inhibe la producción de NO, inhibe la 5 LO, captura peroxinitrito
Ácido cumárico	Antioxidante, inhibe la producción de NO
Ácido ferúlico	Antioxidante, inhibe la producción de NO
Ácido clorogénico	Antioxidante, captura peroxinitrito
Ácido siríngico	antioxidante
Ácido vainillínico	antioxidante
Ácido gentísico	Antioxidante, inhibidor de COX - 2
Ácido protocatequínico	Antioxidante,, inhibe NOSi

Los fenoles trihidroxilados como el pirogalol y el ácido gálico inhiben la liberación de histamina y el pirogalol y los orto y para difenoles como la hidroquinona y el catecol inhiben la producción de LTB₄ en neutrófilos (56-59).

Los fenoles además pueden tener efecto analgésico debido a que muchos de estos compuestos pueden inhibir la síntesis de prostaglandinas.

Flavonoides

Los flavonoides están presentes en casi cualquier vegetal superior y se les puede hallar en cualquier parte del vegetal (60). Estos compuestos presentan dos anillos de 6 miembros, denominados A y B, unidos por tres átomos de carbono (C₆-C₃-C₆). Es muy común que se forme un heterociclo de y pirona al cual se le denomina anillo C. La mayoría de los flavonoides naturales presentan algunos de estos 12 núcleos: flavona, flavonol, flavanona, flavanonol, isoflavona, catequina, antocianidina, leucoantocianidina, aurona, chalcona, dehidrochalconas y neoflavonas. Los flavonoides se encuentran comúnmente en forma de glicósidos. Los principales sacáridos que se encuentran unidos a estos metabolitos secundarios son: arabinosa,

galactosa, glucosa, ramnosa y xilosa. Los sacáridos pueden unirse a un carbono del flavonoide, y se les denomina C-glicósidos o pueden unirse a un hidroxilo del flavonoide y se les denomina O-glicósidos.

Estos metabolitos poseen propiedades antioxidantes, inhiben la Cox-2 y su expresión, inhiben la expresión de NOSi, inhiben la actividad de tirosinas quinasas y serín treonín quinasas, inhiben la fosfatidil inositol 3 quinasas (FI3Q) y la fosfatidil inositol 5 quinasas (FI 5Q) e inhiben la expresión de MAIC – 1 (Tabla 2) (61-80).

Tabla 2 Flavonoides comunes en plantas medicinales y sus propiedades

Flavonoides	Propiedades
Genisteina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi, inhibidor de tirosín y serín tronío quinasas,
Apigenina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi
Kanferol	Antioxidante, inhibe la COX - 1 inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi
Biochanina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, inhibe la expresión de NOSi, inhibidor de tirosín y serín tronío quinasas
Formononetina	Antioxidante, inhibidor de serín treonín quinasas
Luteolina	Antioxidante, inhibidor de tirosín quinasas, inhibe la expresión de NOSi, inhibidor de FI3Q
Quercetina	Antioxidante, Inhibe el metabolismo del ácido araquidónico, es inhibidor de FI3Q y FI5Q, inhibe la expresión de NOSi, regula la expresión e MAIC - 1
Hipolaetina	Antioxidante, inhibidor de COX -1 y 5LO
Delfinidina	Antioxidante, inhibe la producción de NO
Miricetina	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, y de NOSi
Rutina	Antioxidante, Inhibe el metabolismo del ácido araquidónico, es inhibidor de FI3Q y FI5Q, inhibe la expresión de NOSi, regula la expresión e MAIC - 1
Miricetina 1 ramnosido	Antioxidante, inhibe la expresión de COX – 2, y de NOSi
Astilbina	antioxidante
Hispidulina	Antioxidante
Escutellareina	Antioxidante

Por ejemplo, la quercetina posee propiedades antioxidantes por lo cual contribuye a reducir el incremento de ERO, mediador que causa daño celular y estimula la expresión de otros mediadores. Inhibe el metabolismo del AA por tanto, evita el incremento de PGE₂ y en menor medida el de LTB₄. Inhibe la FI3Q y la FI 5Q lo cual contribuye a reducir la formación de los segundos mensajeros formados por estas. Inhibe la expresión de NOSi con lo cual contribuye reducir la concentración de NO. Además, regula la expresión de MAIC-1 molécula que facilita adhesión de los leucocitos.

