

1321 1 942

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA

"ESTUDIO FITOFARMACOLÓGICO DE LA ESPECIE ACHILLEA AGERATUM L."

38

74

05 OCT. 1998

Mercedes Alicia Gómez López

Tesis Doctoral para aspirar al grado de
Doctora en Farmacia presentada por
Mercedes Alicia Gómez López

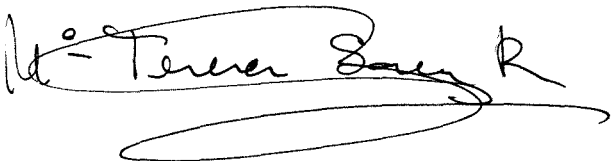
Sevilla 28 Septiembre 1998

1 BS 1178761

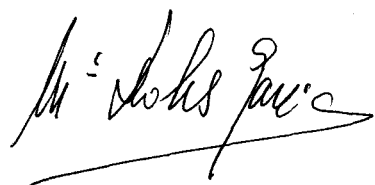
**M^a TERESA SÁENZ RODRÍGUEZ Y M^a DOLORES GARCÍA GIMÉNEZ, Profesoras
Titulares del Departamento de Farmacología.**

CERTIFICAN: Que la Tesis Doctoral titulada "Estudio Fitofarmacológico de la especie
Achillea ageratum L.", realizada por MERCEDES ALICIA GÓMEZ LÓPEZ, para aspirar al
grado de Doctora, ha sido llevada a cabo bajo nuestra dirección.

En Sevilla, a 28 de Septiembre de 1998



Fdo: M^a Teresa Sáenz Rodríguez



M^a Dolores García Giménez

**ELISA MARHUENDA REQUENA, Catedrática de Farmacodinamia y Directora del
Departamento de Farmacología, de la Facultad de Farmacia de la Universidad de
Sevilla.**

CERTIFICA: Que la presente Tesis Doctoral titulada "Estudio Fitofarmacológico de la especie *Achillea ageratum* L." ha sido dirigida por las Doctoras M^a Teresa Sáenz Rodríguez y M^a Dolores García Giménez y realizada en los Laboratorios de Farmacognosia y Farmacodinamia de esta Facultad, cumpliendo todos los requisitos para este tipo de trabajo.

Y para que conste, firmo el presente.

En Sevilla, a 28 de Septiembre de 1998

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Elisa Marhuenda', enclosed within a large, loopy oval flourish.

Fdo: Elisa Marhuenda Requena

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de alguna forma me han ayudado a realizar este trabajo.

A la Dra. Dña Elisa Marhuenda Requena, Directora del Departamento, por su acogida en este Departamento, y por su continuo interés y constante apoyo durante la realización de este trabajo.

A mis directoras de Tesis Dra. Dña. M^a Teresa Sáenz Rodríguez y Dra. Dña. M^a Dolores García Gimenez, por haberme permitido el lujo de haber trabajado junto a ellas, mi madres en la Ciencia, apoyándome, aconsejándome y corrigiéndome, de una forma rigurosa y constante.

Al servicio de espectroscopia de la Universidad de Sevilla y en especial al Dr. D. Antonio Gil Serrano, por su colaboración.

Al Departamento de Microbiología y Virología de la Facultad de Medicina, por su colaboración.

A M^a Eugenia por haberme enseñado qué es un trabajo constante y meticoloso y por haber estado siempre a mi lado para ayudarme en cualquier cosa.

A M^a Angeles, Rocio y a M^a Carmen, que con sus ganas de trabajar y de innovar en la investigación me han enseñado cómo trabajar en un laboratorio.

A M^a 3,14, Ana, Manolo, Antonio, Angeles, Miguel, Angel, al grupo de las úlceras (imposible enumerarlas todas + Viky) por su paciencia y comprensión a la hora de compartir el ordenador. y en general a todo el "gallinero", que son la alegría del Departamento.

A M^a de la aOrta, a Mayche y a Lola por esos "momentos de cafetería".

A Dña M^a Carmen, Gracia y Rosa, a la cual he echado de menos estos últimos meses y que espero que pronto se recupere, por su ayuda y su paciencia en todo momento.

A Juan Antonio Bardón, por haber sido tan comprensivo con los horarios.

A mis amiga/os Susana Gimeno, Susana Martinez, Rocio, Ana, Jorge, etc., por estar ahí.

A mi padre por haberme enseñado que con ganas y tensión todo es posible : "*La espada siempre en alto*".

A mi madre porque siempre ha creído en mí.

A mi hermana Maria, que constatemente me ha aconsejado sobre mi formación y siempre ha sido un ejemplo a seguir.

A mi hermanita Mayte y a Jesús con los que he compartido todos mis problemas y me han ayudando constantemente.

A Ignacio, ya que sin él me hubiera sido muy difícil completar este trabajo.

*A mis Padres
a mis dos hermanas
y a Ignacio*

"Para un investigador las ocasiones inolvidables de su vida son aquellos momentos raros que llegan tras años de agotador trabajo, arrastrandose hacia ellos, cuando se levanta de repente el velo sobre el secreto de la Naturaleza, y cuando lo que era oscuro y caótico aparece en clara luz y con bella estructura."

Gerty Cori

"Es difícil afirmar con seguridad algo, si no ha sido examinado antes varias veces. Pues el dudar de cada cosa no es algo inútil, ya que al dudar empezamos a investigar y al investigar encontramos la verdad según lo que dice la verdad misma: Buscad y hallareis, llamad y se os abrirá....."

Pedro Abelardo SXII

(Sic et non)

SUMARIO

I.-OBJETO	1
II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
II.1.- <u>ACHILLEA AGERATUM L.</u>.....	4
II.1.1.- DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.....	4
II.1.2.- NOMBRES VULGARES.....	6
II.1.3.- FITOQUÍMICA.	6
II.1.4.- ACCIONES FARMACOLÓGICAS Y EMPLEOS TERAPEUTICOS.	7
II.2.- <u>TRITERPENOS Y ESTEROLES.</u>	8
II.2.1.- TRITERPENOS.	8
II.2.1.1.- TIPOS ESTRUCTURALES	10
II.2.1.2.- DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA.....	12
II.2.2.- ESTEROLES.	13
II.2.2.1.- TIPOS ESTRUCTURALES	15
II.2.2.2.- DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA.....	16
II.3.- <u>INFLAMACIÓN.</u>	18
II.3.1.- CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO INFLAMATORIO. 18	
II.3.2.- ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS CORTICOIDES.	28
II.3.3.- TRITERPENOS Y ESTEROLES CON ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.	33
II.4.- <u>CÁNCER.</u>	35
II.4.1.- CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO CANCEROSO.	38

II.4.2.- ACTIVIDAD CITOSTÁTICA Y ANTICANCEROSA DE LOS ESTEROLES.	46
II.4.3.- TRITERPENOS Y ESTEROLES CON ACTIVIDA CITOSTÁTICA Y ANTITUMORAL.	52
III.- PARTE EXPERIMENTAL	53
III.1.- MUESTRA	54
III.1.1.- RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN	54
III.2.- ESTUDIO FITOQUÍMICO	55
III.2.1.-OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A ESTUDIAR.....	55
III.2.2.- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS.....	56
III.2.2.1.- Cromatografía en capa fina.....	56
III.2.2.2.- Cromatografía en columna	57
III.2.3.- TÉCNICAS INSTRUMENTALES	58
III.2.4.- ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO	60
III.2.4.1.- Identificación del compuesto A.....	62
III.2.4.2.- Identificación del compuesto B	68
III.2.5.- ESTUDIO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO	91
III.2.5.1.- Identificación del compuesto C	93
III.2.5.2.- Identificación del compuesto D.....	101
III.3.- ENSAYOS FARMACOLÓGICOS	109
III.3.1.- ENSAYOS DE ACITVIDAD CITOSTÁTICA	109
III.3.1.1.- ENSAYOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS VEGETALES.	109

III.3.1.1.a.- <u>Condiciones generales de la experiencia</u>	110
III.3.1.1.b.- <u>Muestras ensayadas</u>	115
III.3.1.1.c.- <u>Resultados</u>	116
III.3.1.1.d.- <u>Discusión de resultados</u>	128
III.3.1.2.-ENSAYOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES	
III.3.1.2.a.- <u>Condiciones generales de la experiencia</u>	129
III.3.1.2.b.- <u>Muestras ensayadas</u>	137
III.3.1.2.c.- <u>Resultados</u>	138
III.3.1.2.d.- <u>Discusión de resultados</u>	152
III.3.2.-ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA	153
III.3.2.1.- MÉTODOS DE ESTUDIO "IN VIVO"	154
III.3.2.1.1.- <i>EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA</i>	154
III.3.2.1.1.a.- <u>Condiciones generales de la experiencia</u>	156
III.3.2.1.1.b.- <u>Muestras ensayadas</u>	157
III.3.2.1.1.c.- <u>Resultados</u>	157
III.3.2.1.1.d.- <u>Discusión de resultados</u>	163
III.3.2.1.2.- <i>EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR ACETATO DE TETRADECANOIL FOBOL (TPA) Y POR ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA)</i>	164
III.3.2.1.2.a.- <u>Condiciones generales de la experiencia</u>	167
III.3.2.1.2.b.- <u>Muestras ensayadas</u>	168

III.3.2.1.2.c.- Resultados	169
III.3.2.1.2.d.- Discusión de resultados	178
III.3.2.1.3.- <i>EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR MÚLTIPLES APLICACIONES DE TPA</i>	179
III.3.2.1.3.a.- Condiciones generales de la experiencia	179
III.3.2.1.3.b.- Muestras ensayadas	181
III.3.2.1.3.c.- Resultados	181
III.3.2.1.3.d.- Discusión de resultados	187
III.3.2.1.4.- <i>EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR ETILFENIL PROPIOLATO (EPP)</i>	188
III.3.2.1.4.a.- Condiciones generales de la experiencia	188
III.3.2.1.4.b.- Muestras ensayadas	189
III.3.2.1.4.c.- Resultados	189
III.3.2.1.4.d.- Discusión de resultados	193
III.3.2.1.5.- <i>BLOQUEO PRODUCIDO POR ANTIINFLAMATORIA</i>	194
III.3.2.1.5.a.- Condiciones generales de la experiencia	198
III.3.2.1.5.b.- Muestras ensayadas	199
III.3.2.1.5.c.- Resultados	199
III.3.2.1.5.d.- Discusión de resultados	207

III.3.2.2.- MÉTODOS DE ESTUDIO "IN VITRO"	208
III.3.2.2.1.- <i>ACTIVIDAD DEL ENZIMA</i> <i>MIELOPEROXIDASA (MPO)</i>	208
III.3.2.2.1.a.- Condiciones generales de la experiencia	210
III.3.2.2.1.b.- Muestras ensayadas	211
III.3.2.2.1.c.- Resultados	212
III.3.2.2.1.d.- Discusión de resultados	222
IV.- CONCLUSIONES	223
V.- BIBLIOGRAFÍA	225

I.- OBJETO

Desde la antigüedad, el hombre ha conocido las aplicaciones de las plantas en sus aspectos más diversos, de todos ellos, su utilización en terapéutica es la que presenta un mayor interés para el farmacéutico.

Actualmente, como resultado de los modernos procedimientos de aislamiento de principios activos y de investigación farmacológica, nuevas drogas vegetales encuentran su camino hacia la medicina.

Desde hace algún tiempo en nuestro laboratorio venimos estudiando la especie *Achillea ageratum* L., tanto desde el punto de vista fitoquímico como farmacológico, obteniéndose resultados muy prometedores en el campo de la inflamación, unas de las líneas prioritarias en nuestro grupo de investigación.

En el presente trabajo hemos profundizando en la actividad antiinflamatoria de esta especie, utilizando diferentes técnicas donde están implicados distintos mediadores y receptores. Paralelamente hemos realizado algunos ensayos de actividad citostática (otra de las líneas de investigación de nuestro grupo) debido a la íntima relación entre los procesos inflamatorio y neoplásico.

II.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1.-ACHILLEA AGERATUM L.

II.1.1.-DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

La especie *Achillea ageratum* L., es conocida como **agerato** (Caballero, A.; 1940) (Colmeiro, M.; 1871) (Lazaro e Ibiza, E.; 1906) (Reyes Prosper, E.; 1915), que en griego significa "todo aquello que nunca envejece", debido a que conserva sus flores largo tiempo. Pertenece a la familia Asteráceas, uno de los grupos más numerosos y naturales de Angiospermas. Formada por 1100 géneros y 25000 especies (Heywood, V.H.; 1985), se encuentran repartidas por todo el mundo a excepción de los territorios antárticos, con una amplia representación en regiones de clima semiárido y mediterráneo.

Achillea ageratum L. es una especie de tallos comprendidos entre 50-90 cm, erectos, generalmente ramificados en la parte superior. Las hojas basales son largamente pecioladas, suelen ser pinnatifidas y las hojas medias y superiores subsentadas, elípticas o lanceoladas y dentadas. El tallo principal puede contener hasta 60 capítulos y las ramas laterales entre 8-20 capítulos. El involucre mide 3-5 × 2-8 mm. con bracteadas desiguales dispuestas en varias filas. El receptáculo es cónico en la fructificación y las flores amarillas hemiliguladas con limbo de 0,9-1,5 mm y aquenios de 1-1,5 mm. Las flores internas son flosculosas, de unos 2mm (Fig 1).

Esta especie se extiende por la región oeste mediterránea, preferentemente sobre suelos húmedos y básicos. Florece y fructifica de mayo a septiembre (Talavera, S.; 1987) (Fig 2).



Fig 1.- *Achillea ageratum* L.

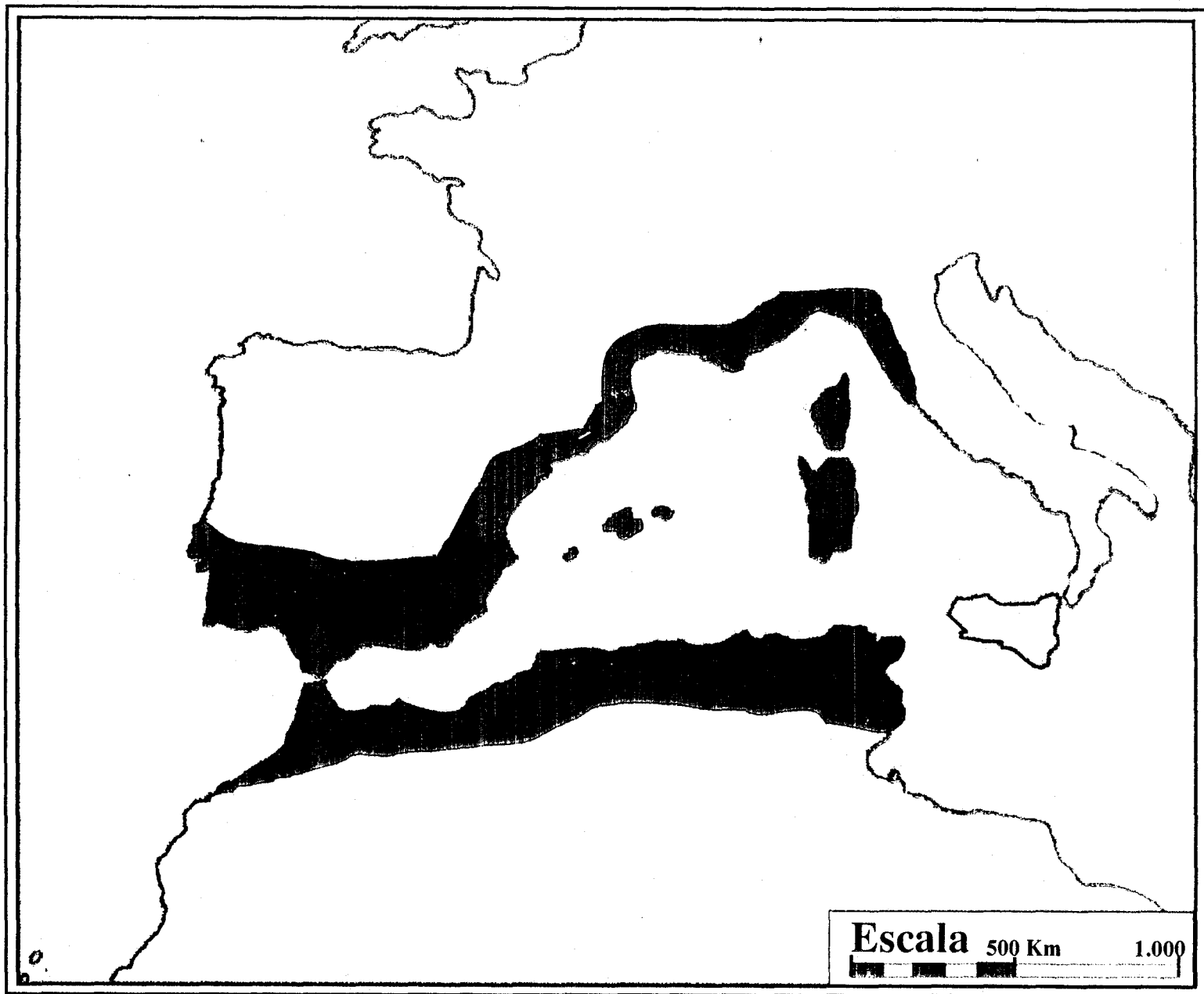


Fig. 2.- Area de distribución de la especie *Achillea ageratum* L.  Lugar de recolección

II.1.2.- NOMBRES VULGARES.

Se le conoce popularmente como **agerato** (Font Quer, P., 1990) (Caballero, A.; 1940) (Colmeiro, M.; 1971) (Lázaro e Ibiza, B.; 1906) (Reyes Prosper, E.; 1915), pero también recibe muchos otros nombres vulgares como son: **altarreina** (Font Quer, P., 1990), **altarreina oficial** (Colmeiro, M.; 1981), **hierba julia** (Caballero, A.; 1940) (Font Quer, P., 1990) (Lázaro e Ibiza, E.; 1906), **eupatorio de Mesué** (Font Quer, P., 1990) , **artemisa real** (Caballero, A.; 1940) (Reyes Prosper, E.; 1915), **artemisa basta** (Font Quer, P., 1990) **camamita** (Reyes Prosper, E.; 1915) y **herbolán** (Caballero, A.; 1940) (Reyes Prosper, E.; 1915).

II.1.3.- FITOQUÍMICA

Los flavonoides, junto con las lactonas sesquiterpénicas, constituyen los componentes más característicos del género *Achillea*, como ponen de manifiesto los estudios realizados. Así en el caso de la especie *A. ageratum* L. se han aislado compuestos flavónicos tales como: luteolina, quercetina y 7-O- β glucosil luteolina (García, M.D. y col; 1997), así como chrisoplenetino, penduletino, hispidulino, cirsiciol y ageratriol (Vieira, L.M. y col; 1997b).

Además de este tipo de compuesto ha sido estudiado la composición de sus aceites esenciales, siendo los mayoritarios: artemisia cetona, artemisia alcohol, β -carboxileno y 1,8-cineol (Puerta, R. y col; 1996).

II.1.4.- ACCIONES FARMACOLÓGICAS Y EMPLEOS TERAPEUTICOS.

La mayoría de las aquileas presentan una acción tónico estimulante y antiinflamatoria, (Della Loggia, R. y col.; 1992) (Goldberg, A.S. y col.; 1969) (Al Hindawi, M.K. y col.; 1989) usandose ampliamente en patologías digestivas (Elgamal, M.H.A. y col.; 1990) (Font Quert, P.; 1990).

Achillea ageratum muestra una actividad antimicrobiana debida a sus aceites esenciales (Puerta, R. y col.; 1995) e igualmente se ha visto que una serie de sesquiterpenos aislados de *A. ageratum* son activos frente a las células leucemicas P-388 de ratón *in vivo* (Tozyo, T. y col; 1994).

Tambien ha sido puesta de manifiesto la actividad espasmolítica, analgésica y antipirética de esta especie (Puerta, R. y Herrera, M.D.; 1995) (Martinez, S.; 1995).

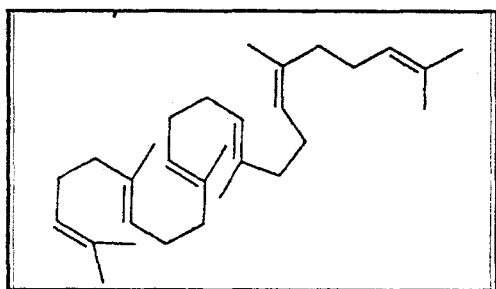
Igualmente se ha puesto de manifiesto la actividad inmunomoduladora del extracto metanólico de esta especie (Vieira, L.M. y col.; 1997a)

II.2.- TRITERPENOS Y ESTEROLES

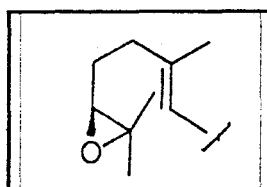
II.2.1.- TRITERPENOS

Los triterpenos constituyen un grupo muy diverso de productos naturales derivados del escualeno. Se han aislado más de 4000 triterpenos, se han identificado más de 40 tipos de esqueletos y continuamente de una forma regular se publican revisiones sobre el aislamiento de nuevos triterpenos.

En general, los triterpenos se forman por la ciclación del escualeno o del isómero (3S) 2,3-epoxi-dihidroescualeno. Con la ciclación de éste se obtienen 3 β -hidroxitriterpenos, los cuales por oxidación y reducción pueden transformarse en 3 α -hidroxitriterpenos. Sólo en bacterias (sistemas celulares libres) se forman directamente por la ciclación del isómero (3R) del 2,3 epóxido escualeno (Bouvier, P. y col.; 1980).



Escualeno



2,3-epoxi-dihidroescualeno

La formación de los diversos tipos de esqueletos puede ser ingeniosamente organizado por la ruta bioenergética del isopreno (Ruzicka, L.; 1959) en términos de la conformación adoptados por el escualeno o su 2,3 epóxido antes de la ciclación. El catión inicialmente formado

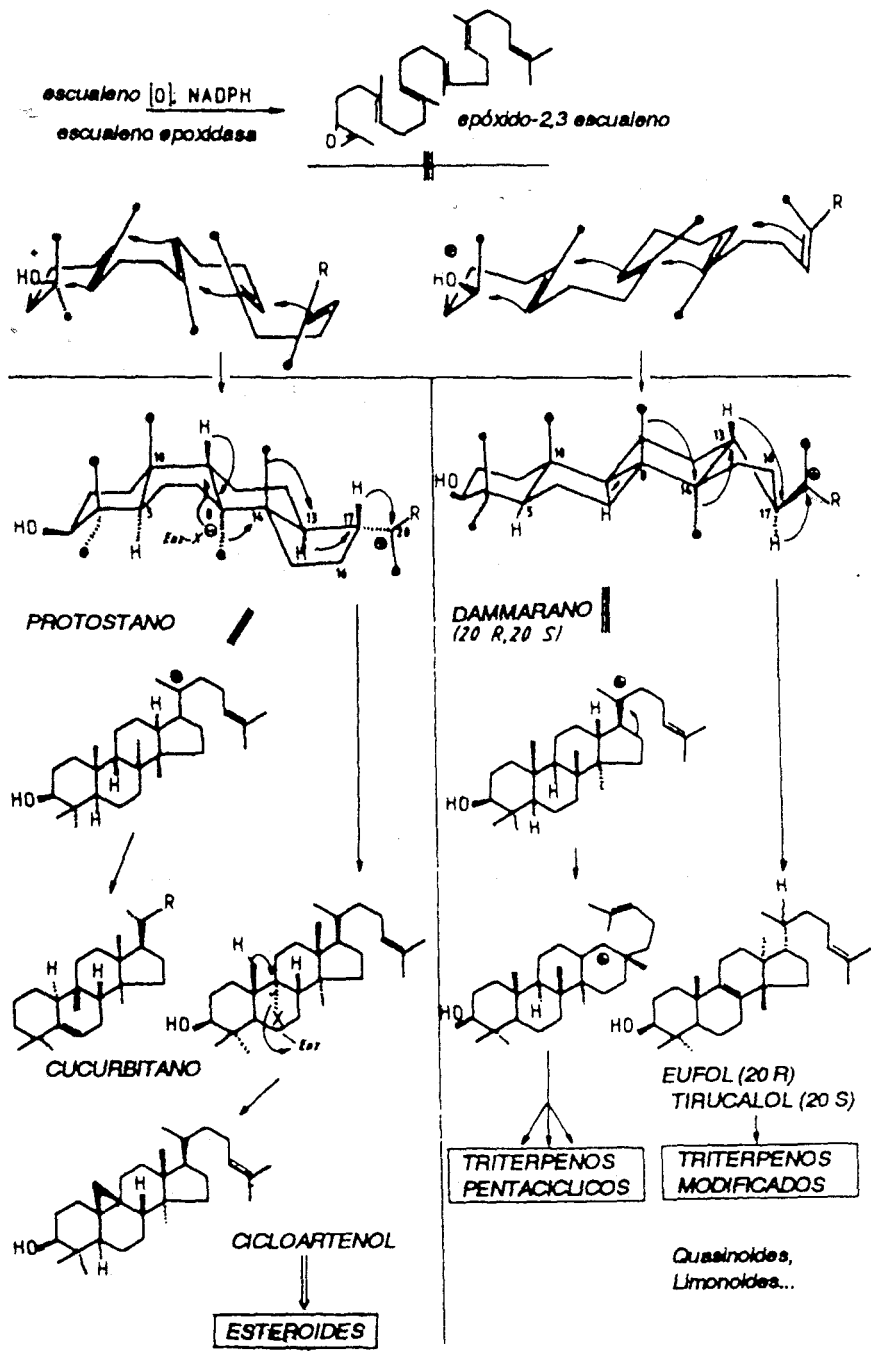


Fig 3.- Transformación del escualeno: origen de los triterpenos y esteroides

puede sufrir una serie de modificaciones, como por ejemplo las migraciones de metilos (Fig 3).