Se ha comprobado la actividad antiinflamatoria de flavonas, flavonoles y sus glicósidos aislados de diferentes especies. Se aislaron de las hojas *Erythrospermum monticolum* el 3-O-xilosil (1-2) ramnosido de quercetina y el 3-O-ramnosido de quercetina que inhiben el edema inducido con TPA en la oreja del ratón (81). El extracto hidroalcohólico y el de acetato de etilo de hojas de *Gochnatia polymorpha* inhiben el edema inducido con carragenina en la pata de la rata debido a la presencia de metil quercetina y rutina (82).

Los flavonoides presentan actividad analgésica debido a su propiedad de inhibir el metabolismo del ácido araquidónico. La astilbina y sus glicósidos aislados de *Hymeneae martiana* mostraron efecto analgésico en el modelo de las contorsiones inducidas en ratones con ácido acético (83).

Fitoesteroles

Los esteroides se encuentran en las células eucariotas pero en las procariotas están ausentes. Tanto el reino animal como el vegetal producen esteroides, los cuales participan en la formación de las membranas. El anillo característico de los esteroides es semejante al del colesterol que es el principal esteroide de los animales. Bajo el nombre de fitoesteroides se agrupan los esteroides de origen vegetal los cuales pueden encontrarse en forma libre o esterificada. Aunque muy parecidos al colesterol en su estructura se diferencian de este en el grado de insaturación y en la configuración de la cadena lateral. Se han identificado más de 40 fitoesteroides (84) los más abundantes son β sitosterol, estigmasterol y campesterol.

Los fitoesteroides poseen propiedades antioxidantes, incrementan la producción de corticoesteroides y retardan su degradación (85).

Se ha comprobado el efecto antiinflamatorio in vivo de fracciones de fitoesteroides aisladas de diferentes fuentes naturales. El β sitosterol aislado de la fracción insaponificable del aceite de oliva posee potente acción inhibidora del edema inducido con TPA (86). La fracción de *Achillea ageratum* que contiene estigmasterol y β sitosterol inhibe el edema inducido con TPA en la oreja del ratón en forma dependiente de la dosis (87). Se ha demostrado que el β sitosterol reduce la producción de anión radical superóxido, peróxido de hidrógeno, óxido nítrico, PGE₂ y LTB₄ inducidos con ésteres del forbol en macrófagos y se plantea que estos efectos pudieran estar relacionados con la modulación de FNkB (88).

Los esteroides poseen también efecto analgésico lo cual ha sido demostrado en modelos experimentales. El β sitosterol y el estigmasterol aislados de *P. corcovadensis* redujo en forma dependiente de la dosis las contorsiones inducidas con ácido acético *ip* en el ratón (89). El β sitosterol y β -sitosteril- β -D-glucósido aislado de las hojas de *Mentha cordifolia* Opiz redujeron también el número de contorsiones inducidas con ácido acético e incrementaron el umbral al dolor en el modelo del plato caliente (90).

I.5. Algunos métodos para evaluar la actividad antiinflamatoria

I.5.1. Sistemas celulares *in Vitro* y metabolismo del AA

Dos ejemplos de sistemas celulares *in vitro* para el estudio del metabolismo del AA son los sistemas complejos, como la sangre entera, o los sistemas simples, uno o dos tipos de células en tampones fisiológicos. El primer tipo sería el más cercano a la realidad. Sin embargo, se trata de un medio altamente complejo que obliga a una difícil estandarización del mismo, debido a la variabilidad en la cantidad y proporción

de células y compuestos presentes en la sangre, normalmente tratada con anticoagulantes. Por el contrario, las células aisladas (plaquetas, polimorfonucleares, queratinocitos, macrófagos, linfocitos y células del endotelio vascular) permiten una fácil estandarización del ensayo pues pueden ser contadas o determinar su contenido proteico. Se puede exponer directamente un número conocido de células con una viabilidad adecuada frente a una concentración exacta de compuesto.

Método de estimulación. Existen diferentes compuestos químicos para estimular las células a la liberación y transformación del AA, (91). Dentro de los estímulos menos fisiológicos, pero de acción más potente, se puede citar el mismo AA exógeno, el ionóforo de calcio A23187, la ionomicina y el TPA. Estímulos más fisiológicos los proporcionan la formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), el zimosán, la fitohemoaglutinina y los lipopolisacáridos bacterianos.

Para estudiar la vía 5-LOX en neutrófilos peritoneales de rata es adecuado recurrir al ionóforo de calcio A23187 junto al incremento de los niveles de ión calcio extracelular, ya que provoca una activación preferencial de esta vía sobre la COX. El efecto del ionóforo de calcio A23187 en el PMN peritoneal de rata elicitado con glucógeno es dosis dependiente hasta llegar a su máximo cuando alcanza la concentración de 0,5 μ M (92, 93). Los estudios sobre la relación entre diversos estímulos aplicados a la vez concluyen en que existe una fuerte compartimentación en el neutrófilo peritoneal de rata entre las vías LOX y COX. En todo caso, los neutrófilos también responden sintetizando metabolitos de la vía COX (TXB₂), que aunque aparecen más rápidamente lo hacen en menor cantidad y sin que sea necesario el concurso de altos niveles de calcio.

Tiempo de incubación/producción. Después de la estimulación con ionóforo de calcio A23187 se consigue a los 5 minutos un máximo de producción de LTB₄ que junto al ácido 5-hidroxi eicosatetraenoico (5-HETE) (en una relación 1:1) son los principales productos (94). Alargando la incubación comienzan a ser detectables cantidades cada vez mayores de los metabolitos oxidados y a los veinte minutos sólo quedan trazas del LTB₄. Por tanto, para cuantificar la síntesis de LTB₄ si se usan tiempos largos de incubación, se deben sumar las cantidades de LTB₄, 20-OH-LTB₄ y 20-COOH-LTB₄ (95).

Método de cuantificación de eicosanoides mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR). Esta es la única técnica que puede cuantificar más de 10 eicosanoides distintos en un sólo análisis sin requerir derivatizaciones previas ni el

uso de anticuerpos o radioactividad (95). Desde el punto de vista farmacológico, existen tres enzimas principales cuya actividad es importante en el fenómeno inflamatorio y que se pueden cuantificar mediante CLAR: la PLA₂, la LOX y la COX. Está generalmente aceptado que la actividad 5-LOX medida por la producción de ácido 5-HETE, LTB₄ y sus isómeros o productos de oxidación es un marcador válido para el hallazgo de inhibidores de la 5-LOX. Todos ellos poseen grupos cromóforos que absorben a 235 ó 274-280 nm y por tanto, son fácilmente detectables y cuantificables, presentando correlación entre su absorbancia y su concentración.

Procesado de las muestras. Existen autores que prefieren inyectar directamente las muestras. Esto tiene la gran ventaja de que no hay manipulaciones ni pérdida alguna de analitos. Sin embargo, la inyección repetida de este tipo de muestras provoca en el sistema de CLAR un deterioro rápido de resolución que puede ser minimizado si se les añade metanol al menos hasta un 30% y se centrifugan tras enfriar a -80°C. Así se consigue que gran parte del material proteico precipite (96).

La extracción en fase sólida (EFS) con columnas de pequeño tamaño, rellenas de diversos materiales, dispuestas en batería y acopladas a vacío, para acelerar el proceso de concentración de los analitos es una de las más utilizadas. Aunque se asume una pequeña pérdida de metabolitos, la correspondiente a la fracción disuelta en las membranas celulares, se recurre al uso de un patrón interno añadido en cantidad conocida a la muestra y que tras mezclado vigoroso, para asegurar su reparto entre medio y membranas, será eluído junto al resto de analitos permitiendo la corrección de los resultados (95).

Patrones internos. Sirven para monitorizar la recuperación de los eicosanoides tras el procesado de la muestra. Después de la adición de una cantidad exacta y conocida de patrón se refieren las áreas de cada metabolito a la del patrón corrigiendo así las pérdidas durante la extracción y las variaciones en las áreas de los picos a lo largo de la serie. Cuando la extracción se realiza únicamente del sobrenadante, parte de los analitos quedan retenidos en las membranas celulares. Para el análisis de LTB₄, la PGB₂, además de particularmente útil para cuantificar este metabolito, es usada como patrón universal para cuantificar en general todos los eicosanoides. También se usa su derivado más polar, el 19-hidroxi-PGB₂. Ambos presentan un máximo de absorción a 280 nm debido a un triple enlace conjugado con un grupo carboxilo.

I. 5.2. Edema plantar inducido por carragenina

Consiste en provocar un edema en la región subplantar de la pata de la rata mediante la inyección de un agente flogógeno, carragenina (97). Este mucopolisacárido de origen marino provoca una respuesta inflamatoria caracterizada por una serie de fases. La primera es precoz y debida al trauma de la inyección, a la que sigue un proceso bifásico mediado por diferentes autacoides: en la primera fase, que se extiende durante la primera hora, intervienen aminas vasoactivas como la histamina y serotonina, mientras que en la segunda fase, comprendida entre 1,5 y 2,5 h, intervienen las cininas. En una fase tardía, desde las 2,5 a las 6 h, son las prostaglandinas PGE₁, PGE₂ y PGF₂ los principales mediadores.