II.2.1.1.- TIPOS ESTRUCTURALES

Los triterpenos pueden ser clasificados en grupos grupos según los tipos de esqueletos, en términos de su origen biosintético (Connolly, J.D. y Overton, K.H.; 1972).

a) Protostanos, Fusiranos, Lastostanos, Cicloartanos y Curcubitanos.

A este grupo pertenecen, entre otros, algunos compuestos relacionados con los antibioticos como el ácido fusidico, y compuestos precursores de los fitoesteroles como el cicloartenol (Von Daechne, W. y col.; 1979). Tambien se han aislado del mundo marino una sapogenina con genina del tipo lanostano (Kitagawa, I. y col.; 1971).

b) Dammaranos, Eufanos y Tirucallanos.

Compuestos de este tipo se han aislado de la especie *Panax ginseng* (Tanaka, O. y Kasai, R.; 1984) y tambien algunos quasinoideos pertenecientes a la familia de las Simaroubaceas con una potente actividad citotóxica (Connolly, J.D. y Hill, R.A.; 1989).

c) Baccharanos, Sionanos, Lemmafillanos, Lupanos, Oleanos, Ursanos y derivados.

Es un grupo muy numeroso al que pertenece la mayoria de triterpenos pentaciclicos derivados del nucleo oleano, ursano, friedlano y lupano.

d) Hopanos y Tetrahidromanoles.

Son triterpenos con un grupo oxigenado en C3. A este grupo pertenecen el

tetrahidromanol, metabolito del protozoo *Tetrahymena pyriformis* y otros compuestos producidos por bacterias (Aberhart, D.J. y Caspi, E.; 1979) (Rohmer, M. y Ourisson, G.; 1976).

e) Moretanos, Neomotioles, Ferranos, Adiananos y Filicanos.

A este grupo pertenece un número limitado de compuestos de estructura pentacíclica, como adianeno y filiceno.

f) Arborinol, Estistanos y Flavicanos.

Es otro grupo minoritario, donde se encuentran algunos compuestos aislados de líquenes principalmente del género *Sticta* (Wilkins, A.L.; 1977).

g) Onoceranos, Serratanos, Ambreinos, Polipodatetranos y Malabaricanos.

En este grupo se encuentran en los que el escualeno está parcialmente ciclado como el α -polipodatetraeno (Shiojima, K. y col.; 1973).

h) Miscelaneos.

Numerosos triterpenos de este grupo han sido aislados de organismos marinos (algas, esponjas, crustaceos, etc.), aunque también se han aislado algunos representantes en el género *Iris* (Suzuki, T. y col.; 1985).

II.2.1.2.- DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA.

Los triterpenos están extendidos por todo el Reino Vegetal pero no es fácil generalizar su distribución (Pnat, P. y Rastogi, R.P.; 1979).

Los ursanos y los oleanos suelen aparecer juntos, siendo especialmente abundantes en las familias: Araliaceas, Asclepiaceas, Asteraceas, Bignoniaceas, Cactaceas, Campanulaceas, Celastraceas, Ericaceas, Fagaceas, Labiadas, Leguminosas, Fitolacaceas, Primulaceas, Rosaceas, Rubiaceas, Sapotaceas, Teaceas, Umbelíferas y Urticaceas.

Los lupanos están bastante extendidos principalmente en las familias Apocinaceas, Asteraceas, Celastreaceas, Euforbiaceas, Labiadas y Ramnaceas.

Los lanostanos, que están ampliamente distribuidos en hongos y organismos marinos, se encuentran también en las plantas superiores como por ejemplo en Ranunculaceas, Orchidaceas y Pinaceas.

Los esqueletos que están más restringidos en su distribución son los curcubitánicos de las Curcubitaceas, los serratanos de *Lycopodium* spp. y Pinaceas, los friedelanos de las Celastraceas y Buxaceas y los stignanicos en los líquenes. Los hopanos, comunes en líquenes, son también importantes constituyentes del aceite de esquisto, pudiéndolos además encontrar en las familias Fagaceas y Molluginaceas.

Los dammaranos han sido aislados en las familias Anarcadiaceas, Rutaceas y Rubiaceas,

y los quasinoídes están restringidos a la familia Simarubaceas.

II.2.2.- ESTEROLES

Los esteroides se consideran triterpenos tetracíclicos que han perdido, como mínimo, tres metilos. Bioenergéticamente, las dos series tienen un precursor común, la diferenciación se realiza precozmente en función de los impedimentos estéricos impuestos por la enzima. La proximidad de las dos series se pone en evidencia por la antigüedad (y a veces la confusión) de la nomenclatura. Así es corriente hablar de fitoesteroles para los compuestos que son triterpenos tetracíclicos.

Desde el principio de los años veinte los esteroides viene siendo el foco de numerosas investigaciones sobre actividades de productos químicos naturales, sintéticos, bioquímicos y clínicos. Las razones están muy relacionadas con la complejidad química que presentan estos compuestos y sus funciones bioquímicas en los organismos vivos.

Al principio, los esteroides presentaban muchos problemas en la elucidación de su estructura, pero gracias a las nuevas técnicas analíticas (rayos-X, cristalografía, espectroscopía de masas y resonancia magnética nuclear) se solucionaron estos problemas. En segundo lugar, los esteroides son excelentes compuestos para que los químicos orgánicos practiquen su pericia en el desarrollo de nuevas reacciones y procesos sintéticos (Gibbons, G.F. y col.; 1982). En tercer lugar, los esteroides de los animales, hongos y plantas difieren considerablemente; teniendo diferentes rutas biosintéticas dependiendo del tipo de organismo del que se trate (Benbeniste, P.; 1986). En cuarto lugar, la formación de esteroides ha contribuido a la mayoría de las

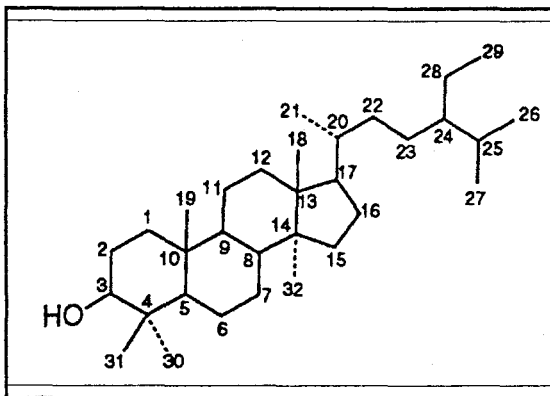
investigaciones detalladas sobre la estereoquímica de varias reacciones biosintéticas, las cuales han requerido de una gran imaginación e ingenio por parte de los investigadores (Goodwin, T.W.; 1973). En quinto lugar, la función biológica de los esteroides, como constituyentes esenciales de las membranas de las células eucariotas ha sido uno de los descubrimientos más innovadores en la bioquímica de los lípidos (Gennis, R.B.; 1989). Finalmente, la implicación de la biosíntesis de esteroides anormales en el metabolismo de algunas enfermedades humanas, como la arterioesclerosis, han proporcionado un ímpetu de recientes investigaciones a los enzimólogos, biólogos moleculares y clínicos. Estos trabajos han despejado el mecanismo de regulación de la biosíntesis de esteroides, el transporte de esteroides en lipoproteínas y la relación del metabolismo de los esteroides con otros lípidos (Goldstein, J.L. y Brown, M.S.; 1990).

A pesar de que los comentarios anteriores revelan principalmente la intensidad de las investigaciones en la bioquímica de los esteroides en mamíferos, hay también considerables esfuerzos en el desarrollo de investigaciones de esteroides en hongos, algas, plantas superiores y organismos marinos.

II.2.2.1.-TIPOS ESTRUCTURALES

Los esteroides en general poseen una estructura base común, y en función de ésta y según los sustituyentes que posean podemos clasificarlos en:

- a) 4,4-Dimetilesteroides
- b) 4 α -Metilesteroides
- c) Esteroides



Estructura base de los esteroides.

II.2.2.2.-DISTRIBUCIÓN EN LA NATURALEZA

Los primeros esteroides que se aislaron de plantas superiores y hongos guardan un parecido estructural con el colesterol. Entre estos se encuentran el sitosterol aislado del grano de trigo, estigmasterol del haba de calabar (*Physostigma venenosum*) y ergosterol en el cornezuelo de centeno (*Claviceps purpurea*). En general la mayoría de las plantas superiores, algas y hongos producen esteroides alquilados principalmente en el carbono C-24.

El colesterol, a pesar de haber sido encontrado en algunas plantas, raramente excede de un pequeño porcentaje de la mezcla de esteroides. Hay excepciones en algunas especies que pertenecen a la familia Solanaceas, las cuales pueden producir una cantidad considerable de colesterol acompañado de 24-metil y 2-etil esteroides (Itoh, T. y col.; 1975).

En las algas rojas (Rodoficeas) el colesterol es uno de los más abundantes, algunas veces acompañado de demosterol y 22-dehidrocolesterol y a veces acompañado de 24-alkilesteroides (Goad, L.J.; 1976).

La mayoría de los hongos Ascomycetos y Basidiomycetos producen 24-metil esteroides, siendo predominante el ergosterol. Por el contrario los miembros pertenecientes a los Uredinales producen esteroides con un grupo 24-etildien en el C-18 (Alais, J. y col.; 1976).

Los Oomicetos son un grupo de organismos muy diversos que aparentemente son incapaces de sintetizar esteroides teniendo un requerimiento obligatorio de ellos para completar

la fase sexual de su ciclo vital, por lo que deben tomarlos de otras fuentes.

Los esteroides con grupos 24β -metil o etil son generalmente considerado característicos de algas pertenecientes a las Clorofitas, Crisofitas y Euglenofitas (Patterson, G.W.; 1975); sin embargo, los 24α -esteroides se han encontrado en las Diatomeas, las cuales contienen 24α -metil-cholesta-5,22-dien-3 β -ol.

Las Dinoflageladas (Pirrofitas) han recibido una atención considerable, pudiendose pensar que contribuyen a proporcionar la mayor parte de esteroides encontrados en la cadena alimenticia marina y esto influye logicamente en el perfil de los esteroides encontrados en los animales marinos invertebrados (Withers, N.W.; 1983).

Las plantas superiores vasculares en su mayoria, contienen 24 -metil y 24 -etil esteroides, predominantemente con formas 24α . Muchas de ellas producen esteroides del tipo Δ^5 como el campesterol, sitosterol y estigmasterol, pero algunas están más predispuestas a acumular esteroides del tipo Δ^7 como el espinasterol (Fenner, G.P. y col.; 1986), aunque las últimas técnicas han demostrado la presencia de epimeros 24β , particularmente 24β -metilesteroides acompañado de 24α -esteroides.(Nes, W.R. y col.; 1975).

En los últimos años se han realizado análisis intensivos de los organismos marinos, tales como esponjas, corales, etc., los cuales han revelado la existencia de nuevos esteroides con alquilaciones en posiciones diferentes a las habituales (Dejrassi, C.; 1981).

II.3.-INFLAMACIÓN

El término inflamación aparece por primera vez en el papiro de Smith que se remonta al año 1650 a J.C. Posteriormente Hipócrates (460-380 a J.C.), lo denominó "phlegmone" (algo caliente) y años después Galeno (100 a J.C.) describió con términos clínicos los principales síntomas de la inflamación: rubor, dolor, tumor y calor.

A finales del siglo XIX con la llegada de la experimentación animal Cohnheim (1867) escribió un tratado sobre el proceso inflamatorio usando como modelo experimental la membrana mesentérica de rana. A partir de este momento, el proceso inflamatorio ha sido ampliamente estudiado llegándose a la conclusión de que la respuesta es esencialmente similar en las distintas especies animales utilizadas, y que numerosos componentes y mediadores celulares (macrófagos, histamina, bradikinina, prostaglandinas, leucotrienos, etc.) están íntimamente implicados.

II.3.1.- CARACTERÍSTICAS DEL PROCESO INFLAMATORIO

La inflamación es un proceso que ocurre como consecuencia de un daño celular.

De forma simplificada, en la inflamación puede considerarse una fase aguda caracterizada por vasodilatación y aumento de la permeabilidad capilar, y una fase crónica en la que se produce la infiltración tisular por leucocitos y células fagocíticas, finalizando en degeneración y fibrosis tisular.

Por tanto, la reacción inflamatoria es un mecanismo vital de defensa, destinado a focalizar los medios inmunológicos protectivos en una región localizada dentro del tejido.

-Mecanismo de formación de la inflamación.

Pocas horas después de producido el daño tisular o la infección, se observa enrojecimiento intenso, edema y dolor alrededor del tejido dañado.

Este proceso (Fig 4) se inicia con una constricción local momentánea de arteriolas seguida de dilatación de los vasos locales, produciéndose un gran incremento de flujo sanguíneo en la zona afectada, que puede durar de varios minutos a muchas horas.

Mientras los vasos sanguíneos están dilatados, hay un incremento de la permeabilidad vascular, que produce una exudación del plasma rico en proteínas al tejido, causando edema e hinchazón. A veces el flujo sanguíneo disminuye y retorna de forma gradual a la situación normal.

A las pocas horas de que aparezcan los cambios vasculares los neutrófilos, eosinófilos y eventualmente los monocitos, comienzan a adherirse al endotelio vascular en un proceso llamado de "pavimentación". Si los vasos sanguíneos se encuentran seriamente dañados, las plaquetas pueden adherirse a la paredes de los mismos liberando sustancias vasoactivas y coagulantes (Tromboxanos, 12HETE); los leucocitos comienzan a migrar por los espacios intracelulares de las células endoteliales con un movimiento vectorial en presencia de un gradiente de concentración de los factores quimiotácticos y casual si falta dicho gradiente. Esta acción puede

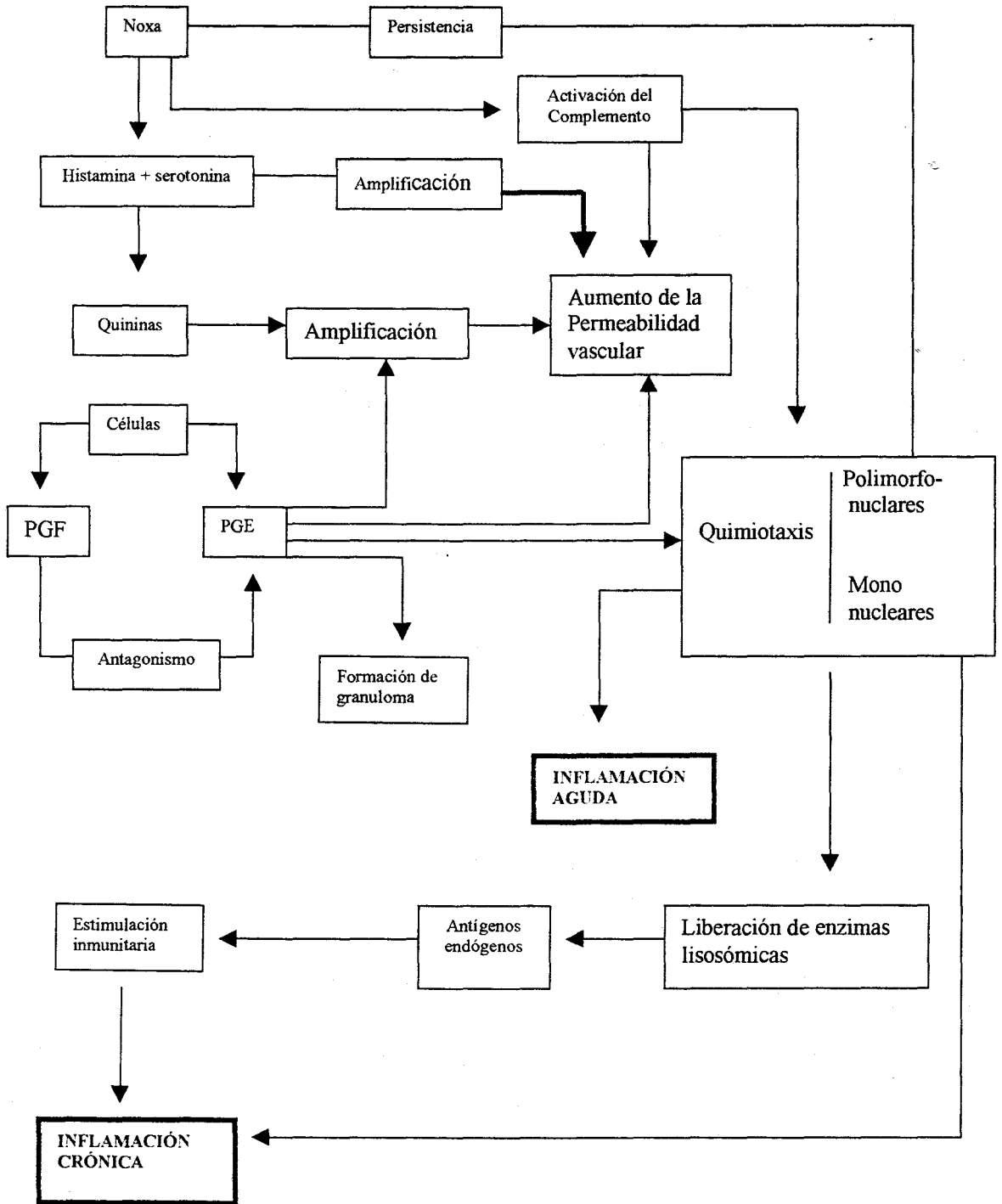


Fig 4.- Patogenia del proceso inflamatorio (Chiesa , J.A. et Petersen, C.B.; 1983).

ejercerse por vía directa, o mediante la activación del sistema complemento a través de la vía clásica o alterna. De los componentes del complemento los factores C3a y C5a (péptidos derivados de C3 y C5 respectivamente), están dotados de un poder quimiotáctico muy notable, aunque los factores C5, C6 y C7 pueden también desarrollar actividad quimiotáctica. Los neutrófilos y eosinófilos son los más móviles de todos los leucocitos y, por lo tanto, estas células son las primeras en llegar al tejido; los monocitos sanguíneos son más lentos y llegan más tardíamente.

Una vez en el tejido, los leucocitos son atraídos por factores quimiotácticos al sitio de invasión bacteriana o tejido dañado. Allí proceden a fagocitar y destruir el material extraño y, en el caso de los monocitos, a remover las células muertas (Florez, J. y Reig, E.; 1993).

- Generación de mediadores lipídicos:

En muchos sistemas celulares el estímulo de los receptores de membrana superficial provoca metilación de los fosfolípidos, activación de fosfolipasas, liberación de ácido araquidónico, y posterior oxidación de dicho ácido por vías lipooxigenasa y ciclooxigenasa. En la inflamación, la ocupación de los receptores de superficie por quimiotactivos, opsoninas (IgG en los complejos de anticuerpo, C3b) u otros agentes, da lugar a estas reacciones en granulocitos, monocitos-macrófagos, mastocitos, plaquetas y células endoteliales. Es probable que las reacciones de metilación sean las mismas para todas estas células, sin embargo, los principales productos finales de la oxidación del ácido araquidónico: prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos y otros derivados de hidroperoxi-ácidos, pueden ser diferentes.

La metilación de fosfolípidos tiene lugar a los pocos segundos de la estimulación de los receptores de la membrana superficial. Comienza en la superficie citoplasmática donde un enzima denominada metiltransferasa I cataliza la transferencia de un grupo metilo de la 5 adenosil metionina a la fosfatidiletanol amina. En el curso de la reacción el sustrato es traslocado a la superficie plasmática de la membrana donde, catalizada por un segundo enzima, metiltransferasa II, se agregan al fosfolípido otros dos grupos metilo para dar fosfatidilcolina. De acuerdo con estudios realizados en mastocitos de rata, estas reacciones de metilación están vinculadas, pero no preceden al ingreso de calcio extracelular en la célula y la siguiente activación de la fosfolipasa A₂. La activación de la fosfolipasa A₂ libera ácido araquidónico de la fosfatidil colina y produce también la formación de lisofosfatidilcolina (Fig 5), sustancia con propiedades de tipo detergente que podría intervenir en la fusión de las membranas de los orgánulos con las membranas plasmáticas durante la desgranulación.

También es activada otra fosfolipasa, la fosfolipasa C, cuando son estimulados los leucocitos o las plaquetas. Se diferencia de la fosfolipasa A₂ por su independencia del calcio y porque se usa como sustrato del fosfatidil inositol (PI), del cual desdobla el éster fosfato para formar diacil glicerol. Este último es convertido entonces en monoglicerol y ácido araquidónico, o ácido fosfatídico (PA), el cual puede ser reciclado a PI. Estudios in vitro con liposomas demuestran que el ácido fosfatídico actúa como un ionóforo del calcio y que el ciclo PI-PA-PI podría actuar como "compuerta" para regular el flujo de calcio a través de la membrana superficial de células estimuladas. La contribución relativa de la fosfolipasa A₂ y la fosfolipasa C a la liberación del ácido araquidónico parece que varía en diferentes células. Los granulocitos neutrófilos pueden utilizar principalmente fosfolipasa A₂, mientras que las plaquetas aparentemente utilizan ambas fosfolipasas (Rang, H.P. y Dale, M.H.; 1992).

La oxigenación del ácido araquidónico por medio de la vía ciclooxigenasa (Fig 6) produce la formación de endoperóxido PGG₂, que luego es reducido a PGH₂. En esta reacción se libera oxígeno reactivo, utilizado en diferentes células, para producir prostaglandinas y tromboxanos. Las principales prostaglandinas formadas por granulocitos, monocitos y mastocitos son PGE₂ y PGD₂.

Las prostaglandinas que producen incremento del AMPc (PGE₂, PGD₂ y PGI₂) participan en la última fase de la inflamación: pérdida de la función celular a través de la respuesta inmune.

Por otra parte, las lipooxigenasas son enzimas que catalizan la vía de conversión del ácido araquidónico en hidroperóxidos no cíclicos (HPETE) (Fig 7)

En los distintos sistemas celulares existen lipooxigenasas específicas que dan origen a diversos mediadores lipídicos: la 5-lipooxigenasa predomina en basófilos polimorfonucleares y macrófagos dando origen al hidroperóxido 5-HPETE; la 12-lipooxigenasa da origen a 12-HPETE en plaquetas, páncreas y glomerulo renal; y la 15-lipooxigenasa en reticulocitos, eosinófilos y linfocitos T, dando origen a 15-HPETE (Cedric, M. y col.; 1992).

Los leucocitos, a partir exclusivamente del 5-HPETE, forman una familia de ácidos 5-hidroxieicosatetraédricos llamados leucotrienos.

La importancia biológica de los leucotrienos C_4 , D_4 y E_4 como mediadores químicos de la inflamación en el lecho microvascular, producen exudación de plasma de las vénulas poscapilares, con una eficacia 100 veces mayor que la histamina. El aumento de permeabilidad producida por estos leucotrienos es directo sobre las célula endoteliales, ocurre rápidamente y no requiere liberación de histamina, prostaglandinas, ni presencia de polimorfonucleares, contribuyendo así a la presencia de uno de los signos cardinales del proceso inflamatorio (Luis Chiesa, J.A. y Petersen, A.C.B.; 1983).