Es en esta fase tardía, cuando la respuesta vascular se hace máxima y estable (entre las 4 y 6 h). Este es el momento idóneo para el ensayo de agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), los cuales reducen el edema actuando sobre la síntesis de derivados del AA.

I.5.3. Modelo de inducción de edema con aceite de crotón en la oreja del ratón

El aceite de crotón se obtiene de la especie *Croton tiglium* L y posee propiedades irritantes, proinflamatorias y promotora de tumores. Estas propiedades se deben a que contiene una mezcla de ésteres del forbol de la cual la sustancia más potente es el TPA.

La aplicación del TPA desencadena todos los eventos propios del proceso inflamatorio: vasodilatación y eritema entre 1-2 h, extravasación y edema entre 3-4 h, llegando al máximo a las 6-8 h. A las 12-14 h el edema desaparece, pero la vasodilatación y el eritema pueden persistir entre 24-48 h (98).

A nivel histológico, se produce agregación plaquetaria a las 2 h, agregación y adherencia de PMNs (neutrófilos y eosinófilos) a las 4-6 h, migración a la dermis y desgranulación de mastocitos a partir de las 6 h. Entre 6-24 h se observa la acumulación y migración de leucocitos al compartimiento subcorneal epitelial, particularmente alrededor de los folículos, que degenera en la formación de abscesos subcorneales a las 48-72 h.

A partir de 24 h aparece incremento de la mitosis en la membrana basal epidérmica, lo que conlleva hiperplasia y engrosamiento epidérmico aparente a los 48-96 h.

Se ha comprobado que en este modelo se produce infiltración de neutrófilos mediante el análisis de actividad de MPO en el sitio de inflamación, se produce también un incremento de la concentración de PGE₂ y LTB₄ (99).

CONCLUSIONES

- La clínica y la experimentación farmacológica demuestran que la acción de una planta no puede explicarse por uno de sus principios activos. La acción de la planta se debe a fitocomplejos que son entidades bioquímicas, dinámicas y unitarias con interrelaciones entre sus componentes donde las funciones biológicas de las diferentes moléculas son complementarias.
- El proceso inflamatorio es una respuesta del organismo ante un estímulo e implica cambios vasculares, eventos celulares, y la producción de mediadores químicos de la inflamación. La perpetración del proceso inflamatorio conduce al daño de células y tejidos.
- En las plantas medicinales se encuentran un grupo importante de metabolitos secundarios con propiedades antiinflamatorias entre los que se encuentran fenoles flavonoides y estrotes. Estos compuestos ejercen su acción farmacológica interfiriendo la producción de diferentes mediadores químicos del proceso inflamatorio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bequette F., *Los hombres y las plantas*, en *El Correo de la UNESCO*. 1997.
2. Fleurentin J. y Pelt J., *Les plantes médicinales*. La Recherche, 1990. **21**(222).
3. Organización Mundial de la Salud, *Promoción y Desarrollo de la Medicina Tradicional. Serie de Informes Técnicos*. 1978., Ginebra.
4. Pellever J., *Investigación científica en fitoterapia*. Natura Medicatrix, 1993(32): p. 21 -24.
5. Berdances J., *Principios activos y preparaciones farmacéuticas de las plantas medicinales*. Natura Medicatrix, 1994-95(37 - 38).
6. Akerele O., *Programa Organización Mundial de la Salud de Medicina Tradicional: Progresos y perspectivas*, en *Crónica de la Organización Mundial de la Salud*. 1984.: Ginebra. p. 83-84.
7. Choyillas T., *Inflamación aguda y crónica.*, in *Patología Estructural y Funcional*, C. Ranz, Editor. 2000, Mc Grawn - Hill.

8. Baek SH, et al., *Secretory phospholipase A2-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappaB activation*. J. Immunol, 2000. **164**(12): p. 6359-65.
9. Alaoui-El-Azher M., et al., *Arachidonic acid differentially affects basal and lipopolysaccharide-induced sPLA(2)-IIA expression in alveolar macrophages through NF-kappaB and PPAR-gamma-dependent pathways*. Mol Pharmacol., 2002. **61**(4): p. 786-94.
10. Antonio V., et al., *Transcriptional regulation of the rat type IIA phospholipase A2 gene by cAMP and interleukin-1beta in vascular smooth muscle cells: interplay of the CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), nuclear factor-kappa B and Ets transcription factors*. Biochem J., 2002. **368**(2): p. 415-24.
11. Wu YZ., et al., *Surfactant Protein-A and phosphatidylglycerol suppress type-IIA phospholipase A2 synthesis via NF- κ B*. Am J Respir Crit Care Med, 2003.
12. Beck G., et al., *Secreted phospholipases A2 induce the expression of chemokines in microvascular endothelium*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **300**(3): p. 731 - 7.
13. Kwon O., et al., *Expression of cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines induced by 2, 2', 4, 4', 5, 5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in human mast cells requires NF-kappa B activation*. Biol Pharm Bull., 2002. **25**(9): p. 1165 - 8.
14. Singer CA., et al., *p38 MAPK and NF- κ B Mediate COX-2 Expression in Human Airway Myocytes*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2003.
15. Kanellis J., et al., *Uric acid stimulates monocyte chemoattractant protein-1 production in vascular smooth muscle cells via mitogen-activated protein kinase and cyclooxygenase-2*. Hypertension., 2003. **41**(6): p. 1287 - 93.
16. Wu D., et al., *Ceramide-induced and age-associated increase in macrophage COX-2 expression is mediated through up-regulation of NF-kappa B activity*. J Biol Chem, 2003. **278**(13): p. 10983 - 92.
17. Spitzer JA., et al., *Ethanol and LPS modulate NF-kappaB activation, inducible NO synthase and COX-2 gene expression in rat liver cells in vivo*. Front Biosci, 2002. **7**: p. 99 -108.

18. Lee JK., et al., *The regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression induced by lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha in C6 cells: involvement of AP-1 and NFkappaB*. Life Sci., 2003. **73**(5): p. 595 - 609.
19. Yamaza T., et al., *NF-kappaB activation and iNOS expression in the synovial membrane of rat temporomandibular joints after induced synovitis*. J Dent Res, 2003. **82**(3): p. 183 - 8.
20. Liu B, et al., *Role of nitric oxide in inflammation-mediated neurodegeneration*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **962**: p. 318 - 31.
21. Fubini B., Hubbard A., *Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(12): p. 1507-16.
22. Matsuda A., et al., *Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways*. Oncogene, 2003. **22**(21): p. 3307 - 18.
23. Sohn HY., et al., *Crucial role of local peroxynitrite formation in neutrophil-induced endothelial cell activation*. Cardiovasc Res, 2003. **57**(3): p. 804 -15.
24. Blantz RC, M.K., *Role of nitric oxide in inflammatory conditions*. Nephron, 2002. **90**(4): p. 373 -8.
25. Amici M., et al., *Peroxynitrite-induced oxidation and its effects on isolated proteasomal systems*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(8): p. 987 -96.
26. Stewart VC., Heales SJ., *Nitric oxide-induced mitochondrial dysfunction: implications for neurodegeneration*. Free Radic Biol Med, 2003. **34**(3): p. 287-303.
27. Hobbs RM., Watt FM., *Regulation of interleukin-1alpha expression by integrins and epidermal growth factor receptor in keratinocytes from a mouse model of inflammatory skin disease*. J Biol Chem, 2003. **278**(22): p. 19798 -807.
28. de Fougères AR., et al., *Global expression analysis of extracellular matrix-integrin interactions in mouse*. Immunity, 2000. **13**(6): p. 749-58.
29. Reyes-Reyes M., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase mediates integrin-dependent NF-kappaB and MAPK activation through separate signaling pathways*. J Cell Sci, 2001. **114**(8): p. 1579 -89.