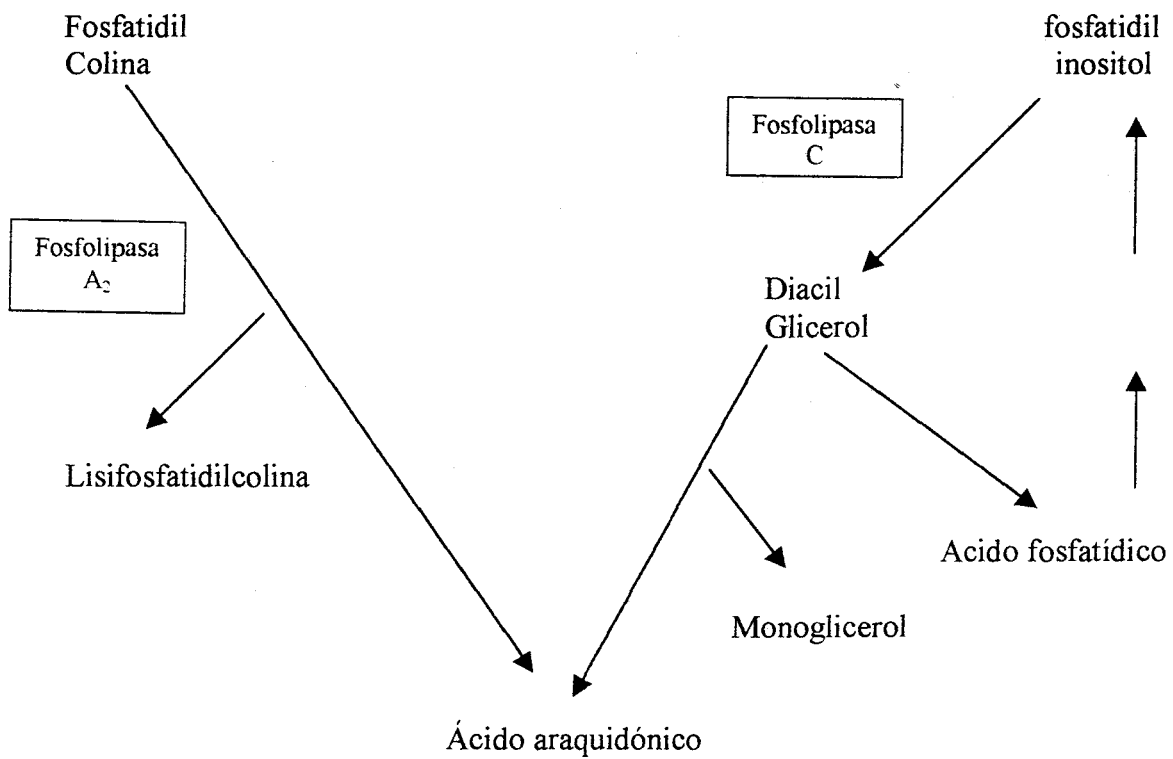


Fig 5.- Mecanismos de liberación del ácido araquidónico de los fosfolípidos de membrana. También se ilustra el reciclaje del ácido fosfatídico a fosfatil inositol.

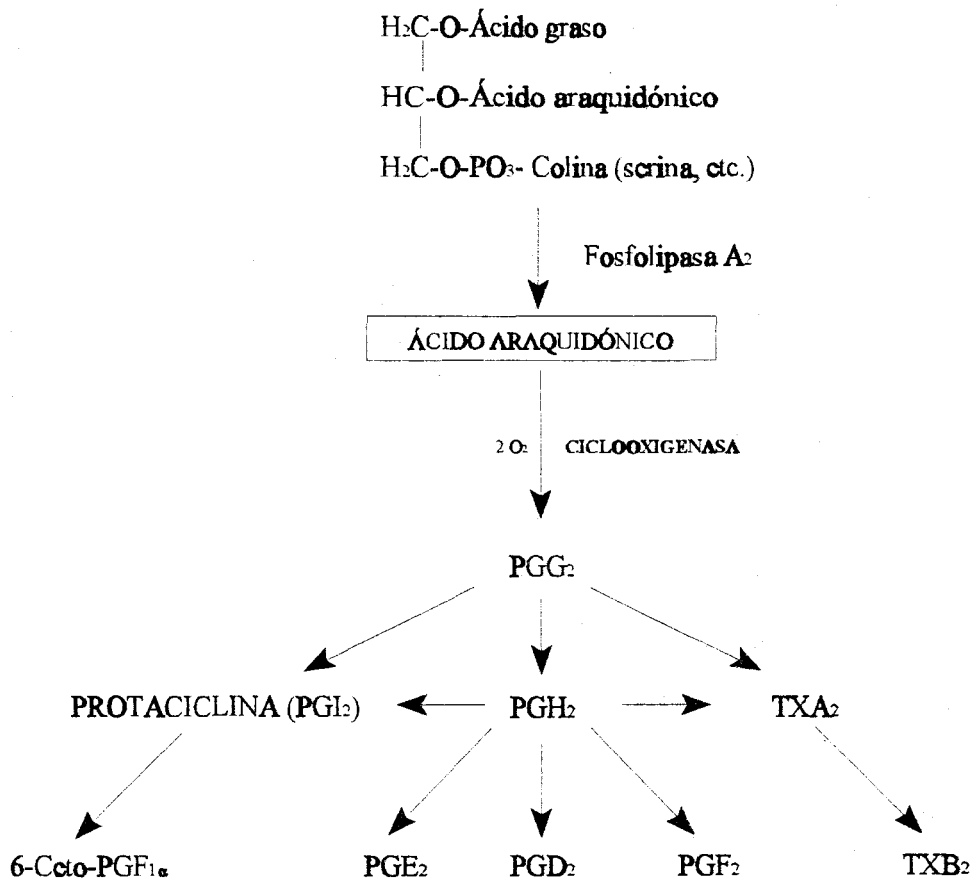


Fig 6.- Biosíntesis de los derivados del ácido araquidónico producidos por ciclooxigenación.

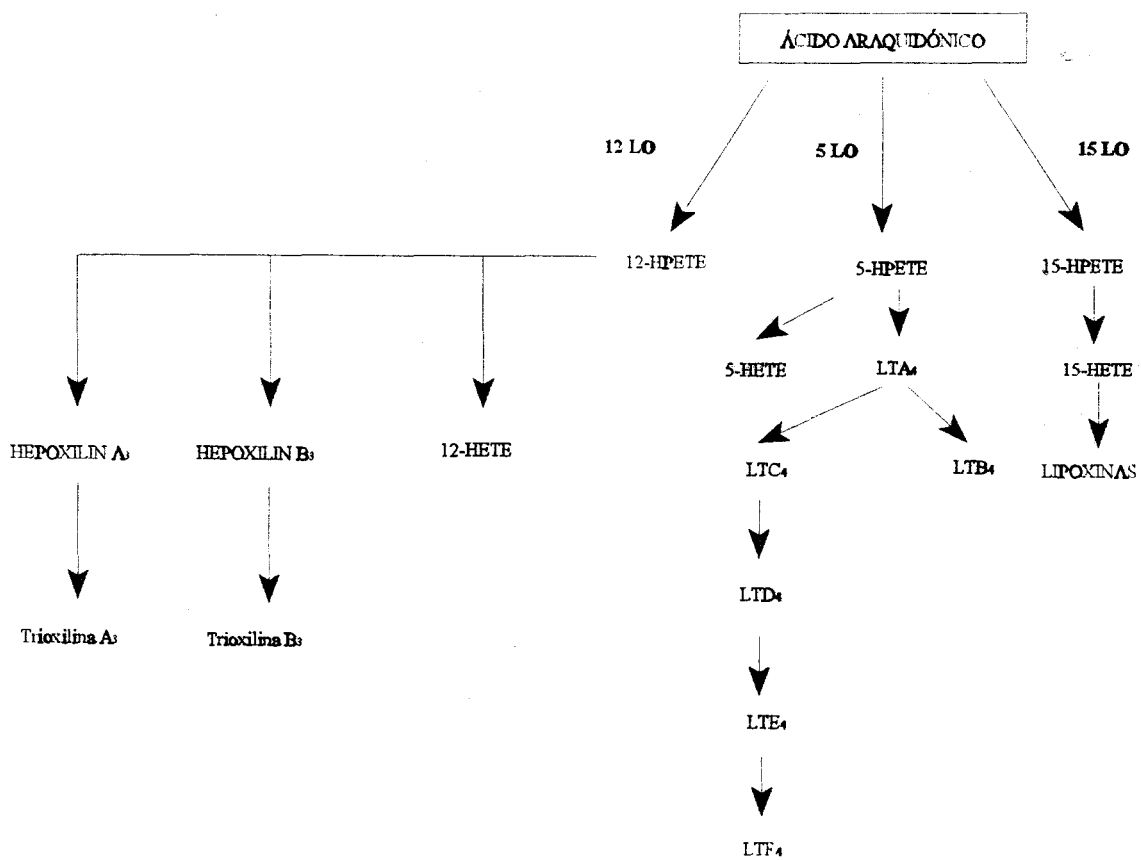


Fig 7.- Biosíntesis de los derivados del ácido araquidónico producidos por lipooxigenación.

IL3.2.-ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA DE LOS ESTEROIDES

Los glucocorticoides, esteroides con una poderosa acción antiinflamatoria, sea cual fuere la causa de la inflamación (infecciosa, química, física o inmunológica), pueden inhibir tanto las manifestaciones inmediatas de la inflamación (rubor, dolor, etc.) como las tardías, entendiendo por tales , ciertos procesos de cicatrización y proliferación celular. Inhiben la vasodilatación vascular, reducen la transudación líquida y la formación del edema, disminuyen el exudado celular y reducen el depósito de fibrina alrededor del área inflamada.

La respuesta de estos es tan intensa, que los glucocorticoides se consideran los antiinflamatorios más eficaces.

Varios son los mecanismos responsables. En primer lugar, reducen la acumulación de leucocitos en el foco inflamatorio; facilitan la liberación de neutrófilos a partir de la médula ósea y su paso a la circulación, inhiben la liberación de monocitos y eosinófilos reduciendo la actividad de alguna de estas células. Así , disminuyen la capacidad de liberar histamina por parte de los basófilos y mastocitos, reducen la activación de los macrófagos y la liberación de metabolitos tóxicos del oxígeno e inhiben la síntesis y secreción de interleucina 1 (IL-1) en los macrófagos. Todo ello repercute en una acción bloqueadora sobre la cascada de reacciones lesivas que se ponen en marcha en los procesos inflamatorios.

Se ha demostrado también que los glucocorticoides inhiben la inducción de la NO-sintasa, enzima responsable de producir NO en macrófagos activados y en endotelio vascular; además inhiben la producción de procolágeno en los fibroblastos y en otras células debido a la inhibición

de la expresión del gen de transmisión.

- Mecanismo de acción

Los efectos biológicos de los corticoides están, en su mayoría, mediados por la activación de receptores intracelulares. Los corticoides difunden pasivamente a través de la membrana celular, en el interior de la célula se unen a receptores citoplasmáticos de alta afinidad y especificidad, formando un complejo corticoide-receptor que posteriormente se traslada al núcleo, donde se une a la cromatina modificando la tasa de transcripción del DNA, y por tanto, la síntesis proteica (Fig 8). Esta es la base de las llamadas "acciones genómicas" de los glucocorticoides (Alexis, M.N.; 1987).

El receptor corticoesteroide posee tres centros activos: 1) de unión con el esteroide, 2) de unión con la cromatina nuclear y 3) centro inmunoreactivo, que actúa modulando la interacción con el DNA.

Al unirse con el esteroide se produce una modificación conformacional en el receptor, de manera que quede expuesto al exterior el lugar de unión de unión la material nuclear. El complejo se traslada al núcleo e interacciona con sitios control "específicos" de genes sensibles a esteroides, pudiendo tanto incrementar como disminuir la tasa de transcripción genética. En el caso de estimulación de la síntesis proteica se produciría un incremento de la síntesis de ARNm. Las proteínas formadas son las mediadoras de la mayoría de las acciones de los corticoides. Además parece que los corticoides también influyen en el procesamiento postranscripcional de las proteínas (Firestone, G.L. y col.; 1980)

También se ha descrito acciones "no genómicas" de los corticoides. En algunos modelos experimentales los corticoides inducen efectos de aparición rápida que no parecen mediados por modificaciones en el DNA. Estos efectos se producirían a través de modificaciones en la permeabilidad iónica de la membrana celular y a este grupo de efectos de membrana parece que se debe gran parte de la retroalimentación negativa de los corticoides en el hipotálamo y otros efectos centrales (McEwen, B.S.; 1991).

A través de sus acciones nucleares, los corticoides inducen la síntesis y liberación de una familia de proteínas cuyas acciones median gran parte los efectos corticoesteroides. Las lipocortinas son "licoproteínas" que inhiben la síntesis de eicosanoides por antagonizar la acción de la fosfolipasa A_2 impidiendo así la liberación del ácido araquidónico a partir de los fosfolípidos de membrana celular. Parece haber un *pool* intracelular de lipocortina en el interior de algunas células. Los corticoides tendrían una acción dual, causando una rápida liberación de ese *pool* (en 1-2 h), así como un efecto posterior inducido por un incremento de la síntesis de lipocortinas (3-6 h) (Flower, R.G.; 1981).

La acción antifosfolipasa A_2 de la lipocortina produce una inhibición de la síntesis de prostaglandinas y leucotrienos, algunos de los cuales son potentes sustancias proinflamatorias. La lipocortina también interfiere con la síntesis del factor activador plaquetario (PAF) y está implicado en la formación de factores de Ig E, que inhiben la respuesta mediada por esta inmunoglobulina, de manera que las lipocortinas podrían constituir un mecanismo fisiológico endógeno en el control de la respuesta inflamatoria (Vede, T. y col. ; 1983). Pero no todos los efectos biológicos de los corticoides se deben a las acciones de las lipocortinas.

Estructuralmente, los corticoides se caracterizan (como su nombre indica claramente) por la presencia de un núcleo esteroídico, derivado del ciclopentanoperhidrofenantreno, con disposición espacial todo-TRANS. Existen una serie de condiciones espaciales (estéricas y electrónicas) indispensables para la existencia de la actividad. En primer lugar, es imprescindible la presencia de un grupo carbonilo en C3 y una insaturación en 4-5. Además debe haber dos grupos metilos en C10 y C13 que deben situarse por encima del plano teórico del núcleo. Un grupo hidroxilo en C11, que puede ser sustituido por un halógeno, aunque algunos corticoides en lugar del hidroxilo en C11 tienen un grupo carbonilo (cortisona y prednisolona); estas formas son inactivas, precisando de la transformación metabólica de ese grupo en el correspondiente hidroxilo. En posición C17 (por debajo del plano) debe haber un grupo hidroxilo. Finalmente, en C21 tiene que haber un grupo hidroxilo esterificable o sustituible por un halógeno.

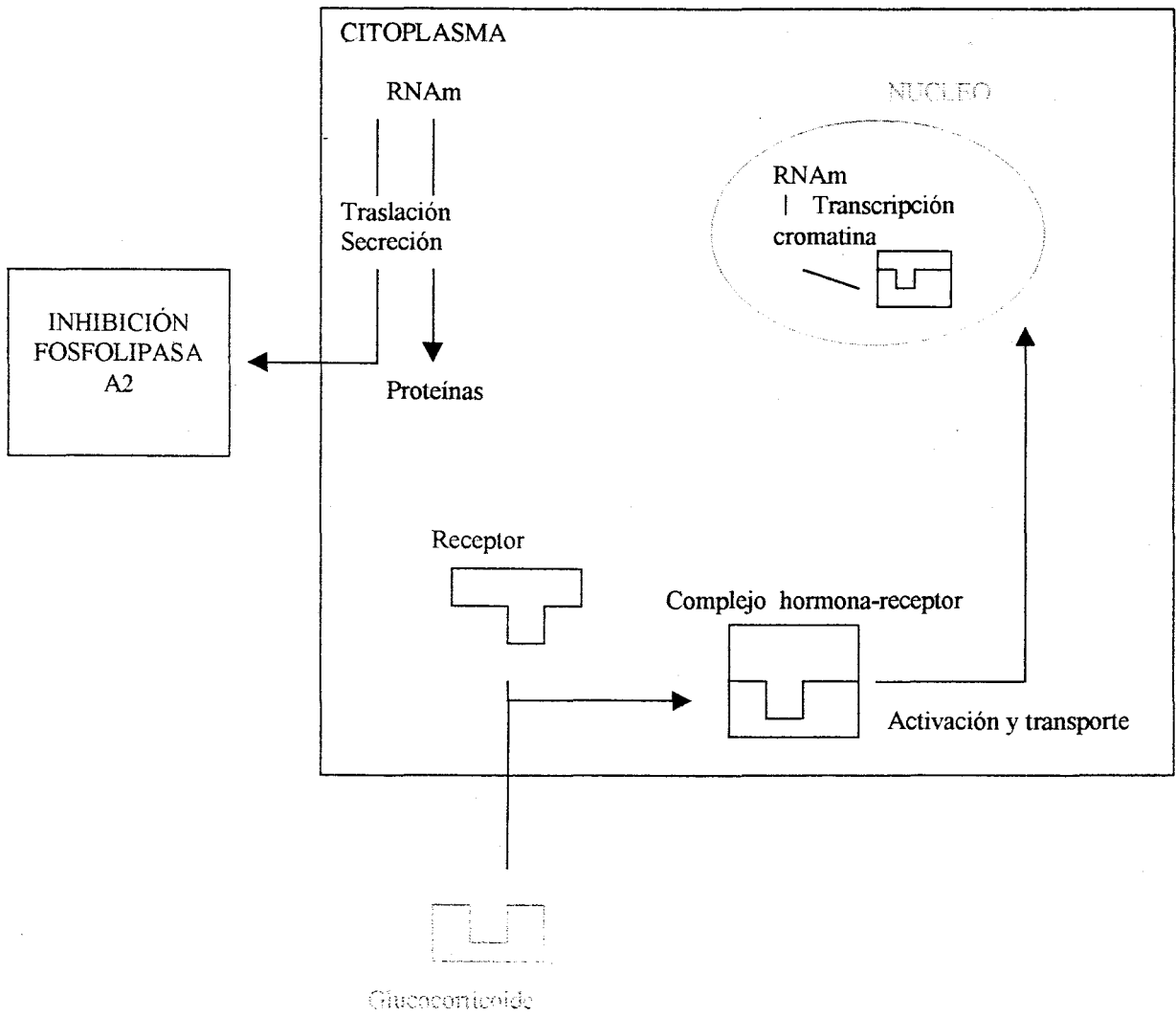


Fig 8.- Representación esquemática del mecanismo de acción de los corticoides.

II.3.3.-TRITERPENOS Y ESTEROLES CON ACTIVIDAD

ANTIINFLAMATORIA.

Los triterpenos y esteroides aislados en los últimos años, con probada actividad antiinflamatoria se detallan a continuación:

- Hederagenina (Recio, M.C. y col.; 1995).
- Eritrodiol (Recio, M.C. y col.; 1995).
- Ácido α -glicirricético (Recio, M.C. y col.; 1995).
- Ácido β -glicirricético (Recio, M.C. y col.; 1995).
- Ácido oleoico (Recio, M.C. y col.; 1995).
- Ácido tormentico (Recio, M.C. y col.; 1995).
- Uvaol (Recio, M.C. y col.; 1995).
- Faradiol (Della Loggia, R. y col.; 1994).
- ψ -Taraxasterol (Della Loggia, R. y col.; 1994).
- Lupeol (Della Loggia, R. y col.; 1994)(Recio, M.C. y col.; 1995).
- Taraxasterol (Della Loggia, R. y col.; 1994).
- Prednisolona (Hong, D. y col.; 1994).
- α -Amirina (Kweifookai, G. y col.; 1994).
- Palmitato de α -amirina (Kweifookai, G. y col.; 1994).
- Linolato de α -amirina (Kweifookai, G. y col.; 1994).
- 6-Metoxicarbonilprednisolona (Hong, D. y col.; 1994).
- 21-ol-acetato de la 6-metoxicarbonilprednisolona (Hong, D. y col.; 1994)

- 7,21-diol-acetónido de la 6-metilcarboxiprednisolona (Hong, D. y col.; 1994).
- Stigmast-4-ene-3,6 dione (Probstle, A. y col.; 1993).
- Ácido 2 α , 3 α - dihidroxiolean-5, 12-dien-28-oico (Chawla, A.S.; 1992).
- Ácido 2 β , 3 α - dihidroxiolean-5, 12-dien-28-oico (Chawla, A.S.; 1992).
- β -Sitosterol- β -D-glucopiranososa (Handa, S.S. y col.; 1992).
- Stigmasterol- β -D-glucopiranososa (Handa, S.S. y col.; 1992).
- α -Spinasterol (Handa, S.S. y col. ; 1992).
- Ácido 3 β , 6 β , 19 α - trihidroxiurs-12-en-28-oico (Aquino, R. y col.; 1991).
- Metil 11 β , 17 α -trihidroxi-3, 20-dioxopregna-14-dien-16 α -carboxilato (Heiman, A.S. y col.; 1990).
- 22,23-Dihidroxiestigmasterol (Benzanger-Beauquesne, L.; 1982).
- β -Sitosterol (Benzanger-Beauquesne, L.; 1982).
- Ácido ursólico (Cappalletti, E.M. y col.; 1982) (Kuo Hsiung, L. y col.; 1987).
- Acetato de α -amirina (Chatuverdi, A.K. y col.; 1974).
- Acetato de β -amirina (Chatuverdi, A.K. y col.; 1974).
- Friedlina (Chatuverdi, A.K. y col.; 1974).
- Friedlan-3 β -ol (Chatuverdi, A.K. y col.; 1974).

II.4.- CÁNCER

Los primeros indicios sobre la existencia del cáncer en el hombre se remontan a los escritos de los antiguos griegos y persas. Lógicamente no ha sido posible investigar la presencia de tumores en tejidos blandos en los antiguos cadáveres, pero algunos de los esqueletos descubiertos en Egipto presentaban deformaciones óseas similares a las producidas por los cánceres de hueso.

Copsarow (1952) citó tres referencias del Antiguo Testamento en las que se mencionaba una enfermedad que posiblemente fuera cáncer, así, por ejemplo, en el libro segundo de las crónicas, 21, 18-19, puede ser que se hable de cáncer intestinal, siendo significativo el hecho de que esta enfermedad se considerase como "incurable". En el año 300 a. J.C. ya se conocía el fatal desenlace producido por el cáncer y se diferenciaba de los tumores benignos tales como el carbunco y las úlceras. Se trataba, siempre que fuera posible, con la extirpación o bien con pomadas arsénicas o similares de acción corrosiva.

Arquímedes de Apamea, contemporáneo del famoso Aurelio Cornelio Celso (25 a de J.C. - 50 d. de J.C.), perfeccionó el método para la amputación de los miembros, efectuaba histerectomías y llegó a operar carcinomas de mama. Claudio Galeno (131-203) creía que el cuerpo humano contenía cuatro fluidos importantes: la sangre del corazón, la flama de la cabeza, la bilis amarilla del hígado y la bilis negra del bazo. El equilibrio entre estos cuatro fluidos se consideraba de una gran importancia para la salud del individuo, de forma que su alteración era causa de enfermedad.

La sugerencia de Galeno de que el cáncer era el resultado de un exceso de bilis negra se mantuvo a lo largo de todas las épocas bárbaras.

Con el descubrimiento del microscopio y el impulso vitalizador del Renacimiento sobre la ciencia experimental, las nuevas teorías, basadas en la observación, sustituyeron rápidamente a las antiguas. Rudbeck, en 1652, describió por primera vez los vasos linfáticos, y con este descubrimiento nació la teoría del origen linfático del cáncer, lo cual no es sorprendente si se considera que muchos tumores suelen propagarse por medio de la circulación de la linfa.

Así mismo, se comprendió el papel que juega la irritación tanto química como mecánica en la producción y exacerbación del cáncer; observación ésta, que se intensificó enormemente gracias a los estudios de Percival Pott sobre los canceres de escroto en los deshollinadores.

El establecimiento por Schwann (1838) de la estructura celular y las características del "neocrecimiento" de los tumores sugirió que los canceres podían derivar de las células germinativas que se encuentran esparcidas entre los elementos de los tejidos normales.

Con el descubrimiento de las bacterias comenzaron, como era de esperar, las afirmaciones de que tal o cual bacteria era causa del crecimiento tumoral. Después de las bacterias, consideradas como organismos subcelulares productores de la enfermedad, aparecieron los virus, más pequeños y más difíciles de descubrir que las bacterias pero que, por supuesto, fueron igualmente considerados como la "*causa*" del cáncer.