30. Shi C., et al., *Leukocyte integrin Mac-1 recruits toll/interleukin-1 receptor superfamily signaling intermediates to modulate NF-kappa B activity*. *Circ Res.*, 2001. **89**(10): p. 859 -65.
31. Klein S., et al., *Alpha 5 beta 1 integrin activates an NF-kappa B-dependent program of gene expression important for angiogenesis and inflammation*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(16): p. 5912 -22.
32. Rubel C., et al., *Fibrinogen-CD11b/CD18 interaction activates the NF-kappa B pathway and delays apoptosis in human neutrophils*. *Eur J Immunol*, 2003. **13**(5): p. 1429 -38.
33. Soethout EC., et al., *alpha (4)-Integrin (CD49d) expression on bovine peripheral blood neutrophils is related to inflammation of the respiratory system*. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003. **93**(12): p. 21 -9.
34. Tak P., Firestein G., *NF-kB: a key role in inflammatory diseases*. *The J: of Clinical Investigation*, 2001. **107**(1): p. 7 -11.
35. Loguercio C, A., *Oxidative stress in viral and alcoholic hepatitis*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **34**(1): p. 1-10.
36. Klebanoff S., *Phagocytic cells: Products of oxygen metabolism, inflammation basic principles and clinical correlates*. 1988, New York: Raven Press Ltd.
37. Roos D, *Neutrophil, Encyclopaedia of Immunology*. Vol. 3. 1992, New York: Academic Press.
38. Servais S, C.K., Koubi H., Rouanet J., *Effect of voluntary exercise on H2O2 release by subsarcolemmal and intermyofibrillar mitochondria*. *Free Radic Biol Med*, 2003. **35**(1): p. 24 -32.
39. Zagoya J., *Bioquímica e Inmunología*, E. Piensa. Vol. 2. 1988, México DF.
40. Jules T., *Historical perspective Antioxidant Nutrition and evolution*. *Prev Med*, 1992. **21**: p. 270 -7 6.
41. Kalra J., *Oxygen free radicals: Key factors in clinical disease*. *Lab, Med, Int*, 1994. **10**: p. 16 - 21.
42. Carpenter K., Brabbs C., Mitchison M., *Oxygen radicals and atherosclerosis*. *Klin-wochenschr*, 1991. **19**(21 - 23): p. 139 -4 5.
43. Horton J., *Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy*. *Toxicology*, 2003. **189**(1 - 2): p. 75 - 88.

44. Fan H, et al., *Oxygen radicals trigger activation of NF-kappa B and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. **282**(5): p. 778 - 86.
45. Seo JY., et al., *Oxidative stress induced cytokine production in isolated rat pancreatic acinar cells: effects of small-molecule antioxidants*. Pharmacology, 2002. **64**(2): p. 63-70.
46. Ferencz A., et al., *The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation*. Surgery, 2002. **132**(5): p. 877 -84.
47. Nakamori Y., et al., *Enhanced expression of intranuclear NF-kappa B in primed polymorphonuclear leukocytes in systemic inflammatory response syndrome patients*. J Trauma, 2003. **54**(2): p. 253 -60.
48. Rocks D., et al., *Vitamin E reduces transendothelial migration of neutrophils and prevents lung injury in endotoxin-induced airway inflammation*. Am J Respir Cell Mol Biol., 2003. **28**(2): p. 199-207.
49. Lee P., Choi. A., *Pathways of cell signaling in hyperoxia*. Free Radic Biol Med, 2003. **35**(4): p. 341 - 50.
50. Huss U., et al., *Screening of ubiquitous plant constituents for COX-2 inhibition with a scintillation proximity based assay*. J Nat Prod, 2002. **65**(11): p. 1517 - 21.
51. Ogiwara T., et al., *Inhibition of NO production by activated macrophages by phenolcarboxylic acid monomers and polymers with radical scavenging activity*. Anticancer Res, 2003. **23**(2B): p. 1317 -23.
52. Dinis TC., Santosa CL., Almeida LM., *The apoprotein is the preferential target for peroxynitrite-induced LDL damage protection by dietary phenolic acids*. Free Radic Res, 2002. **36**(5): p. 531-43.
53. Heilmann J., et al., *Radical scavenger activity of phenylethanoid glycosides in FMLP stimulated human polymorphonuclear leukocytes: structure-activity relationships*. Planta Med, 2000. **66**(8): p. 746 -8.
54. Hinz B, et al., *Salicylate metabolites inhibit cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E(2) synthesis in murine macrophages*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **274**(1): p. 197 -202.