Las últimas décadas del siglo XIX se caracterizaron por el estudio detallado de la estructura celular de los tumores y la elucidación de las células de las cuales procedían.

Las primeras cinco décadas de este siglo se han distinguido por un gran auge en la investigación de la estructura interna de las células, forma de responder a las sustancias tóxicas y a las agresiones, etc, y por un énfasis en el intento de solución al problema del cambio de una célula normal en una anormal (cancerosa) que sólo puede hallarse en el interior de la célula misma.

II.4.1.- CARACTERISTICAS DEL PROCESO CANCEROSO.

La verdadera causa de que en un organismo aparezca un cáncer parece residir en un cambio en el comportamiento biológico de alguna de las células que constituyen dicho organismo. Si bien estas células se habían comportado hasta el momento de una forma consecuente con la vida del organismo, obedeciendo las "reglas" del crecimiento y de la diferenciación, de pronto dejan de responder a tales indicaciones y se lanzan hacia un proceso desordenado de mayor división, a una invasión de los tejidos adyacentes normales, e incluso a la migración (metástasis) a través del torrente circulatorio y de los conductos linfáticos hacia otras partes del cuerpo.

Existen diversos tipos de células que constituyen el organismo animal o humano. Del mismo modo hay diferentes tipos de cáncer: el cáncer no es una enfermedad, si no toda una familia de enfermedades relacionadas entre sí.

La proliferación neoplásica se caracteriza por la aparición de las clonas celulares que se reproducen con aparente insensibilidad a los mecanismos de regulación del crecimiento celular.

Todas las células se reproducen siguiendo una serie de fases que se repiten periódicamente y que reciben el nombre de Ciclo Celular (fig 9).

Fase G₁. Intervalo comprendido entre la terminación de la mitosis y el comienzo de la síntesis de DNA; hay células en periodo de latencia que no se preparan para la reproducción celular y se encuentran en una subfase de G₁, denominada G₀.

Fase S. En la que tiene lugar la síntesis de DNA, dura de 6-8 horas.

Fase G₂. En la que tiene lugar la síntesis de proteínas, pero no de DNA, dura 2 horas

Fase M, o periodo de mitosis, subdividido en profase, metafase, anafase y telofase; se separan los cromosomas y se reparten entre las dos células hijas.

Las células en reposo quedan en la fase G₁, aunque también se han encontrado en la fase G₂. El tiempo que dura el ciclo completo se llama "tiempo de generación".

Aún no se conocen bien los mecanismos por los cuales las células en reposo prosiguen el ciclo reproductivo, pero se considera que este suceso ocurre al azar cuando el nivel de metabolitos, necesarios para sintetizar DNA, alcanza en una de sus oscilaciones un valor crítico o umbral.

Cuando se alcanza una masa crítica, el conjunto de células deja de multiplicarse. Estos mecanismos no parecen actuar en la proliferación cancerosa; el crecimiento tumoral como el de los tejidos normales (por ejemplo el feto humano) se desarrolla según una curva Gompertz, que consiste en una disminución exponencial de una función exponencial: el crecimiento inicial es exponencial y durante esta fase logarítmica la fracción de crecimiento es elevada, el tiempo de

duplicación volumétrica es breve y un gran número de células es sensible a los fármacos cicloespecíficos y fase específicos (Fig 10)

Por otra parte, la población celular de los mamíferos adultos puede subdividirse según el tipo de renovación en tres grupos o compartimentos principales:

- * Células en proliferación continua: células epidermiales, células precursoras del sistema hematopoyético, etc.

- * Células en proliferación discontinua: hepatocitos, osteocitos, etc.

- * Células no proliferativas: neuronas y células musculares, etc.

El tipo de célula es importante, ya que está relacionado con la sensibilidad a distintos agentes (Fig 11).

El cáncer puede ser causado por agentes físicos, químicos o biológicos. Estos agentes lesionan o alteran el DNA, de modo que el cáncer es una verdadera enfermedad del genoma. La iniciación y promoción son fenómenos establecidos en forma rotunda en carcinogénesis química. Es probable que el inicio sea un daño en el DNA, pero los mecanismos requeridos para la promoción no se han establecidos en su totalidad.

Gran parte del interés actual en el cáncer se enfoca en el estudio de oncogenes y de genes supresores del tumor.

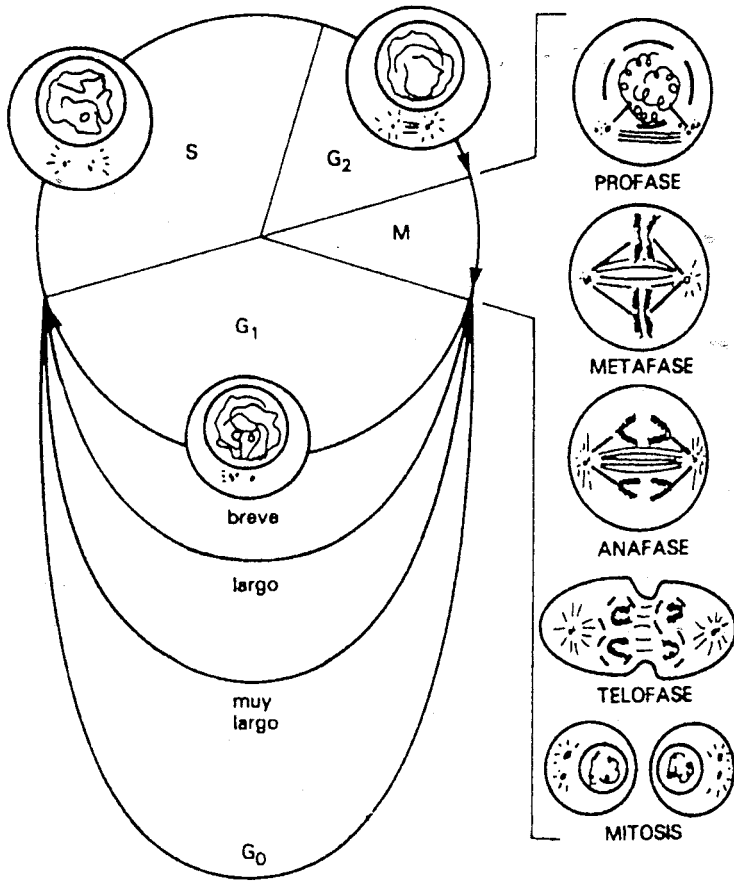


Fig 9.- Esquema del ciclo celular.

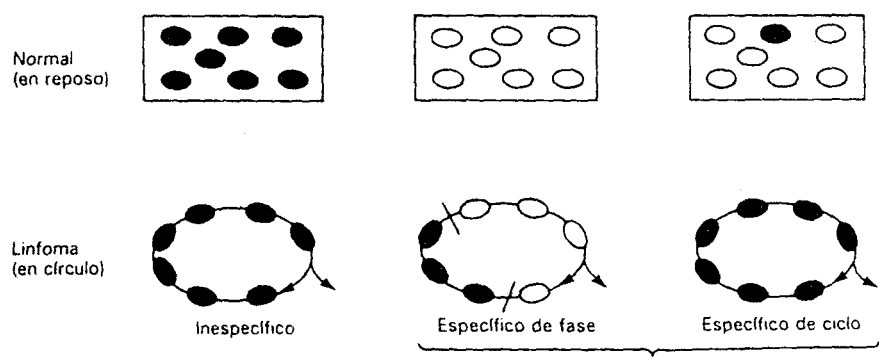
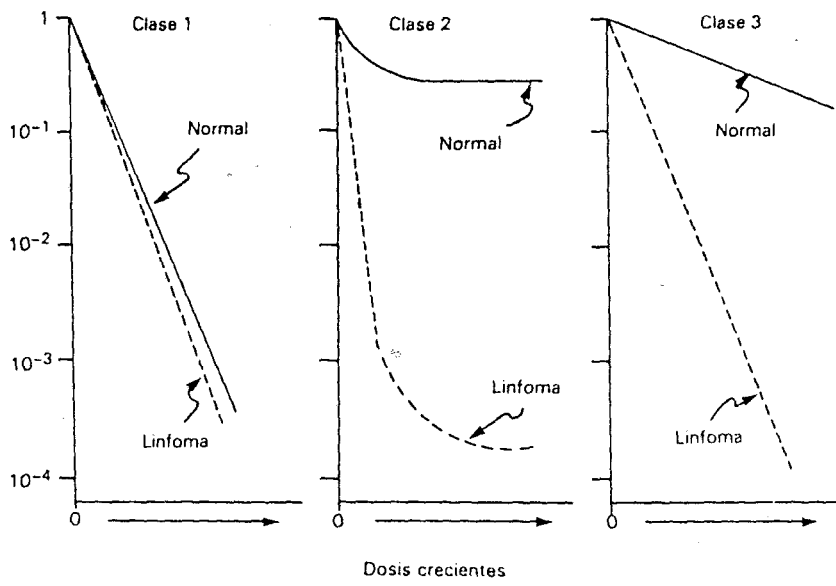


Fig 10.- Mecanismo de crecimiento celular

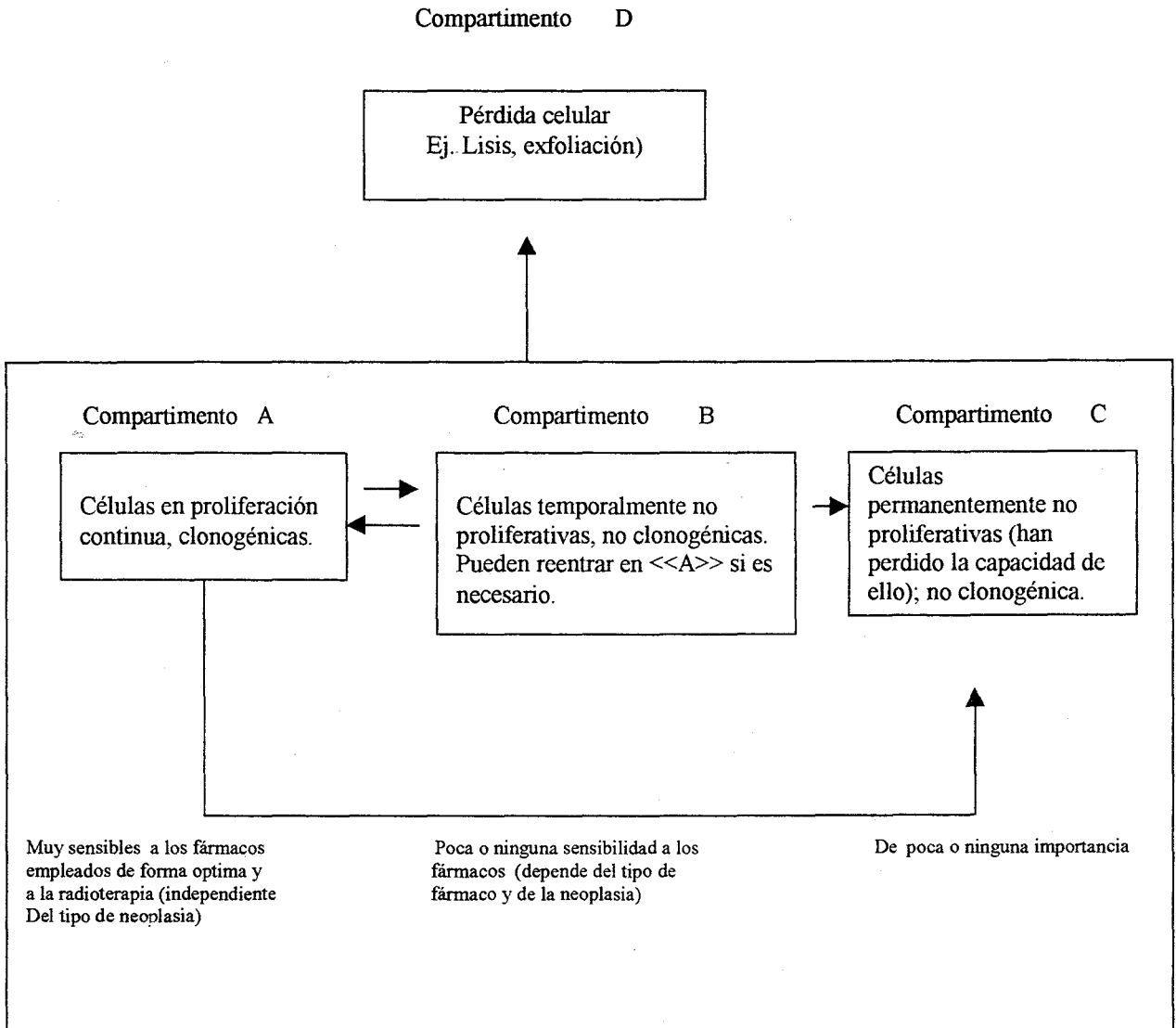


Fig 14.- Compartimentos celulares principales y su sensibilidad a los agentes antiproliferativos (Skeel, R.T. y col.; 1987).

Las células normales contienen precursores potenciales de oncogenes, designados prooncogenes. La activación de prooncogenes a oncogenes se logra, al menos, por cinco mecanismos: inserción de promotor y de amplificador, traslocación cromosómica, amplificación genética y mutación en un punto. Los oncogenes activados influyen en la multiplicación celular por perturbación de sus mecanismos normales de control de proliferación, por actuar como factores de crecimiento o receptores y quizá también por otros medios. La acción de los factores de crecimiento puede ser endocrina, paracrina o autocrina, afectan la división celular y algunos pueden ejercer efectos negativos (por ejemplo, TGF- β). Los productos de algunos oncogenes (por ejemplo, de *sis*) (Fig 12) funcionan como factores de crecimiento y el efecto de ellos sobre la proliferación celular se ha comparado con poner el pie en el acelerador de un automóvil, en tanto que la acción de inactivar los genes supresores de tumor es semejante a quitar el pie del freno. Los genes supresores de tumor más importantes son RB1 y p53, ambos codifican a fosfoproteínas nucleares y es probable que estos productos genéticos afecten a la transcripción de genes que intervienen en eventos reguladores del ciclo celular. El progreso del tumor refleja una inestabilidad del genoma tumoral.

El fenómeno de la metástasis se está investigando de forma intensa y es posible que comprenda cambios en glucoconjugados de superficie, alteración de la actividad proteasa y trastornos en moléculas de adhesividad celular. Los fármacos usados en quimioterapia de cáncer actúan en diversos *loci* bioquímicos y la resistencia a estos medicamentos es un fenómeno importante, en muchos casos con implicación de la glucoproteína P.

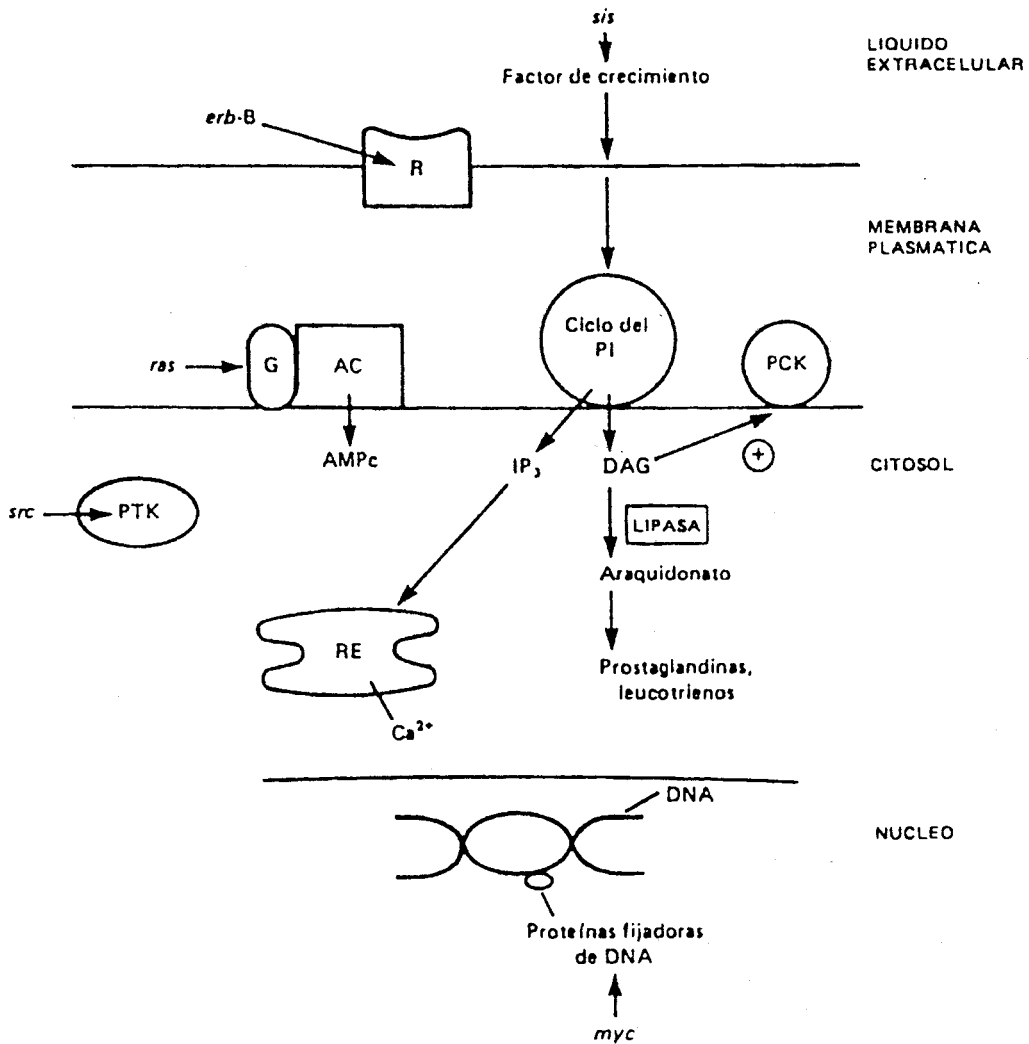


Fig 12.- Esquema del mecanismo de acción por los cuales los productos de ciertos oncogenes pueden alterar el metabolismo celular y estimular la proliferación.

II.4.2.-ACTIVIDAD CITOSTÁTICA Y ANTICANCEROSA DE LOS ESTEROLES

Durante los últimos años se han realizado verdaderos avances en el tratamiento y la prevención del cancer con principios aislados de plantas. Algunas líneas de investigación estan profundizando en una serie de productos con escasa capacidad citotóxica pero elevada efectividad supresora del crecimiento tumoral.

Se han realizado numerosos ensayos para ver el efecto tóxico de los esterolees sobre el DNA (Heltzel, C.E. y col.; 1994), pero una de las líneas de mayor interés son el grupo de modificadores de membranas celulares, siendo estos capaces de estabilizar las células neoplásicas y reducir, e incluso anular la capacidad de división de las mismas, pero sin llegar a destruir la célula. Los fitoesterolees podrían incluirse dentro de este grupo, ya que en estudios recientes sobre el tratamiento y prevención del cáncer de colon se ha visto que la inhibición del crecimiento celular por fitoesterolees puede ser mediado a través de la señal de traducción, camino que envuelve a la membrana lipídica frente a la línea celular humana HT-29 (Awad, A.B. y col.; 1996). También se ha visto que un tratamiento con una dieta rica en fitoesterolees produce una disminución de los niveles de ciertos promotores del cancer en el lumen de colon, influyendo a su vez, en los niveles de proliferación de células epidermiales de colon (Janezic, S.A. y Rao, A.V.; 1992).

En los últimos años, numerosas evidencias muestran la presencia de importantes moléculas lipídicas y proteicas en la membrana plasmática, que actúan como mediadoras de las señales celulares. Los fosfolípidos del inositol constituyen tan sólo entre 2-8 % del total de lípidos de las membrana de células eucariotas, pero estos son esenciales para la producción de segundos

mensajeros moleculares, como el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) y diaciglicerol (DAG) por acción de la fosfolipasa C (PLC) (Fig 13).

El IP₃ moviliza Ca²⁺ intracelular y el DAG estimula la actividad de la proteincinasa C (PKC). La PKC representa una familia de enzimas fosforilantes activadas por ciertos lípidos de membrana; antes de su activación, la PKC se encuentra en el citoplasma de forma inactiva, pero cuando aumenta la concentración intracelular de Ca²⁺ por efecto movilizador de IP₃, la PKC es transferida a la membrana celular y allí es activada al fijarse a los fosfolípidos, fijación que es reforzada o estimulada por el DAG.

Sin embargo, la PKC puede ser también activada de modo persistente por un grupo de compuestos llamados *esteres del forbol*, que imitan los efectos del DAG con mayor intensidad y con una velocidad de metabolización más lenta.

Hay evidencias que nos indican la necesidad de la fosforilación para iniciar la proliferación celular. La fosforilación de la molécula de MARCKS (Myristoylated Alanine-Rich kinase C Sustrate) produce un incremento en la unión de la calmodulina al MARCKS, produciendo así, una activación de enzimas Ca²⁺-calmodulinas dependientes. El complejo Ca²⁺/Calmodulina regula enzimas tales como proteincinasas, adenilciclasas, fosfodiesterasas, oxido nítrico-sintasa y ATPasa-Ca²⁺, Mg²⁺ y algunas de carácter estructural que conforman el citoesqueleto celular (tubulina, proteína τ , fodrina, etc.). La PKC también puede fosforilar el factor de transcripción CREB en el núcleo y de ese modo iniciar la transcripción de un gen (Fig 14).

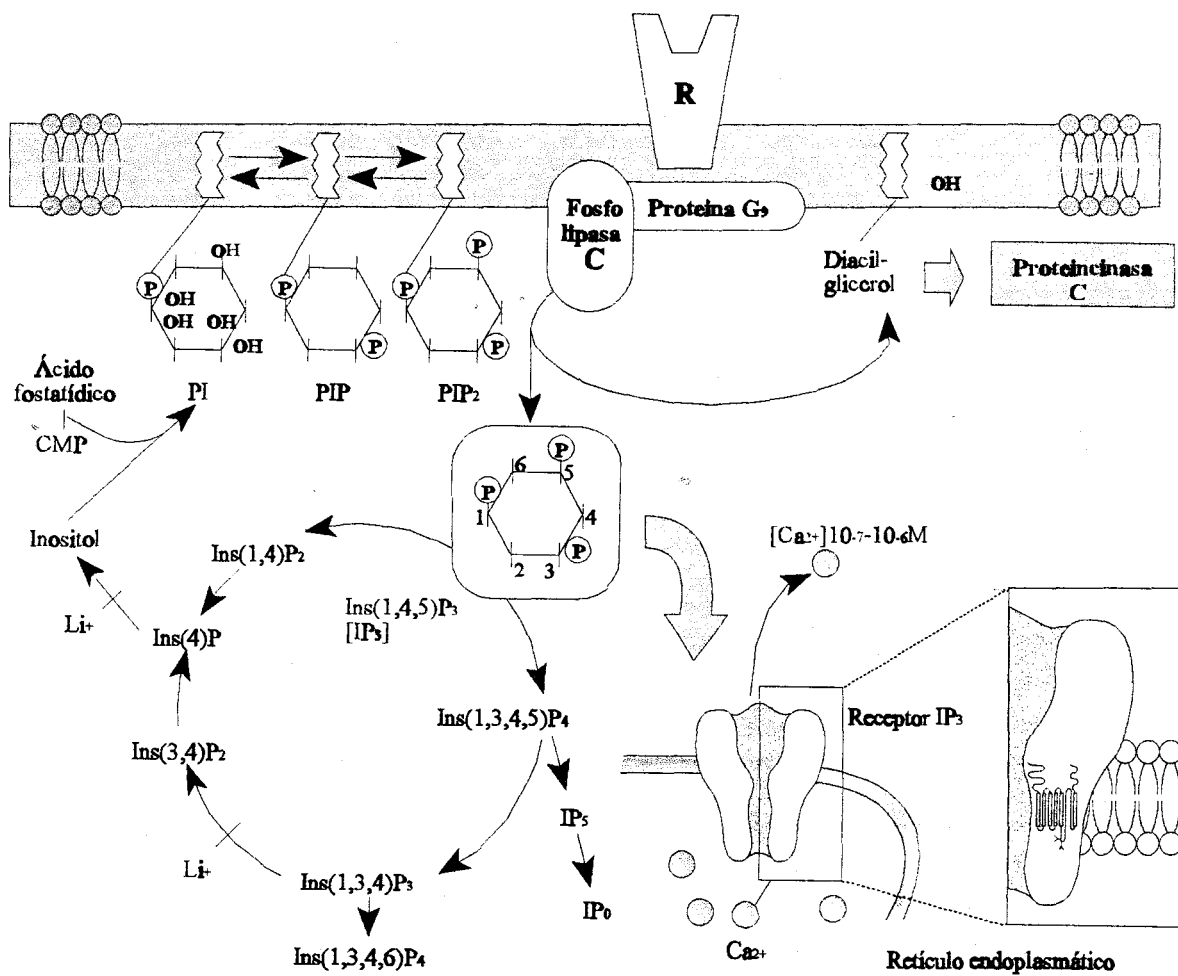


Fig 13.- Ciclo de fosfatidilinositol y su papel como segundo mensajero.

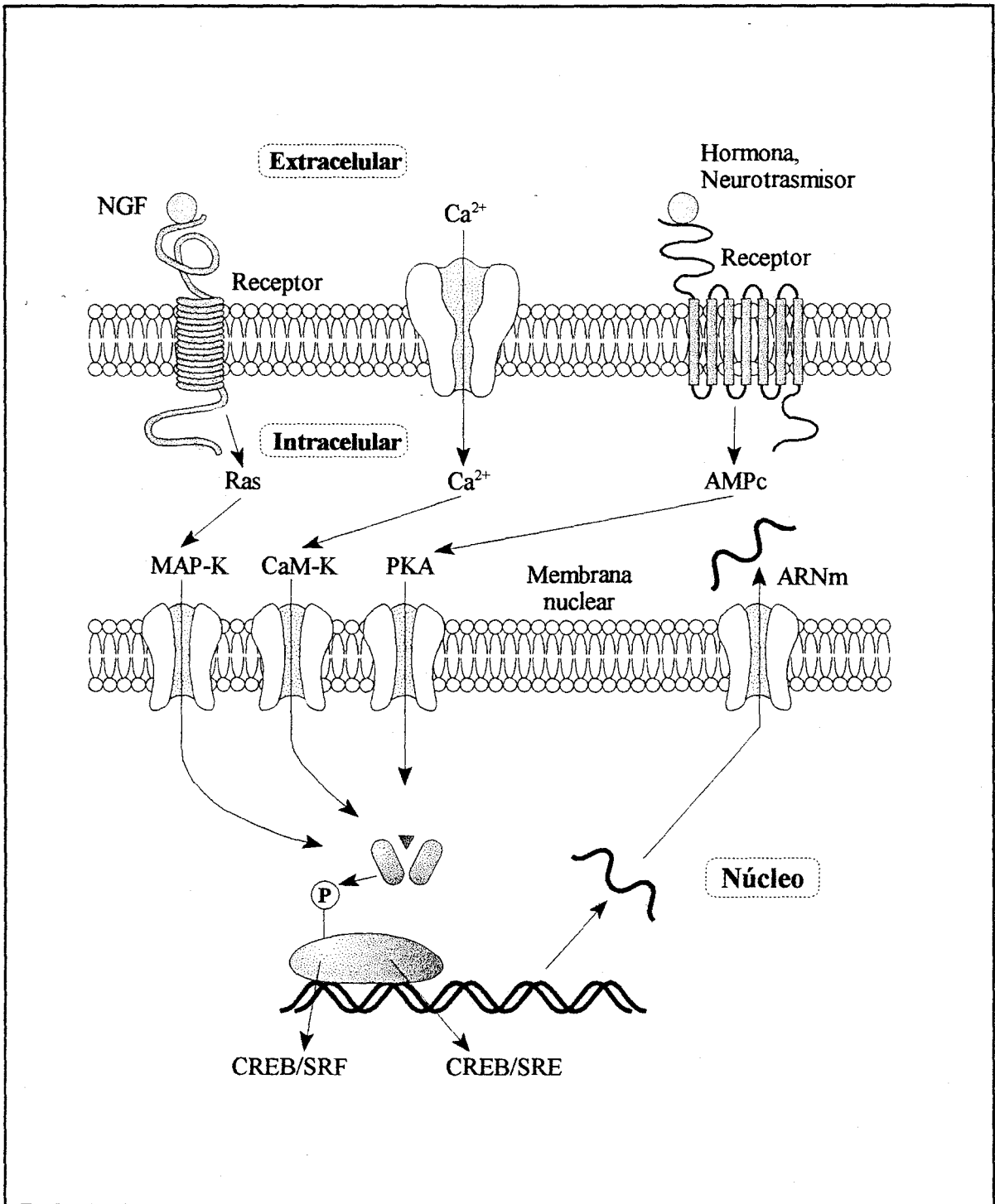


Fig 14.- Diversas líneas de señalización a través de sus respectivas cinasas, llegan a activar factores de transcripción y a modular la expresión de genes.

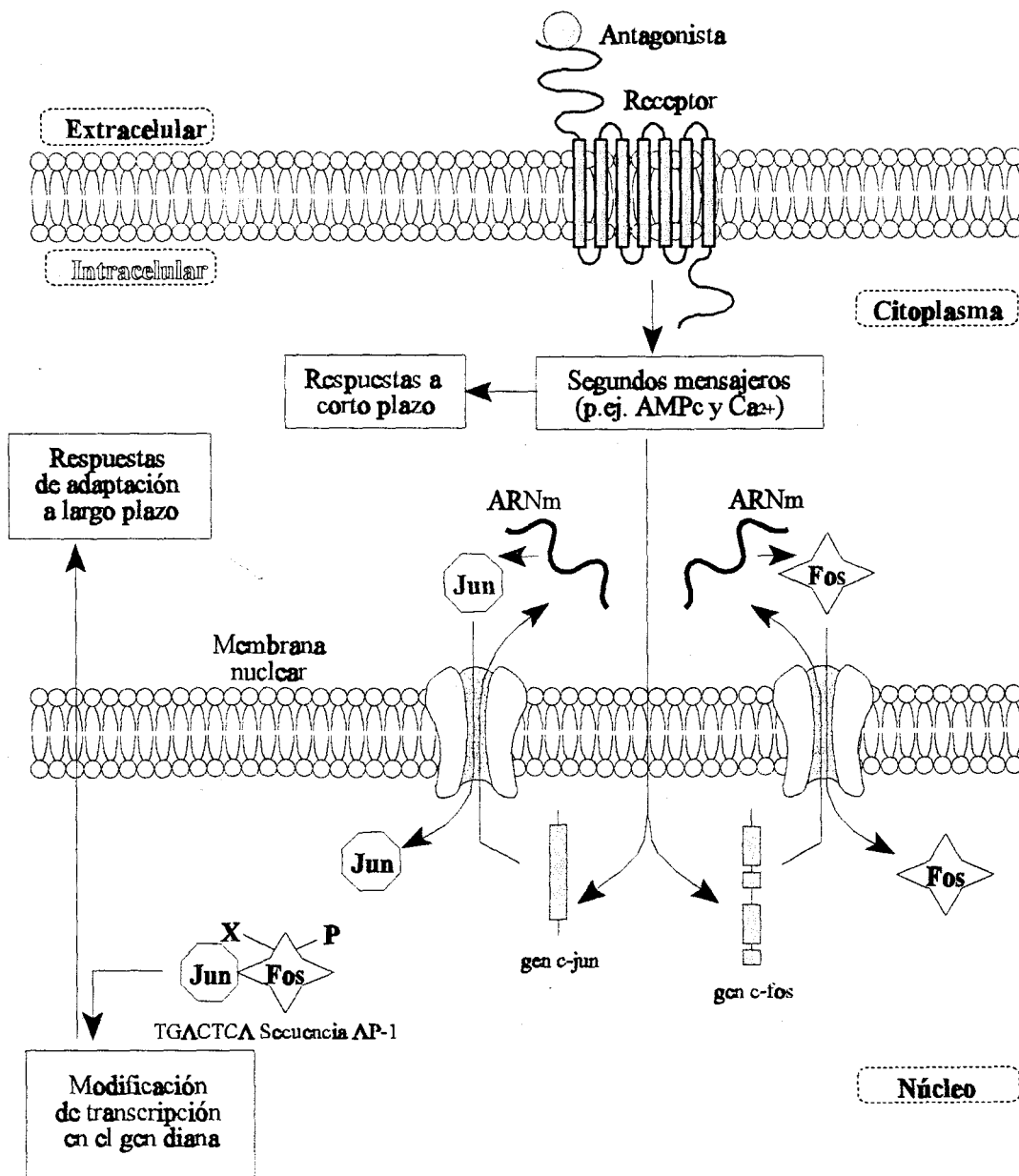


Fig 15.- La activación de receptores de membrana origina respuestas a corto y largo plazo, merced a la inducción de genes de acción inmediata (Fedman, R.S. y col.; 1997)

II.4.3.- TRITERPENOS Y ESTEROLES CON ACTIVIDAD CITOSTÁTICA Y ANTITUMORAL.

A continuación relacionamos los principales triterpenos y esteroides, aislados en los últimos años, con actividad citostática y antitumoral:

- 29-Hidroperoxistigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol (Shen, J.H. y col.; 1997).
- 29-Hidroxistigmasta-5,24(28)-dien-3 β -ol (Shen, J.H. y col.; 1997).
- 24-Hidroperoxi-24-vinil colesterol (Shen, J.H. y col.; 1997).
- Fucosterol (Shen, J.H. y col.; 1997).
- (25 S)-Spirost-5-ene-3 β (Mimaki, Y. y col.; 1994).
- (25R, 26R)-26-metoxispirost-5-en-3 β -ol 3-O- $\left\{ \begin{array}{l} \text{O-}\alpha\text{-L rannopiranosil- (1-2)-O-} \\ \text{[6-O-acetil-}\beta\text{-D-} \\ \text{glucopiranosil-(1-4)]-}\beta\text{-D-glucopiranosil} \end{array} \right\}$ (Nakamura, O. y col.; 1994).
- Ergosterol (Yasukawa, K. y col.; 1994).
- Ergosterol peróxido (Yasukawa, K. y col.; 1994).
- Acido 3-oxo-olean-12-en-29-oico (Kaneda, N. y col.; 1992).
- Acido katónico (Kaneda, N. y col.; 1992).
- β -Sitosterol (Yasukawa, K. y col.; 1991).
- Acido ursólico (Lee, H-K y col.; 1988).
- 16 α -metoxi-2 α , 3 β , 12 β -trihidroxipregna-4, 7-dion- 20-ona (Dush, Ch-Y y col.; 1987).
- 3 β , 12 β -trihidroxipregna-4, 7-dion- 20-ona (Dush, Ch-Y y col.; 1987).
- 12 β -Hidroxi-5 α -pregna-16-ene-3,20-diona (Shun, Y. y col.; 1987).
- 12 β -Hidroxi-4,16 -dien-3,20-diona (Shun, Y. y col.; 1987).
- Celastrol (Zhang, W.J. y col.; 1986).

- Withaferina A (Gonzalez, A.G. y col.; 1982).
- Cardenólidos (Piatak, D.M.; 1985).
- Amirol (Benzanger-Beauquesne, L.; 1982).
- Acido betulínico (Benzanger-Beauquesne, L.; 1982).
- Lupeol (Proliac, A.; 1980).
- Withanólido E (Muchandani, N.B. y col.; 1979).

III.- PARTE EXPERIMENTAL

III.1.- MUESTRAS

III.1.1.- RECOLECCIÓN Y PREPARACIÓN.

Las muestras constituidas por las sumidades floridas de la especie *Achillea ageratum* L., fueron recolectadas en el mes de Mayo en Prado del Rey (Cádiz).

La desecación de las muestras se realizó a la sombra sobre superficie lisa, a una temperatura media de 23 °C y posteriormente se conservó en un lugar seco, oscuro y cerrado.

El material vegetal ha sido determinado en el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Sevilla por el Dr. Silvestre, quedando depositado un ejemplar testigo del mismo en el herbario de dicha Facultad (SEV-F).

III.2.- ESTUDIO FITOQUÍMICO

III.2.1- OBTENCIÓN DE LOS EXTRACTOS A ESTUDIAR

Partimos de 500 g de planta desecada y troceada que introducimos en el cuerpo intermedio de un extractor tipo Soxhlet y sometimos a una extracción continua, operando con tres disolventes de polaridad creciente: n-Hexano, Cloroformo y Metanol (Dominguez, X.A., 1961). El proceso esquematizado de la extracción queda recogido en la Figura 16.

Los rendimientos de las extracciones, expresados en gramos de residuo seco (r.s.) por 100 g de planta fueron los siguientes:

Extracto hexanoico.....	2,00 %
Extracto clorofómico.....	6,33 %
Extracto metanólico.....	12,53 %

Para nuestro estudio seleccionamos los extractos hexanoico y clorofómico.

III.2.2- TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS

La separación de los distintos componentes de los extractos obtenidos se realizó por cromatografía en columna de gel de sílice.

Previamente, se hizo un estudio cromatográfico en capa fina, con el fin de establecer en criterio de selección de los eluyentes a emplear en la cromatografía en columna.

III.2.2.1.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA

Material

Cromatofolios PL de silicagel 60 F₂₅₄, Merck.

Cubetas cromatográficas de vidrio.

Lámpara Luz U.V. de 366 nm y 254 nm.

Estufa de desecación.

Pulverizador de aire a presión.

Reactivos (Panreac-PRS)

n-Hexano

Éter etílico

Cloroformo

Acetato de etilo

Fases móviles

n-Hexano / Éter etílico (70/30).

n-Hexano / Cloroformo a distintas proporciones.

Cloroformo /Acetato de etilo a distintas proporciones.

Reveladores

Oleum: Ácido sulfúrico/Ácido acético glacial / Agua (2:40:8).

Exposición a 120 °C durante 5 min. (Bermejo, 1968).

Luz Ultravioleta (Wagner y col.; 1984).

Método

El desarrollo de los cromatofolios se realizó en cámaras previamente saturadas con las fases móviles. La técnica seguida es la propuesta por STHAL (Sthal, 1969), en su modalidad unidimensional ascendente de simple recorrido. Los cromatofolios desarrollados se observan a la luz U.V. revelándose a continuación y observándose, en algunos casos, de nuevo a la luz U.V.

III.2.2.2.- CROMATOGRFÍA EN COLUMNA

Material

Columnas de vidrio de diversas longitudes y diámetros.

Colector de fracciones LKB 8070 Ultrorac II.

Rotavapor Buchi.

Reactivos

Absorbentes: Silicagel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck).

Silicagel (0,2-0,5 mm (Merck).

Eluyentes: n-Hexano, Éter etílico, Cloroformo, Acetato de etilo, a distintas proporciones según las diferentes columnas.

Método

Se sigue el procedimiento clásico de cromatografía sólido-líquido en columna.

El empaquetamiento se realiza formando una suspensión de silicagel (0,063-0,200 mm) en n-Hexano, dejándose en reposo durante 24 horas. Para formar la cabeza de la columna se utiliza silicagel 0,2-0,5 mm.

El seguimiento de la columna se realiza por cromatografía en capa fina.

III.2.3.- TÉCNICAS INSTRUMENTALES

- Determinación del punto de fusión:

El punto de fusión se determinó en un microscopio THERMOVAR HT 1B11.

- Espectroscopía:

Los espectros U.V. se realizaron en un espectrofotómetro PERKIN ELMER Lambda 3, con registrador incorporado, utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de espesor y 3 ml de capacidad. El disolvente utilizado fue cloroformo de máximo grado de pureza.

Los **espectros de masa (E.M.)** se realizaron en un espectrofotómetro de masas KRATOS MS 80 RFA. La temperatura de la fuente fue de 250 °C y la energía de ionización 70 e.v.

La **cromatografía gaseosa** se realizó en un cromatógrafo de gases CHROMATOPAC C-RGA usando helio como gas portador.

La **cromatografía de gases-Espectrometría de masas** se realizó en un aparato CARLO ERBA/KRATOS MS 80 RFA.

Los espectros de masa se realizaron a una resolución de 1000 y la medida exacta de las masas, bajo una resolución de 10000.

El barrido espectral se ajustó dependiendo de la muestra.

III.2.4.- ESTUDIO DEL EXTRACTO HEXANOICO.

Partimos de 4 g de residuo seco del extracto hexanoico, que procedimos a cromatografiar en columna de gel de sílice. La elución se comenzó con n-Hexano, para continuar con Cloroformo, Acetato de etilo y Metanol, en distintas proporciones, aumentando progresivamente la polaridad.

Se recogieron 193 fracciones de aproximadamente 15 mL cada una, que se agruparon según su comportamiento cromatográfico en capa fina. Los resultados se expresan en la tabla I.

FRACCIONES	ELUYENTES	OBSERVACIONES
1-8	n-Hexano	Mezclas
9-15	n-Hexano	Mezclas
16-23	n-Hexano/Cloroformo (95/5)	Mezclas
24-34	n-Hexano/Cloroformo (90/10)	Mezclas
35-48	n-Hexano/Cloroformo (80/20)	Mezclas
49-51	n-Hexano/Cloroformo (75/25)	Mezclas
52-59	n-Hexano/Cloroformo(75/25)	Mezclas
60-64	n-Hexano/Cloroformo (75/25)	Mezclas + A
65-85	n-Hexano/Cloroformo (75/25)	Mezclas
86-112	n-Hexano/Cloroformo (65/35)	Mezclas
113-124	n-Hexano/Cloroformo (50/50)	Mezclas
125-133	n-Hexano/Cloroformo (40/60)	Mezclas + B
134-142	n-Hexano/Cloroformo (20/80)	Mezclas + B
143-150	Cloroformo/Acetato etilo (90/10)	Mezclas
151-162	Clorof/Ac etilo(50/50)	Mezclas
163-172	Cloroformo/Acetato etilo (10/90)	Mezclas
173-182	Acetato etilo/Metanol (50/50)	Mezclas
183-193	Metanol	Mezclas

Tabla I.- Desarrollo de la columna correspondiente al extracto hexanoico de *A. ageratum* L.

III.2.4.1.- IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO A

Las fracciones 60-64 se cromatografiaron en capa fina poniéndose de manifiesto una mancha de color púrpura al revelar con Oleum, por lo que procedimos al estudio de dicha fracción, y tras la realización de una preparativa con fase móvil n-Hexano/Eter diétilico 70/30, y con recorrido y medio, se obtuvo un polvo blanco cristalino que denominamos A.

III.2.4.1.a.- Resultados

- **Punto de fusión:** 182-184 °C

- **Cromatografía en capa fina:**

El estudio realizado mediante cromatografía en capa fina en soporte de silicagel, nos proporcionó los siguientes valores de Rf y coloraciones:

FASE MOVIL	Rf	COLORACIÓN (Oleum)
n-Hexano/Eter dietílico (70:30)	0,27	marrón-púrpura
n-Hexano/Eter dietílico (50:50)	0,50	marrón-púrpura
Clorofórmo/Acetato etilo (50:50)	0,91	marrón-púrpura

- **Espectro U.V.** (realizado en cloroformo)

U.V.: λ (máx): 202 (Fig 17)

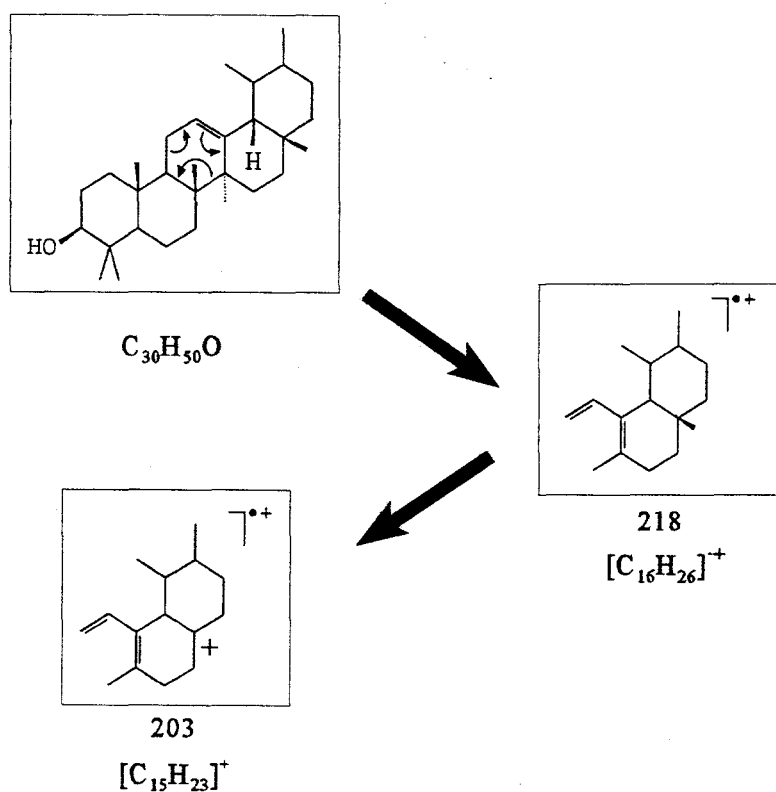
- **Espectrometría de masas:** E.M. m/z (%):

426 (M^+ , 20), 218 (100), 203 (16), 189 (15), 135 (18) (Fig 18)

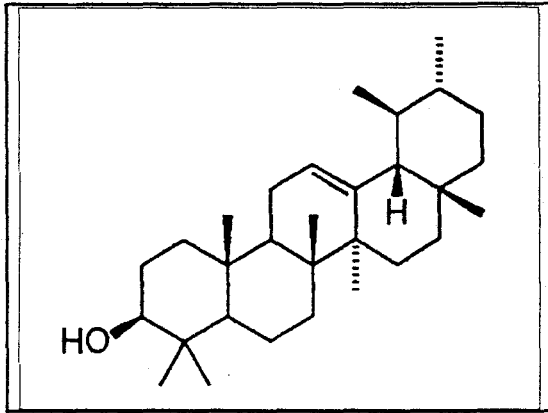
III.2.4.1.b.- **Discusión de resultados**

El espectro U.V. con una λ máxima a 202 se encuentra dentro del rango de absorbancia de los triterpenos.

El espectro de masa de alta resolución presenta un ión molecular a m/z 426 correspondiente a la fórmula empírica $C_{30}H_{50}O$. La presencia del pico base a m/z 218 es la característica principal de la fragmentación de los triterpanos pertenecientes a la serie ursan 12-en. Este ión por pérdida de un metilo nos proporciona el ión m/z 203 que nos da idea de la presencia de un triterpeno con una insaturación en $C_{11}-C_{12}$.



Todos estos datos junto con los encontrados en bibliografía, nos permiten deducir que el compuesto A es el **Ursan-12-en-3 β -ol** conocido como α -AMIRINA.



α -Amirina es un triperpeno aislado de numerosas especies botánicas, cuyas principales acciones demostradas han sido la actividad antiinflamatoria (Recio, M.C. y col.; 1995) (Handa, S.S. y col.; 1992) (Kewefio-Okai, G. y col.; 1994), citostática y antitumoral frente a la línea celular UMR (osteosarcoma de ratón); obteniéndose en ambos casos resultados muy esperanzadores (Kewefio-Okai, G. y col.; 1994).

Este compuesto es la primera vez que se describe en esta especie, aunque ya se había puesto de manifiesto con anterioridad en este género, concretamente en la especie *A. millefolium* (Chandler, R.F. y col.; 1982).