55. Fernández MA., Saenz MT., Garcia MD., *Anti-inflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from Scrophularia frutescens*, J Pharm Pharmacol, 1998. **50**(10); p. 1183-6.
56. Yamada K, et al, *Structure-activity relationship of polyphenols on inhibition of chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells*. Cell Dev Biol Anim, 1999. **35**(3); p.169-74.
57. Alanko J., et al, *Modulation of arachidonic acid metabolism by phenols: relation to their structure and antioxidant/prooxidant properties*. Free Radic Biol Med, 1999. **26**(1-2); p. 193-201.
58. Matsuo N., et al, *Inhibition by dietary tea polyphenols of chemical mediator release from rat peritoneal exudate cells*. Biosci Biotechnol Biochem., 2000. **64**(7); p.1437-43.
59. Shigematsu S., et el, *Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia/reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants*. Free Radic Biol Med. 2003, **34**(7); p. 810-7.
60. Marcano D., Hasegawa H., *Fitoquímica Orgánica*. 1991, Caracas:: Universidad Central de Venezuela.
61. Leis HJ., et al., *Prostaglandin endoperoxide synthase-2 contributes to the endothelin/sarafotoxin-induced prostaglandin E2 synthesis in mouse osteoblastic cells (MC3T3-E1): evidence for a protein tyrosine kinase-signaling pathway and involvement of protein kinase C*. Endocrinology., 1998. **139**(3): p. 1268 - 77.
62. Liang YC., et al., *Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages*. Carcinogenesis, 1999. **20**(10): p. 1945 - 49.
63. Han YL., Kang J., L. SH., *Protein kinase C and protein tyrosine kinase mediate lipopolysaccharide- and cytokine-induced nitric oxide formation in vascular smooth muscle cells of rats*. Sheng Li Xue Bao, 2003. **55**(3): p. 265 - 272.
64. Fierro IM., et al., *Induction of NOS in rat blood PMN in vivo and in vitro: modulation by tyrosine kinase and involvement in bactericidal activity*. Leukoc Biol, 1999. **65**(1): p. 508 -14.

65. Naderi GA, et al., *Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation*. Mol Cell Biochem, 2003. **246**(1 - 2): p. 193 -6.
66. Dubey RK., et al., *Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells*. Hypertension., 1999. **33**(1): p. 177 - 82.
67. Mine S., et al., *Hepatocyte growth factor is a potent trigger of neutrophil adhesion through a rapid activation of lymphocyte function associated antigen-1*. Lab Invest, 1998. **78**(11): p. 395 -404.
68. Mascolo N., Pinto A., C. F., *Flavonoids, leucocyte migration and eicosanoids*. J Pharm Pharmacol., 1988. **40**(4): p. 293 -5.
69. Kalkbrenner F., Wurm G., vB. F., *In vitro inhibition and stimulation of purified prostaglandin endoperoxide synthase by flavonoids: structure-activity relationship*. Pharmacology, 1992. **44**(1): p. 1 -12.
70. Sanz MJ., et al., *Influence of a series of natural flavonoids on free radical generating systems and oxidative stress*. Anticancer Res, 2000. **20**(6B): p. 4563 - 70.
71. Hsu JT., Ying C., C. CJ., *Regulation of inducible nitric oxide synthase by dietary phytoestrogen in MCF-7 human mammary cancer cells*. Reprod Nutr Dev, 2000. **40**(1): p. 11 -8.
72. Toda S., S. Y., *effects of isoflavones on lipid peroxidation by reactive oxygen species*. Phytother Res, 1999. **13**(2): p. 163 - 5.
73. Xagorari A., Roussos C., Papapetropoulos A. *Inhibition of LPS-stimulated pathways in macrophages by the flavonoid luteolin*. Br J Pharmacol, 2002. **136**(7): p. 1058 - 64.
74. Lee Lt., et al., *Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumour cells*. Anticancer Res., 2002. **22**(3): p. 1615-27.
75. Moroney MA., et al., *Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclooxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids*. Pharm Pharmacol.1988. **32**(3 - 4): p. 283 - 8.
76. Ravindra PV., N. MS., *Antioxidant activity of the anthocyanin from carrot (Daucus carota) callus culture*. Int J Food Sci N, 2003. **54**(5): p. 349 -55.
77. Kahkonen MP., Heinonen M., *Antioxidant activity of anthocyanins and their aglycons* J. Agric Food Chem, 2003. **51**(3): p. 628 -33.