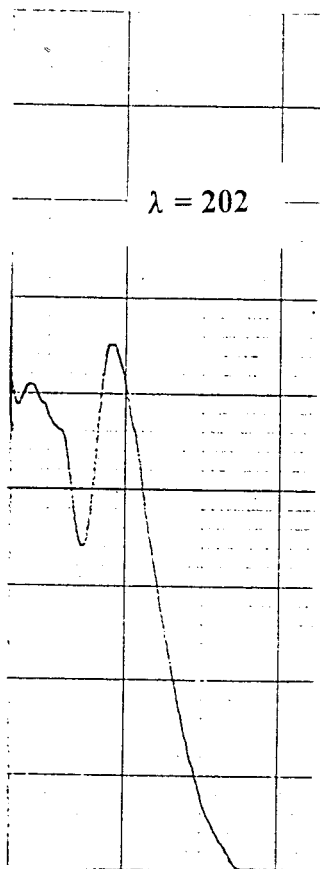


Fig 17.- Espectro U.V. del compuesto A.

file:JF980224B07 Ident:32-18 Win 1000PPM Acq:24-FEB-1998 13:49:34 Cal:BAJACAL_1
AutoSpecQ EI+ Magnet BpM:218 BpI:2537920 TIC:19902444 Flags:HALL
File Text:FARMA A

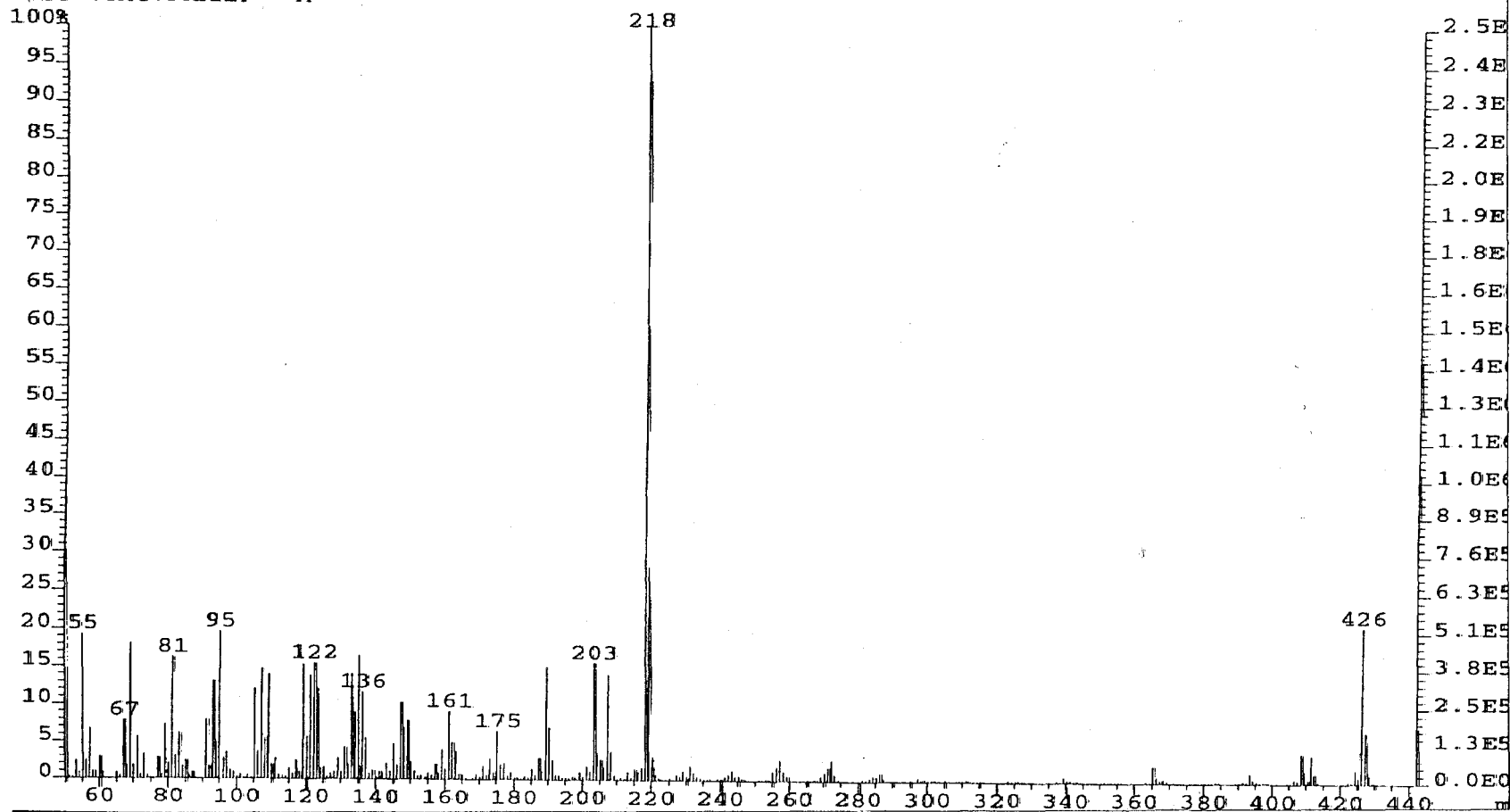


Fig 18.- Espectro de masas del compuesto A.

III.2.4.2.- IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO B

Se cromatografiaron en capa fina las fracciones 125-142 (Tabla I), poniéndose de manifiesto una mancha de color violeta al revelar con Oleum.

Para el estudio de dicha fracción, se realizó un fraccionamiento en columna, usando como fases móviles n-Hexano, Éter dietílico y Acetato de etilo .

Se recogieron 57 fracciones de aproximadamente 15 mL cada una , que volvieron a reagruparse según su comportamiento cromatográfico (Tabla II).

De las fracciones 10-17 obtuvimos un compuesto de color amarillo y aspecto siruposo que denominamos B.

El estudio del mismo realizado mediante cromatografía en capa fina en soporte de silicagel, nos proporcionó los siguientes valores de Rf:

FASE MOVIL	Rf	COLORACIÓN (Oleum)
n-Hexano/Eter dietílico (70:30)	0,86	Violeta
n-Hexano/Eter dietílico (50:50)	0,91	Violeta
Clorofórmo/Acetato de etilo (50:50)	0,97	Violeta

Este estudio nos orientó hacia la presencia de un sólo componente, sin embargo las técnicas espectroscópicas nos indicaron que se trataba de una mezcla de componentes con Rf semejantes.

Para proceder a su separación se aplicó cromatografía en fase gaseosa, con columnas capilares y detector de ionización de llamas.

La identificación de los constituyentes se llevó a cabo mediante la obtención de los espectros de masa de los picos cromatográficos, utilizando un sistema combinado cromatográfico de gases-espectrometro de masas.

Gas portador: Helio (1 ml/min)

Temperatura:

Inyector ----- 275 °C

Columna ----- 5 °C/min desde 50 °C a 150 °C

10 °C/min desde 150 °C a 250 °C

Detector ----- 325 °C

Columna:

Longitud ----- 30 m

Diámetro interior -- 0,32 mm

Relleno ----- OV-1

Con las condiciones experimentales que acabamos de describir se procede a realizar el análisis cromatográfico de la muestra y se registran los espectros de masas de cada uno de los constituyentes que aparecen en el cromatograma.

FRACCIONES	ELUYENTES	OBSERVACIONES
1-9	n-Hexano	Mezclas
10-17	n-Hexano/Eter dietílico (90/10)	B
18-23	n-Hexano/Eter dietílico (80/20)	Mezcla + B
24-32	n-Hexano/Eter dietílico (60/40)	Mezclas
33-40	n-Hexano/Eter dietílico (70/40)	Mezclas
41-43	Eter dietílico	Mezclas
44-46	Eter/Acetato etilo(90/10)	Mezclas
47-49	Eter/Acetato etilo(20/80)	Mezclas
50-57	Acetato etilo	Mezclas

Tabla II.- Desarrollo de la columna correspondiente a las fracciones 125- 142

del extracto hexanoico de *Achillea ageratum* L.

III.2.4.2.a. - Resultados

Cromatografía de gases

El cromatograma obtenido se presenta en la figura 19.

Los datos correspondientes a la cromatografía gaseosa de cada uno de los picos detectados (tiempo de retención y áreas relativas) se detallan a continuación.

Los resultados nos indican que se trata de una mezcla de compuestos donde hay un componente mayoritario ($T_R = 20,69$).

<u>PICOS</u>	<u>T_R</u>	<u>AREA RELATIVA (%)</u>
1	7.13	1,88
2	19.18	14,60
3	20.69	47,10
4	23.21	5,18
5	25.95	3,30
6	27.98	3,77
7	30.84	3,67
8	31.84	6,36
9	32.61	5,18
10	33.15	6,59
11	33.71	2,36

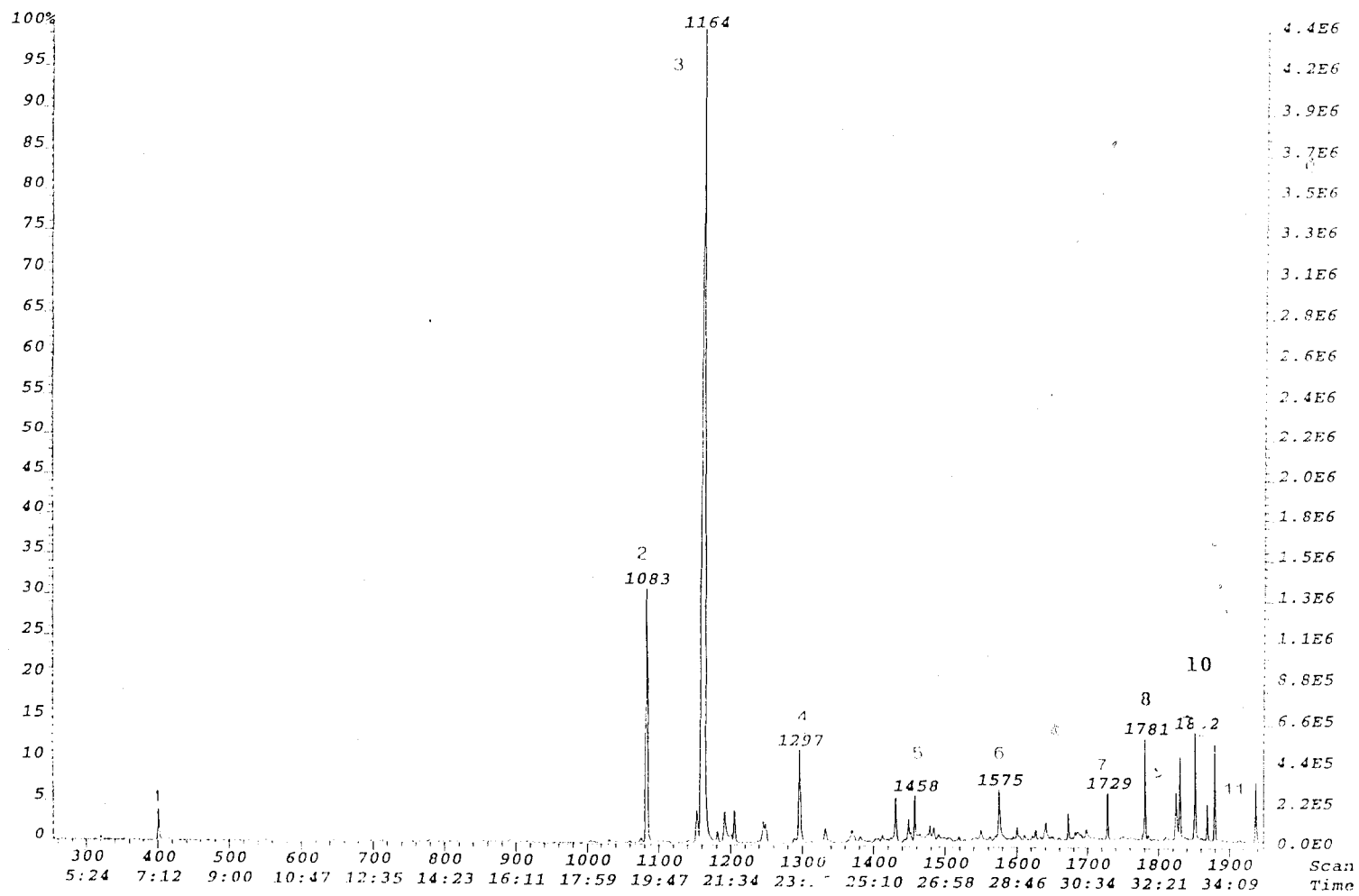


Fig 19. - Cromatografía de gases correspondiente al compuesto B.

Cromatografía de gases-Espectrometría de masas

Los datos correspondientes a los espectros de masas de los componentes de **B** se expresan a continuación. Los números entre parentesis indican la abundancia relativa en %:

P₁: m/z 83(M⁺, 100), 56 (22), 55 (15), 53 (10) (Fig 20).

P₂: m/z 222 (M⁺, 11), 204 (58), 189 (47), 161 (77), 122 (67), 109 (100), 95 (70), 81 (87), 55 (59) (Fig 21).

P₃: m/z 204 (M⁺, 7), 161 (6), 135 (20), 119 (39), 107 (60), 93 (100), 79 (59), 69 (78), 55 (73) (Fig 22).

P₆: m/z 256 (M⁺, 45), 213 (20), 129 (35), 73 (100), 71 (40), 60 (92) (Fig 23).

P₉: m/z 300 (M⁺, 26), 285 (100), 239 (90), 197 (32), 141 (17), 91 (10) (Fig 24).

P₁₀: m/z 330 (M⁺, 55), 315 (100), 237 (27), 150 (23), 103 (27), 91 (39) (Fig 25).

P₁₁: m/z 386 (M⁺, 68), 371 (100), 293 (48), 178 (19), 119 (50), 103 (15), 91 (40), 79 (5), 57 (28) (Fig 26).

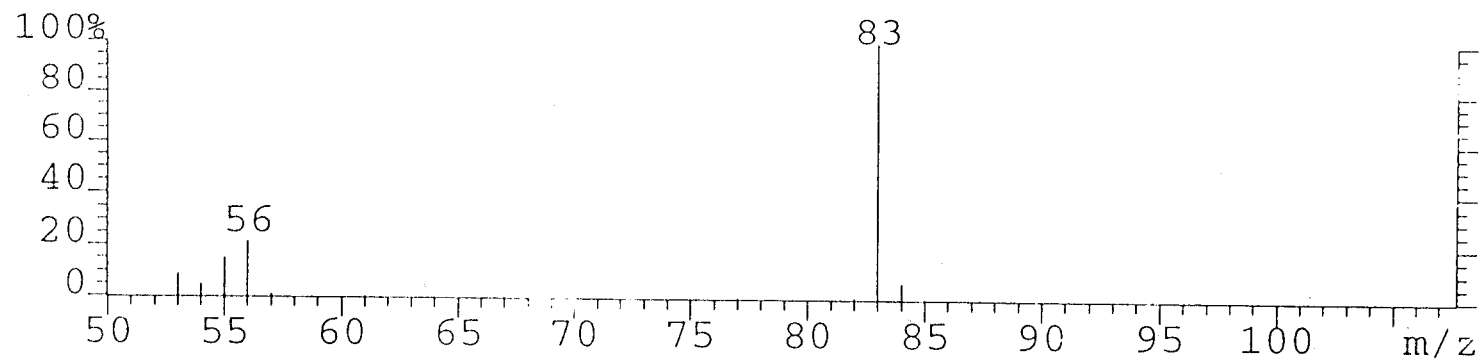


Fig 20.- Espectro de masas correspondiente al P₁.

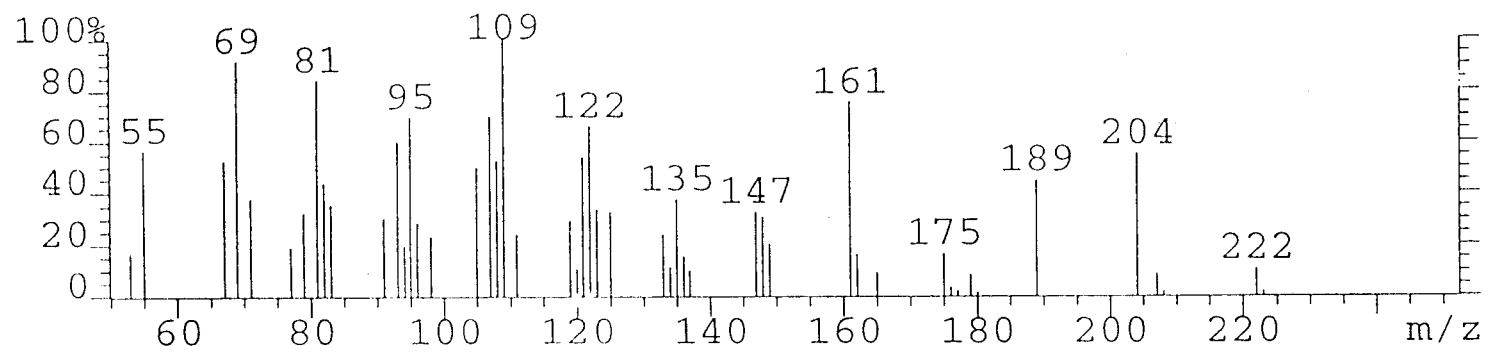


Fig 21.- Espectro de masas correspondiente al P₂.

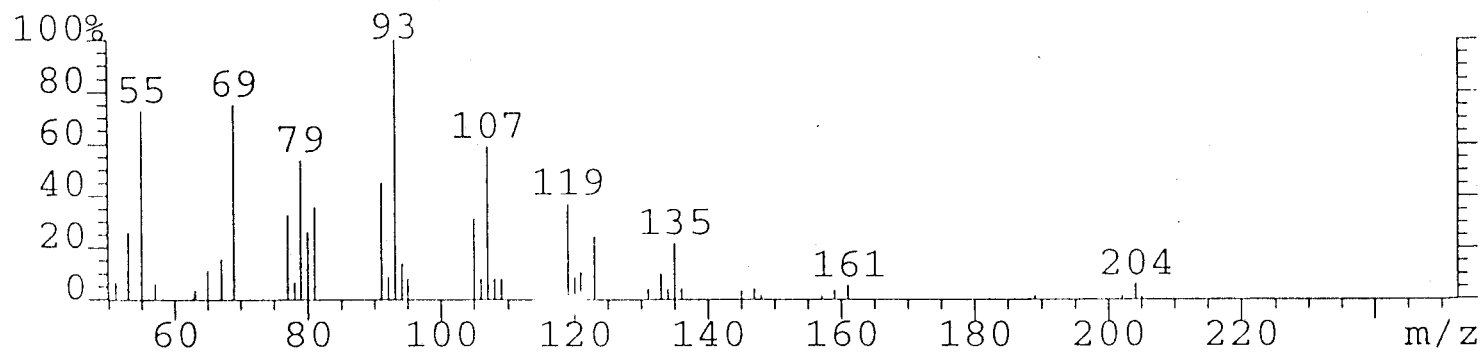


Fig 22.- Espectro de masas correspondiente al P₃.

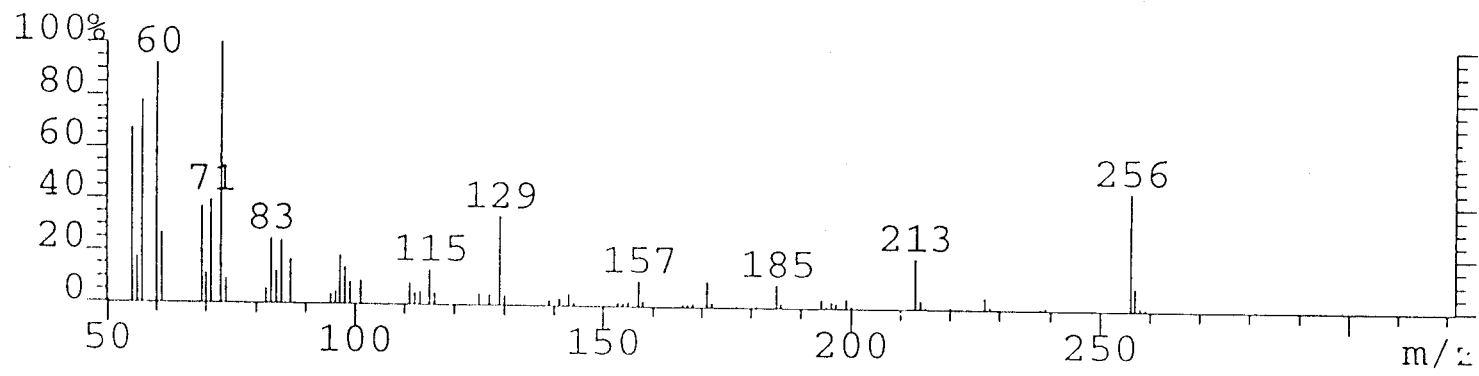


Fig 23.- Espectro de masas correspondiente al P₆.

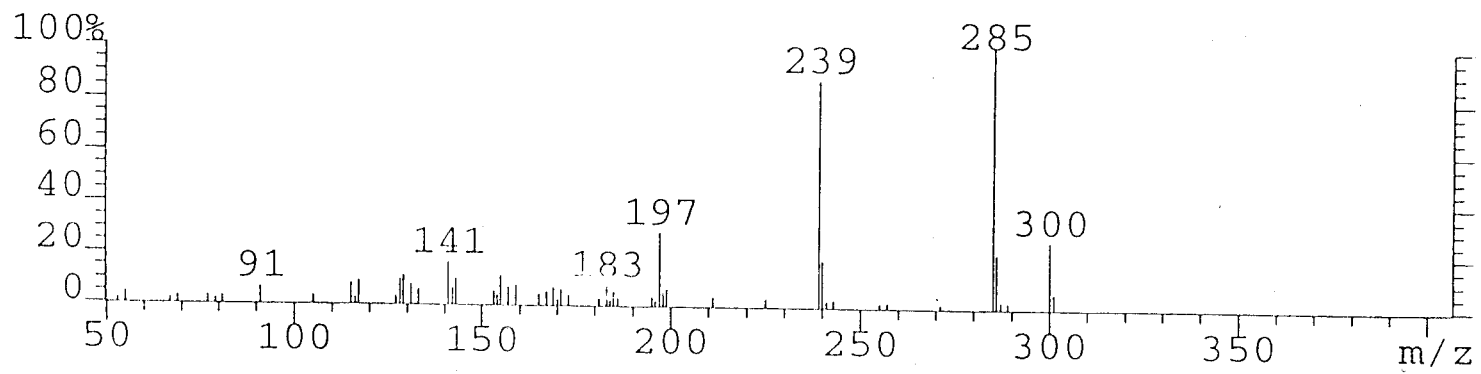


Fig 24. - Espectro de masas correspondiente al P₉.

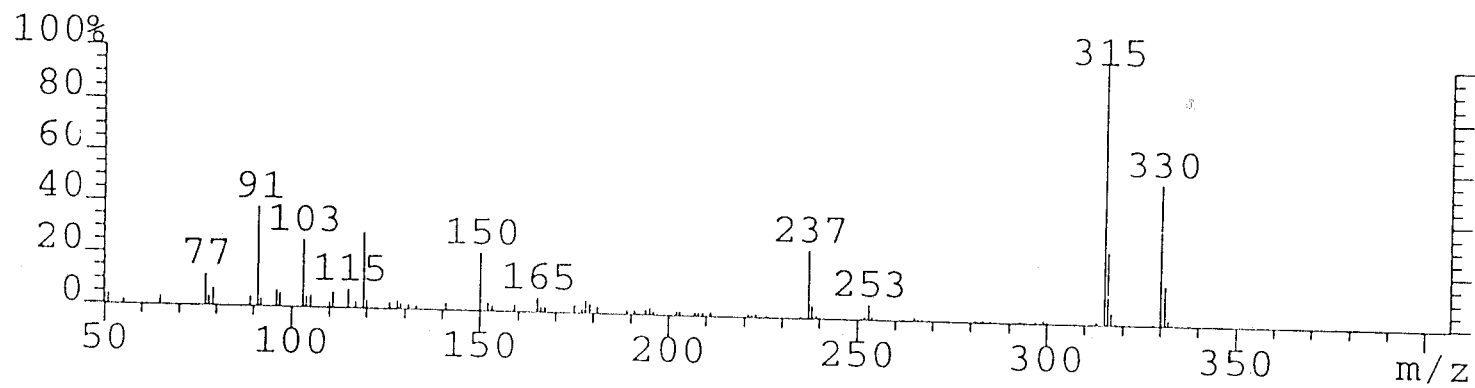


Fig 25. - Espectro de masas correspondiente al P₁₀.

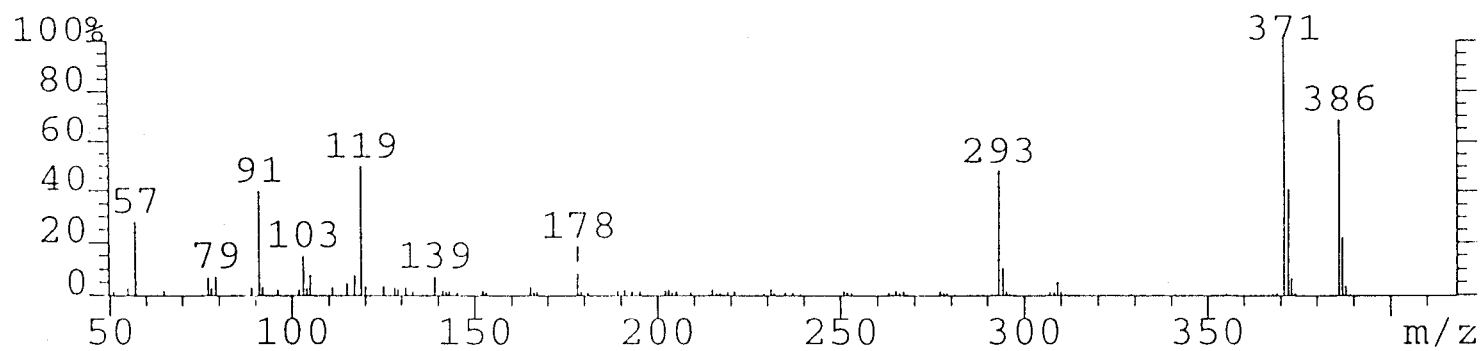


Fig 26.- Espectro de masas correspondiente al P₁₁.

La interpretación e identificación de los espectros se realiza por comparación con los contenidos en la librería correspondiente del banco de datos (NBSLIB2).

III.2.4.2.b.- **Discusión de resultados.**

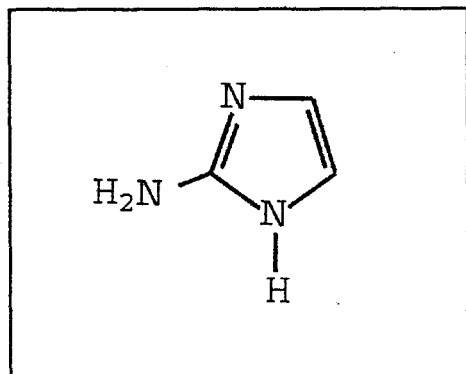
Los resultados anteriores nos han llevado a la identificación de los siguientes compuestos:

P₁: La medida exacta de la masa, nos da un ión molecular impar a m/z 83 indicativo de la presencia de nitrógenos, correspondiente a la fórmula empírica $C_3H_5N_3$.

La fuerte intensidad del ión molecular que en este caso se corresponde con el pico base, es indicativo de aminas cíclicas aromáticas.

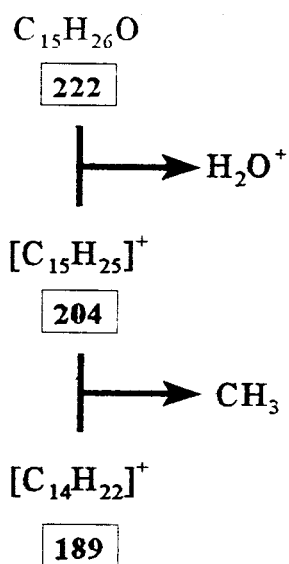
El ión m/z 56 (M^+-27) nos indica la presencia de N unido aromáticamente que se corresponde con el ión $CH_3-C\equiv N^+-CH_3$. A su vez, la presencia de este ión es característico de los derivados aromáticos pentagonales.

Estos datos junto con los encontrados en la bibliografía nos llevan a la conclusión de que el compuesto **P₁** es un derivado del imidazol o glioxalina, concretamente **2-AMINO IMIDAZOL**



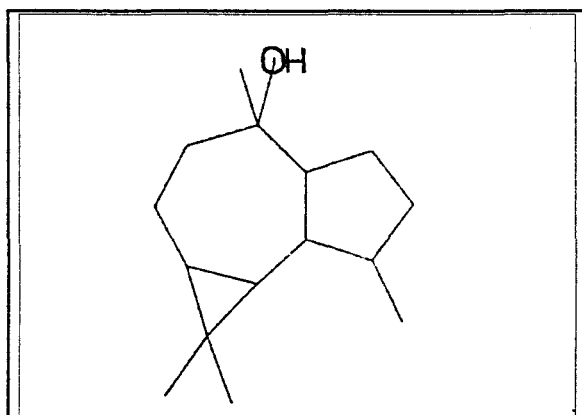
P₂: El espectro de masas de alta resolución muestra el ión molecular a m/z 222 al que corresponde una fórmula empírica $C_{15}H_{26}O$.

El pico a m/z 204 ($M^+ - 18$) es característico de la pérdida de H_2O^+ e indicativo de la presencia de un [OH], la pérdida de m/z 15 nos indica la presencia de grupos metilos.



El pico base a m/z 109 se corresponde a la fórmula empírica $[C_8H_{13}]^+$ indicativa de la ruptura del anillo pentagonal.

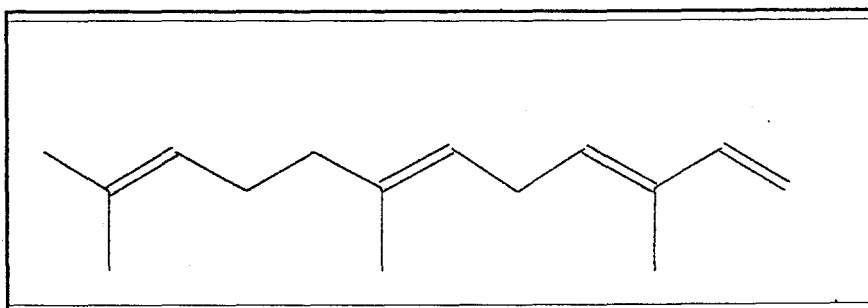
Con estos datos junto con los encontrados en bibliografía proponemos como estructura de P_2 el 1H-Cicloprop(e)azulen-4-ol, más conocido con el nombre de **GLOBULOL**



P_3 : El ión molecular a m/z 204 se corresponde con una fórmula empírica $C_{15}H_{24}$.

El pico base a m/z 93 es característico de alquenos poliinsaturados y se corresponde con una fórmula empírica $[C_7H_9]$, y el ión a m/z 69 $[C_5H_9]^+$ es también característica de alquenos.

Con todos estos datos juntos con los encontrados en bibliografía podemos proponer como estructura del compuesto **P₃: 2, 6, 10 trimetil, 2, 6, 9, 11 dodecatetraeno** conocido como **FARNESENO**.

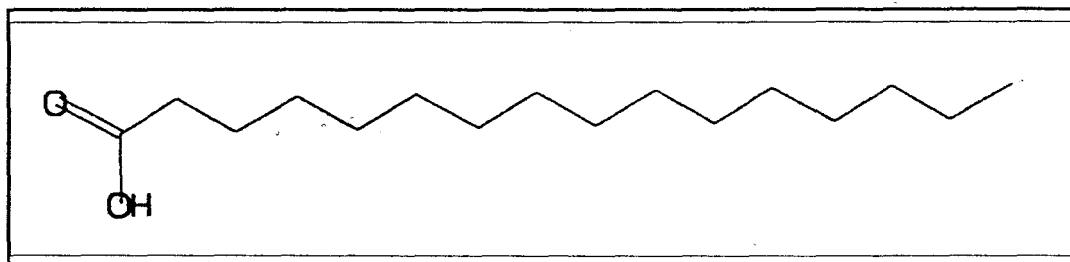


P₆: El ión molecular de m/z 256 se corresponde con una fórmula empírica $C_{16} H_{32} O_2$.

El pico base m/z 73, $[C_3 H_5 O_2]^+$, es característico de ácidos.

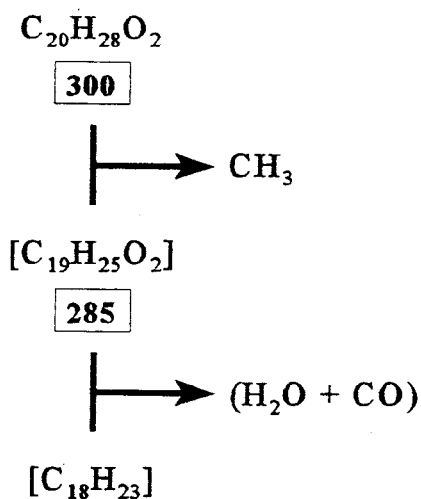
La sucesiva pérdida de iones $[CH_2]^+$, correspondiente a m/z 14 (87, 101, 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227) es característica de una cadena alifática.

Con estos datos, juntos con los proporcionados con la base de datos consultada, deducimos que el compuesto denominado **P₆** es el **ÁCIDO HEXADECANOICO**.

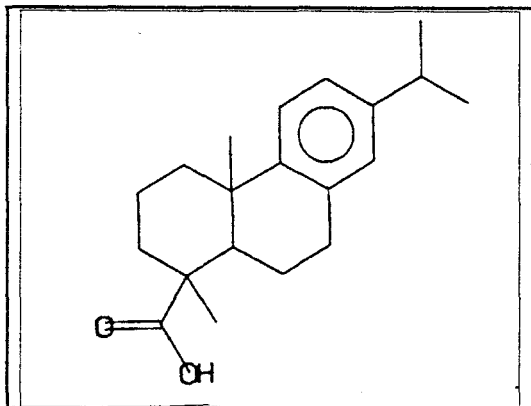


P₉: El espectro de masas de alta resolución nos da un ión molecular a m/z 300, de fórmula empírica $C_{20}H_{28}O_2$.

La fragmentación de la molécula nos da un pico base a m/z 285 característico de pérdidas de metilos y un ión a m/z 239 que se corresponde con la pérdida de un fragmento de masas 46 que pone de manifiesto la presencia de un grupo carboxílico. El pico m/z 91 es característico de un anillo aromático.



Con todos estos datos proponemos como posible estructura del compuesto P,
la del ACIDO 1, 2, 3, 4, 4A, 9, 10, 10A OCTAHIDRO; 1, 4A DIMETIL; 7(1
METIL ETIL) 1 FENANTRENO CARBOXÍLICO.



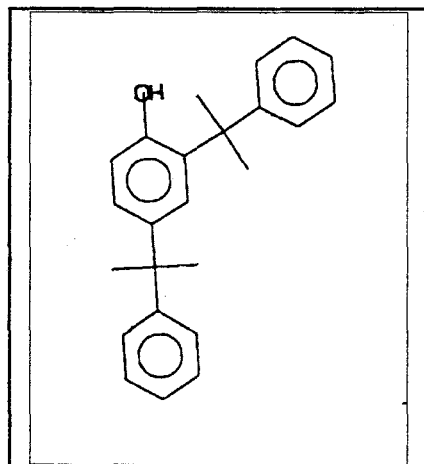
P₁₀: La medida exacta de la masa nos muestra el ión molecular a m/z 330,
correspondiente a la fórmula empírica $C_{24}H_{26}O$.

El pico base a m/z 315 se corresponde a la pérdida de metilos.

La presencia del pico a m/z 119 $[C_9H_{11}]^+$ es característico de compuestos
alquil-aromáticos, y los picos a m/z 115 $[C_9H_7]^+$, m/z 91 $[C_7H_7]^+$ y m/z 77 $[C_6H_5]$ son
también indicativos de la presencia de núcleos aromáticos.

El pico a m/z 79 es típico de anillos aromáticos con sustituyentes portadores de
hidrógenos.

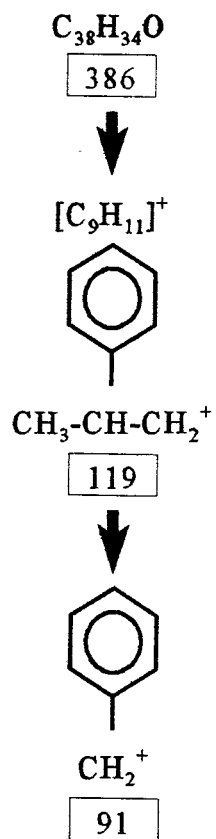
Estos datos junto con los encontrados en bibliografía nos orienta a identificar el compuesto P_{10} como el **2,4 BIS (DIMETIL BENCIL) FENOL**.



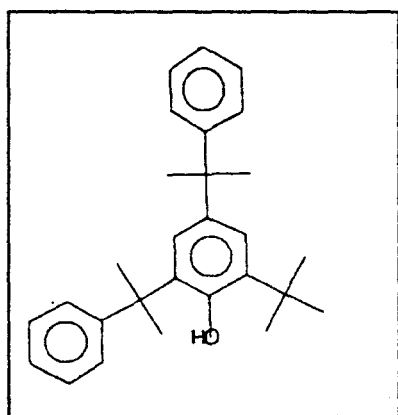
P_{11} : El ión molecular de este compuesto a m/z 386 se corresponde con la fórmula empírica $C_{28}H_{34}O$.

La pérdida de un metilo da lugar al pico base m/z 371.

La presencia de los iones a m/z 119, m/z 91 y m/z 77 son característicos de anillos aromáticos.



La fragmentación de esta molécula nos hace proponer como posible estructura del compuesto P₁₁ la del **2,4 BIS (DIMETIL BENCIL), DIMETIL ETIL FENOL**.



El cromatograma en fase gaseosa nos muestra la existencia de cuatro compuestos que se corresponden con los picos 4, 5, 7 y 8 que no han sido indentificados.

Consultando la bibliografía, no hemos encontrado ninguna referencia de que estos compuestos hayan sido identificados anteriormente en la especie *Achillea ageratum* L., aunque si han sido aisladas otros de estructuras químicas similares, tanto en esta especie (Vieira, L.M. y col; 1997a; 1997b) como en otras del mismo género, como por ejemplo *A. millefolium* (Tozio, T. y col.; 1994).

III.2.5.- ESTUDIO DEL EXTRACTO CLOROFÓRMICO

Partimos de 4 g de residuo seco del extracto clorofórmico, que procedimos a cromatografiar en columna de gel de sílice. La elución se comenzó con n-Hexano, para continuar con Eter dietílico, Acetato de etilo y Metanol, en distintas proporciones, aumentando de forma progresiva la polaridad.

Se recogieron 175 fracciones de aproximadamente 15 ml cada una, que se reagruparon según su comportamiento cromatográfico en capa fina. Los resultados se muestran en la tabla III.

FRACCIONES	ELUYENTES	OBSERVACIONES
1-27	n-Hexano	Mezclas
28-40	n-Hexano/Éter dietílico (80:20)	Mezclas
41-65	n-Hexano/Éter dietílico (70:20)	Mezclas
66-77	n-Hexano/Éter dietílico (40:60)	Mezclas
78-85	n-Hexano/Éter dietílico (30:70)	Mezclas + C
86-115	n-Hexano/Éter dietílico (10:90)	Mezclas + C
116-129	Éter/Acetato etilo (80:20)	Mezclas + D
130-145	Éter/Acetato etilo (50:50)	Mezclas
146-155	Éter/Acetato etilo (30:70)	Mezclas
156-165	Éter/Acetato etilo (10:90)	Mezclas
166-168	Acetato etilo/Metanol (50:50)	Mezclas
169-175	Metanol	Mezclas

Tabla III.- Desarrollo de la columna correspondiente al extracto clorofórmico de *Achillea ageratum* L.

III.2.5.1.- IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO C

Las fracciones 78-115 se cromatografiaron en capa fina poniéndose de manifiesto una mancha de color gris-verdoso al revelar con Oleum, por lo que procedimos al estudio de dichas fracciones. Mediante cromatografía en capa fina preparativa de silicagel utilizando como fase móvil Hexano/Éter dietílico (30:70) separamos un compuesto que denominamos C.

III.2.5.1 a.- Resultados.

- **Punto de fusión:** 165-167 °C

- **Cromatografía en capa fina:**

El estudio realizado mediante cromatografía en capa fina en soporte de silicagel, nos proporcionó los siguientes valores de Rf:

FASES MOVILES	Rf	COLORACIÓN (Oleum)
n-Hexano/Éter dietílico (70:30)	0,11	gris verdoso
n-Hexano/Éter dietílico (50:50)	0,24	gris verdoso
Cloroformo/Acetato etilo (50:50)	0,66	gris verdoso

- Espectro U.V. (realizado en cloroformo)

U.V.: $\lambda(\text{máx})$: 203 nm (Fig 27)

- Espectrometría de masas: E.M. m/z (%):

412 (M^+ , 30), 394 (17), 300 (21), 255 (38), 133 (26), 97 (29), 83 (72), 69 (58),
55 (100), 43 (33) (Fig 28)

- Resonancia Magnética Nuclear:

Se ha realizado un espectro C_{13} y de protones .

Las asignaciones tentativas del espectro C_{13} se relacionan a continuación:

^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 500 Hz): $\delta = 140.8$ (C-5), 138.4 (C-22), 129.3 (C-23),
121.7 (C-6), 70.8 (C-3), 42.3 (C-13), 42.0 (C-4), 36.8 (C-1), 36.6 (C-10), 31.8
(C-2) (Fig 29)

El espectro de protones se detalla a continuación:

1H -NMR ($CDCl_3$, 300 Hz): $\delta = 0.687$ (s, 18- H_3), 0.842-0.746 (d, 26- H_3 , 27- H_3 ,
29- H_3), 1.001 (s, 19- H_3), 1.017 (d, 21- H_3), 4.95-5.20 (m, 22-H y 23-H), 5.35
(d, J 5.18, 6-H) (Fig 30).

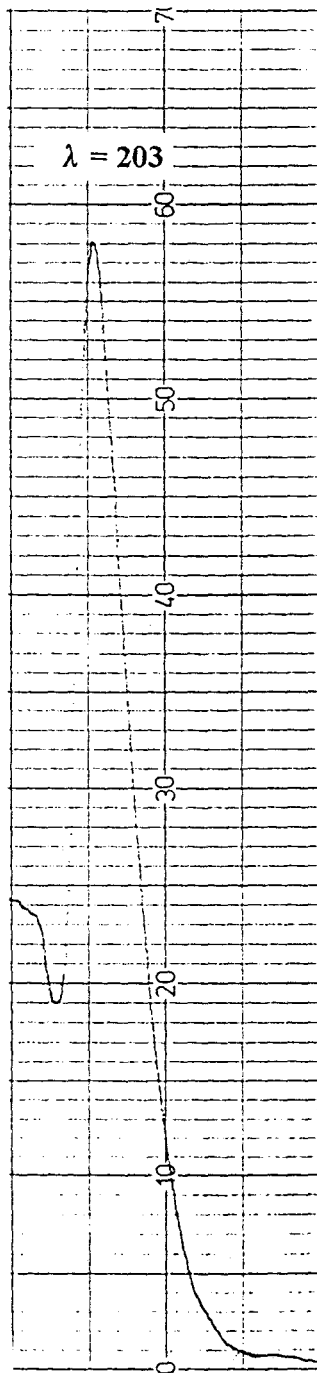


Fig 27.- Espectro U.V. del compuesto C.

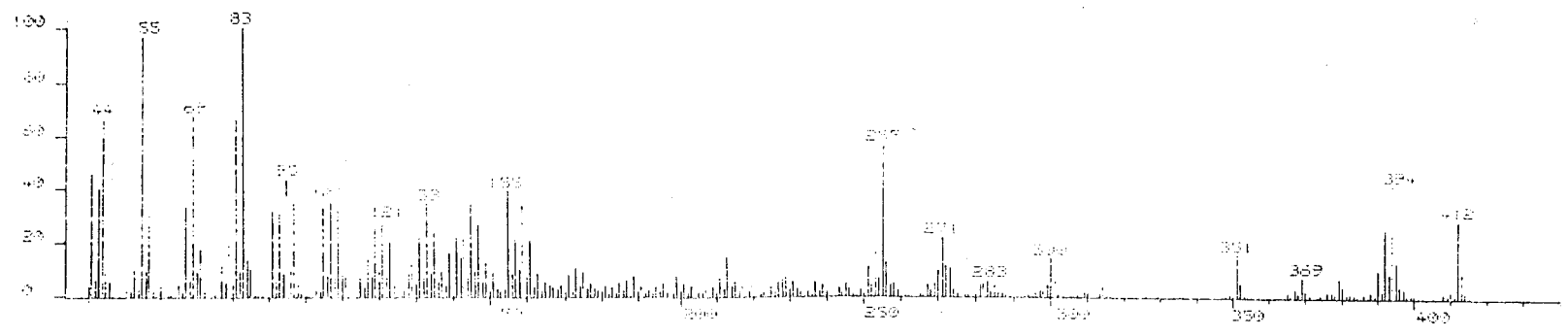


Fig 28.- Espectro de masas del compuesto C.

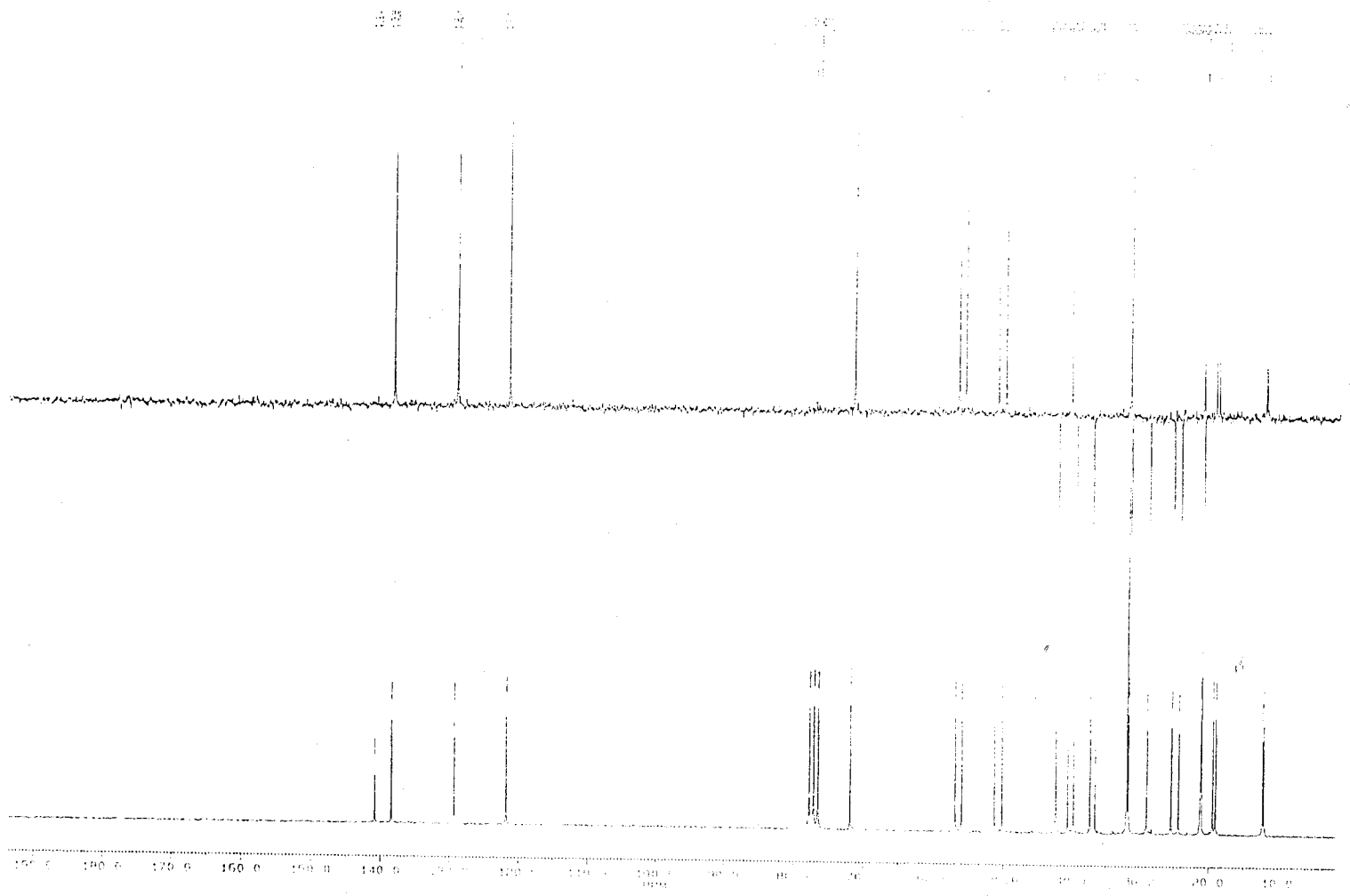


Fig 29.- Espectro (¹³C-RMN) correspondiente al compuesto C.