78. Wang J., Mazza G.I., *Inhibitory effects of anthocyanins and other phenolic compounds on nitric oxide production in LPS/IFN-gamma-activated RAW 264.7 macrophages*. Agric Food Chem., 2002. **50**(1): p. 850 -7.
79. Chen Y., Yang L., Lee T.J., *Oroxylin A inhibition of lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 gene expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation*. Biochem Pharmacol, 2000. **59**(11): p. 1445 -57.
80. Somova LI., et al., *Antihypertensive, antiatherosclerotic and antioxidant activity of triterpenoids isolated from Olea europaea, subspecies africana leaves*. J Ethnopharmacol, 2003. **84**(2 - 3): p. 299 -305.
81. Recio MC., et al, *Anti-inflammatory activity of flavonol glycosides from Erythrospermum monticolum depending on single or repeated local TPA administration*. PlantaMed, 1995. **61**(6); p. 502-4.
82. Moreira AS., Spitzer V., Schapoval EE., Schenkel EP.. *Antiinflammatory activity of extracts and fractions from the leaves of Gochnatia polymorpha*. PhytotherRes., 2000. **14**(8); p. 638-40.
83. Cechinel-Filho V., Vaz ZR., Zunino L., Calixto JB., Yunes RA., *Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of astilbin, taxifolin and some related compounds*. Arzneimittelforschung., 2000. **50**(3); p. 281-5.
84. Benn, GA. Phytosterols. Adv. Lipid Res 1973; **11**; p. 193-218
85. Ríos Cañavate J L., *Fitoterapia de la inflamación*, in *Natura Medicatrix*. 1994-1995.
86. de la Puerta R., Martínez-Dominguez E., Ruiz-Gutierrez V., *Effect of minor components of virgin olive oil on topical antiinflammatory*. Z Naturforsch [C]. 2000. **55**(9-10); p. 814-9.
87. Gomez MA., Saenz MT., Garcia MD., Fernández MA.. *Study of the topical anti-inflammatory activity of Achillea ageratum on chronic and acute inflammation models*. Z Naturforsch [C]. 1999. **54**(11); p. 937-41.
88. Moreno JJ.. *Effect of olive oil minor components on oxidative stress and arachidonic acid mobilization and metabolism by macrophages RAW264.7*. Free Radic Biol Med. 2003. **35**(9); p. 1073-81.
89. Santos MR., et al, *Antinociceptive properties of sterols isolated from P. corcovadensis in mice*. Planta Med. 1995. **61**(4); p. 329- 32.

90. Villasenor IM., Angelada J., Canlas AP., Echegoyen D., *Bioactivity studies on beta-sitosterol and its glucoside*. *Phytother Res.* 2002. **16**(5); p. 417-21.
91. Spector AA, et al, Gordon JA., Moore SA., *Hydroxyeicosatetraenoic Acids (Hetes)* *Prog. Lipid Res.* 1988. **27**; p. 271-323
92. Moroney MA., Alcaraz Ml., Forder RA., Carey F., Hoult IRS., *Selectivity Neutrophil 5-Lipoxygenase and Cyclo-oxygenase Inhibition by an Anti-inflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids* *J. Pharm. Pharmacol.* 1988. **40**; p. 787-792
93. Moroney MA., Forder RA., Carey F., Hoult JRS., "Differential Regulation of 5-Lipoxygenase and Cyclo-Oxygenase Pathways of Arachidonate Metabolism in Rat Peritoneal Leukocytes". *Br. J. Pharmacol.* 1990. **101**; p. 128-132
94. Safayhi H., Rall B., Sailer ER., Ammon HP., *Inhibition of Boswellic Acids on Human Leukocyte Elastase* *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2000. **281**; p. 460-463
95. Shak S., *Leukotriene B4 Catabolism: Quantitation of Leukotriene B4 and Its Oxidation Products by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography* en *Cellular Regulators* (Conn PM y Means AR) Academic Press Inc., 1987, Orlando, 355-371
96. Yu W., Powell WS., *Analysis of Leukotrienes, Lipoxins, and Mono oxygenated Metabolites of Arachidonic Acid by Reversed-Phase High-Pressure Liquid Chromatography* *Anal. Biochem.* 1995. **226**; p. 241-251
97. Sugishita E., Amagaya S., Ogihara Y., *Antiinflammatory Testing Methods: Comparative Evaluation of Mice and Rats* *J. Pharm. Dyn.* 1981. **4**; p. 565-575
98. Young JM y De Young LM () *Cutaneous Models of Inflammation for the Evaluation of Topical and Systemic Pharmacological Agent* en *Pharmacological Methods in the Control of Inflammation* (Spector S y Back N, Eds.) 1989, New York, p. 215-231
99. Raederstorff D., Pantze M., Bachmann H., Moser U.. *Anti-inflammatory properties of docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids in phorbol-ester-induced mouse ear inflammation.* *Int Arch Allergy Immunol.* 1996. **111**(3); p. 284-90.