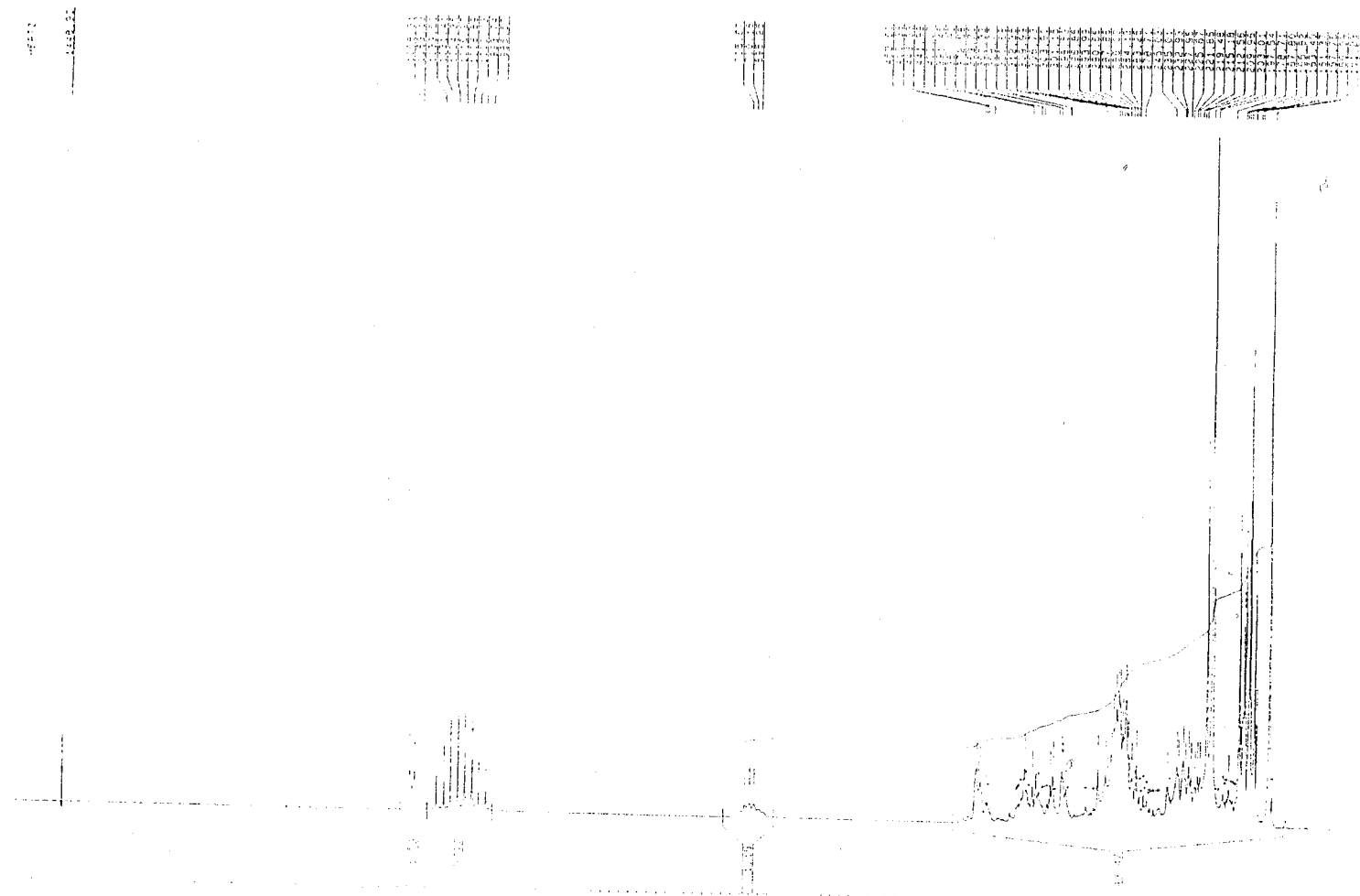


Fig 30.- Espectro (^1H -RMN) correspondiente al compuesto C.

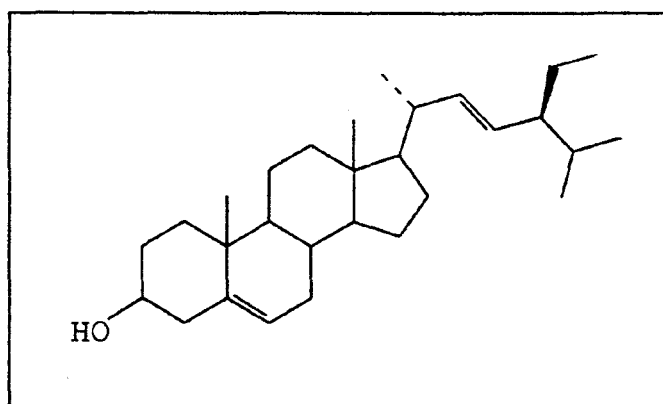
III.2.5.1.b.- **Discusión de resultados.**

El punto de fusión y los valores de Rf y coloraciones obtenidos en los ensayos cromatográficos realizados con el compuesto denominado C coinciden con los encontrados en bibliografía para el Estigmasterol (Rubinstein, I. y col.; 1976) .

El espectro de masas de alta resolución muestra un ión molecular a m/z 412 con una fórmula empírica $C_{29}H_{48}O$. El pico a m/z 255 es indicativo de monoenos.

La pérdida de masa 111 [$C_7H_{11}O$] se corresponde con un ión a m/z 301 característico de la rotura de 3β -hidroxiesteroles con un radical etilo en el C_{24} . El pico base a m/z 55 [C_3H_4O]⁺ es característico de la rotura del anillo A.

Todos estos resultados nos orientan a que el compuesto que denominamos C es el **(22E)-stigmasta-5, 22-dien-3 β -ol** conocido como **ESTIGMASTEROL**.



Consultando la bibliografía, no hemos encontrado ninguna referencia de que este compuesto haya sido identificado en esta especie , aunque si ha sido aislado en el género, concretamente de la especie *Achillea millefolium*. (Chandler, R.F. y col.; 1982).

III.2.5.2.- IDENTIFICACIÓN DEL COMPUESTO D

En el estudio cromatográfico en capa fina de las fracciones 116-129 se observó una mancha gris-verdosa al revelar con Oleum. Separamos dicho compuesto (D) por cromatografía preparativa de silicagel, utilizando como fase móvil n-Hexano/Éter dietílico (40:60).

III.2.5.2.a.- Resultados.

- **Punto de fusión:** 139-142 °C

- **Cromatografía en capa fina:**

El estudio realizado mediante cromatografía en capa fina en soporte de silicagel, nos proporcionó los siguientes valores de R_f y coloración:

FASES MÓVILES	R _f	COLORACIÓN (Oleum)
n-Hexano/Éter dietílico (70:30)	0,07	gris-verdoso
n-Hexano/Éter dietílico (50:50)	0,20	gris-verdoso
Cloroformo/Acetato etilo (50:50)	0,62	gris-verdoso

- Espectro U.V. (realizado en cloroformo)

U.V.: $\lambda(\text{máx})$: 240 nm, 260 nm (s.h.) (Fig 31)

- Espectrometría de masas: E.M. m/z (%):

414 (M^+ 15), 396 (17), 318 (20), 329 (22), 303 (41), 213 (45), 107 (85), 81 (100), 67 (86) (Fig 32)

- Resonancia magnetica nuclear :

Las asignaciones tentativas del espectro C_{13} se relacionan a continuación:

^{13}C -RMN ($CDCl_3$, 500 MHz): $\delta = 140.7$ (C-5), 121.7 (C-6), 71.7 (C-3), 36.1 (C-4), 33.9 (C-1), 33.7 (C-2), 31.6-24.3 (C-7, C-11, C-12, C-15, C-16, C-22, C-23, C-28) (Fig 33).

El espectro de protones se detalla a continuación:

1H -RMN ($CDCl_3$, 300 MHz): $\delta = 0.676$ (s, 18- H_3), 0.829 (d, $J = 6.8$ Hz, 26- H_3), 0.912 (d, $J = 6.5$ Hz, 21- H_3), 1.013 (s, 19- H_3), 5.38 (m, 6-H), (Fig 34).

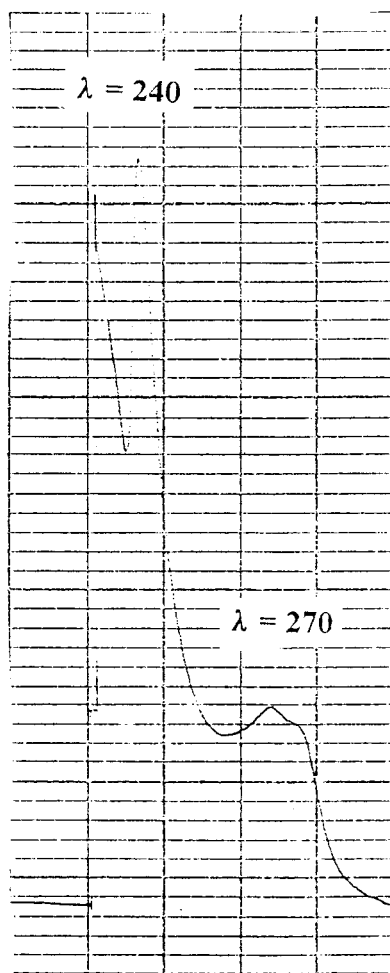


Fig 31.- Espectro U.V. del compuesto D.

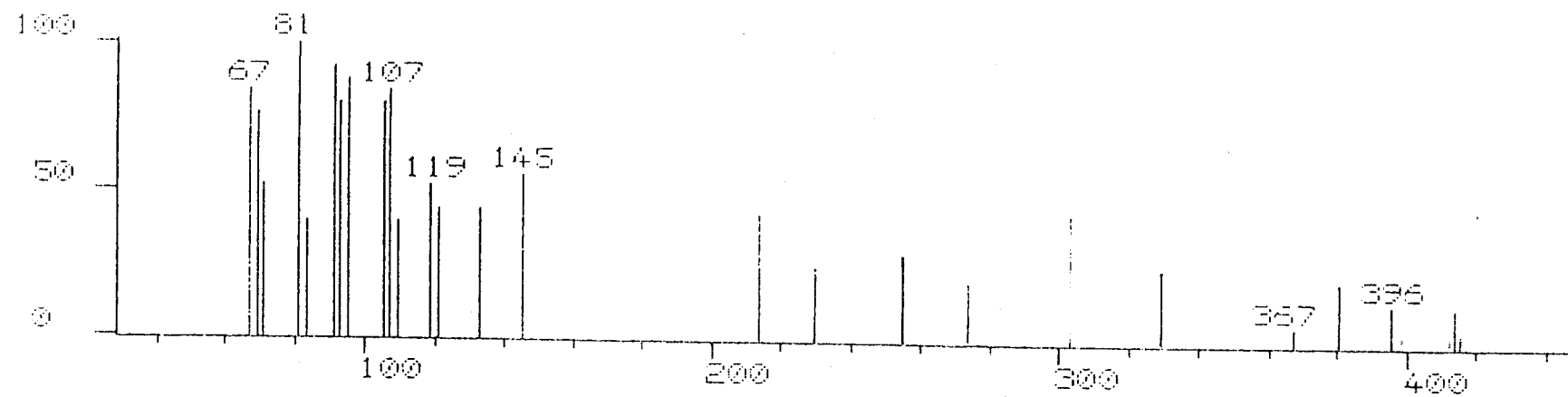


Fig 32. - Espectro de masas del compuesto D.

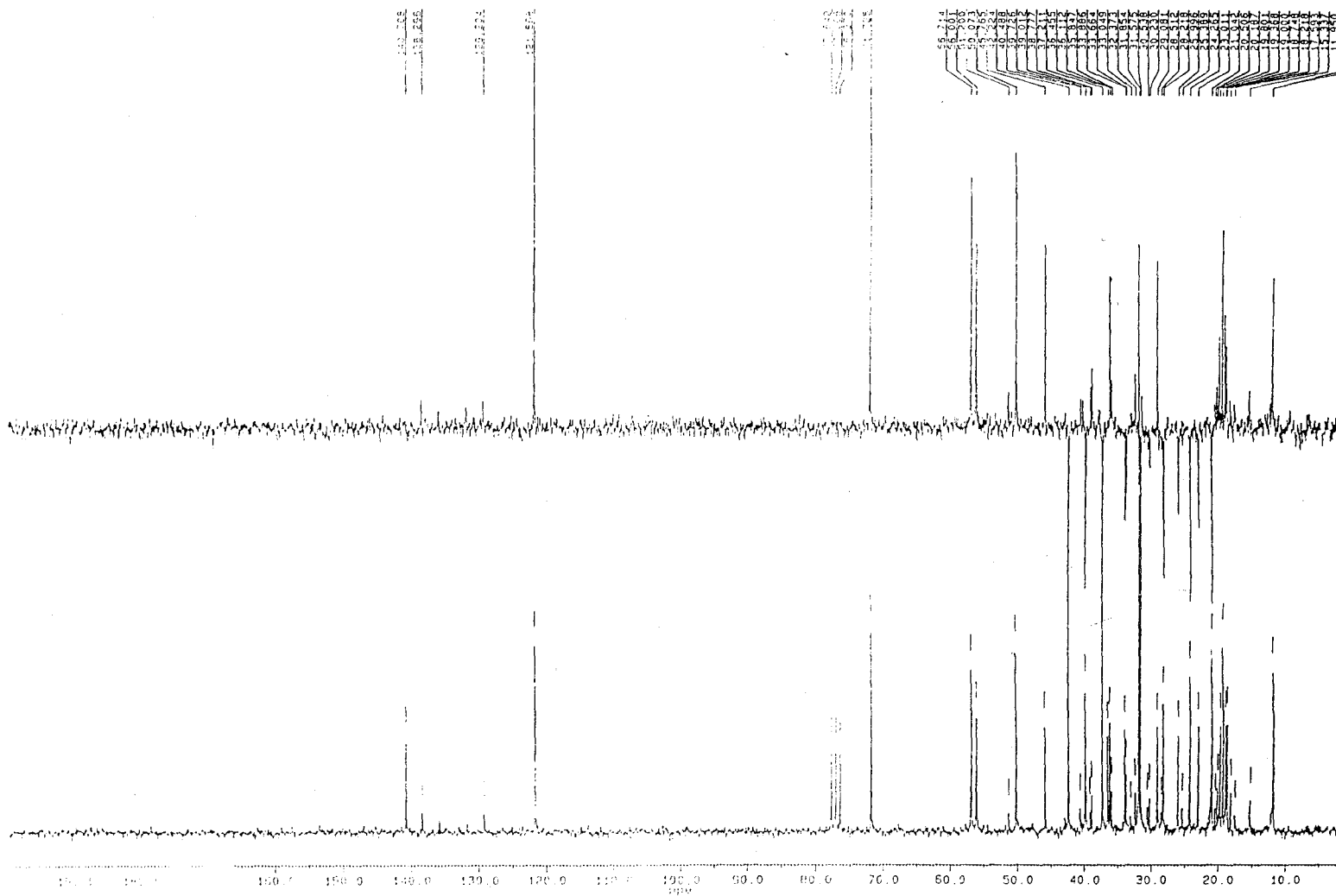


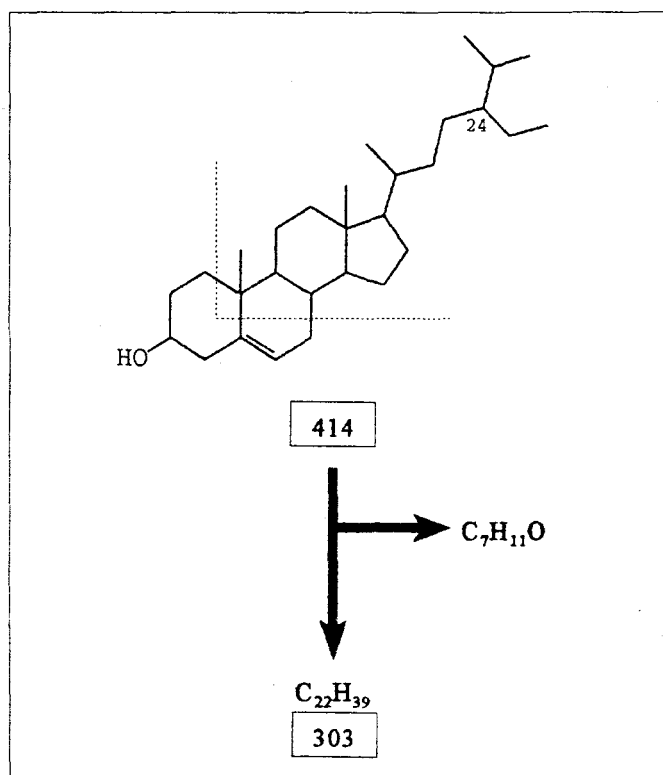
Fig 33.- Espectro (^{13}C -RMN) correspondiente al compuesto D.

III.2.5.2.b.- Discusión de resultados

El punto de fusión y los valores de Rf y coloraciones obtenidas en los ensayos cromatográficos realizadas con el compuesto denominado D, coinciden con los encontrados en bibliografía para el β -Sitosterol (Garg, U.K. y Nes, W.R.; 1984).

El espectro de masas de alta resolución muestra un ión molecular a m/z 414 con una fórmula empírica $C_{29}H_{50}O$.

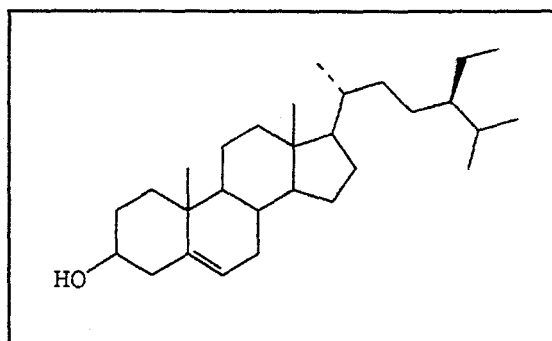
La pérdida de masa 111 ($C_7H_{11}O$) se corresponde con un ión a m/z 303 característico de la rotura de los β -hidroxiesteroides con un radical etilo en el C-24.



El pico a m/z 213 es característico de la presencia de una insaturación en el anillo B.

El pico base a m/z 81 es característico de los ciclohexanos.

Todos estos datos junto con la base de datos consultada y con los encontrados en bibliografía (Kobayashi, M.; 1995) nos permite deducir que el compuesto que denominamos D es el **Stigmast-5-en-3 β -ol** conocido como **β -SITOSTEROL**.



Tras consultar la bibliografía, no hemos encontrado ninguna referencia de que este compuesto haya sido aislado en la especie *Achillea ageratum* L., aunque si en otras especies de este mismo género (*A. millefolium*) (Chandler, R.F. y col.; 1982).

III.3.- ENSAYOS FARMACOLÓGICOS

III.3.1.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD CITOSTÁTICA

III.3.1.1.- ENSAYOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS VEGETALES

(Meristemos de *Allium cepa* L.)

Un antimitótico es todo aquello que dificulta la división celular, siendo esta una de las acciones ideales que debe poseer un preparado anticanceroso.

Cuando exponemos una población de células a una sustancia o condición antimitótica, sólo podemos determinar en un examen microscópico:

- 1) Si las células entran o no en mitosis, y
- 2) En caso de que lo hagan, si su proceso hacia la telofase es normal o no.

El material experimental más apropiado es una población sincronizada de células que pueden ser estudiadas rápidamente en lo que se refiere a las respuestas a distintos agentes en diversos estadios del ciclo. Se han obtenido bastantes éxitos con células en cultivos de tejidos, en los que se destacan los meristemos radiculares de las plantas (Wilson, G.B.; 1969).

LEVAN y LOTFY en 1994 introdujeron el empleo de raíces producidas por los bulbos de *Allium cepa* L. para el estudio de los efectos producidos por diferentes sustancias sobre el ciclo celular.

Nosotros hemos utilizado los meristemos apicales radicales de *Allium cepa* L. var. denominada "francesa", debido a su fácil manejo, su gran producción de raíces, y por presentar dichos meristemos un número elevado de células en división.

III.3.1.1.a.- Condiciones generales de la experiencia

Los ensayos se realizaron con los extractos hexanóicos y clorofórmico de *Achillea ageratum* L., a diferentes concentraciones, comparando en cada caso con un control.

Los bulbos sobre los que se realizaron las pruebas, fueron seleccionados de un tamaño medio y peso comprendido entre 20-40 g.

-Cultivo celular

Los bulbos se cultivaron en tubos de vidrio de aproximadamente 70 mL de capacidad, con agua filtrada mediante un depurador de agua Brawn y renovada cada 24 h. Se hizo burbujear aire a través del mismo, utilizando una bomba de membrana Rena 101 con el fin de mantener el medio a un nivel constante de oxígeno y en permanente agitación.

Todo el sistema de cultivo se aisló dentro de una cabina a una temperatura comprendida entre 20-25 °C, consiguiéndose al mismo tiempo la oscuridad necesaria para el desarrollo de las raíces. Los bulbos se colocaron de tal manera, que sólo sus bases permanecieron sumergidas en agua, manteniéndose así, hasta que sus raíces alcanzaron una longitud de 2-3 cm.

-Tratamiento

Se realizó trasladando los bulbos con raíces desarrolladas a otros recipientes de cultivo conteniendo las disoluciones a ensayar. Este momento se consideró "tiempo cero" o "tiempo de iniciación de las pruebas".

Las condiciones ambientales en las que se realizaron las experiencias, fueron idénticas a las que habíamos mantenido durante el desarrollo de las raíces. Igualmente se mantuvo el sistema de aireación mediante burbujeo.

- Fijación y tinción

Transcurridos los tiempos de tratamiento, tomamos mediante pinzas 3-4 raíces de cada bulbo y se fijaron inmediatamente en la solución Carnoy (etanol/ absoluto/ ácido acético 3:1) (Wilson; 1971). Se procuró siempre elegir raíces bien desarrolladas, que no presentaron anomalías morfológicas visibles, y de un tamaño medio.

Todas las pruebas se realizaron con un mínimo de tres bulbos, fijándose un mínimo de seis raíces a cada uno de los tiempos indicados.

La tinción se efectuó mediante la técnica de TJIO y LEVAN con orceina acético-clorhídrica (Tjio y Levan; 1950).

Orceina (Merk).....	2 g
Ácido acético glacial.....	45 mL
Agua destilada c.s.p.....	100mL

Para preparar el colorante, la orceina se adiciona al ácido acético glacial y se lleva a ebullición a reflujo durante 10 minutos. Dejamos enfriar a temperatura ambiente y añadimos agua destilada hasta completar 100 mL; después de 12 horas de reposo se filtra. La solución de orceina, así obtenida, tiene una concentración de 2 %.

La " solución de trabajo" se obtiene añadiendo una parte de ácido clorhídrico 1 N por cada nueve de la solución descrita anteriormente.

Las raíces previamente fijadas, se colocan en un vidrio de reloj con solución colorante hasta cubrirlas totalmente. A continuación se calienta a la llama de un mechero de alcohol, sujetándolo con unas pinzas espatuladas y haciendolo girar suavemente

Se establece mediante el siguiente cociente:

$$\text{IM} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células en división}}{\text{n}^\circ \text{ células totales}} \times 100$$

El índice de fase (I.F.) expresa el número de células observadas en cada una de las fases mitóticas, por cada 100 células meristemáticas en curso de división.

Se establece por el cociente siguiente:

$$\text{IF} = \frac{\text{n}^\circ \text{ células en una fase determinada}}{\text{n}^\circ \text{ de células en división}} \times 100$$

En todos los casos, estos índices se determinaron contando un número variable de células, que siempre fue superior a 2000.

III.3.1.1.b.- Muestra ensayadas

Las muestras ensayadas han sido los residuos secos procedentes de los extractos hexanoico y clorofórmico de la sumidad florida de la especie *Achillea ageratum* L.

- Tratamiento y recuperación

Las dosis ensayadas han sido 0,25 y 0,5 g de r.s./ 100 mL de agua filtrada.

En todos los casos, las raíces se fijaron a las 4, 8, 24, 48 y 72 horas de tratamiento. Antes de iniciar los tratamiento, se recogieron raíces que fueron fijadas como prueba control.

La recuperación del I.M., prueba necesaria, en caso positivo, para comprobar la reversibilidad del efecto nocivo ejercido sobre las raíces, se determinó a continuación del tratamiento de las 24 horas. Para ello, una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, se colocan los bulbos en contacto con el medio normal de cultivo, el cual se mantiene durante 10, 12, 14 y 16 horas. El tiempo se eligió basándonos en las experiencias de López-Saenz y col. (López-Saenz, J.F. y col.; 1966) que fijan el tiempo de duración del ciclo celular entre 13-14 horas.

III.3.1.1.c.- **Resultados.**

Los valores de los índices mitóticos e índices de fase obtenidos con los extractos hexanoicos, a las diferentes dosis, se presentan en las tablas IV y V, y los correspondientes a los extractos clorofórmicos en la tabla VI y VII.

Las tablas VIII y IX muestran los valores de I.M. e I.F. a las 24 horas de tratamiento y posterior recuperación, correspondientes a los extractos hexanoico y clorofórmico.

La representación gráfica de estos resultados se muestran en las figuras 35, 36 y 37.

En las figuras 38 y 39 se observa las células meristemáticas de *Allium cepa* antes y después de 72 h de tratamiento con el extracto hexanoico (2,5 mg r.s./ ml).

La figura 40 muestra la inhibición producida en la mitosis con la dosis de 2,5 mg r.s. / ml del extracto clorofórmico, a las 72 h de tratamiento.

Tiempo Tratamiento	Células Totales	Células División	I.M.	Prof.	Metaf.	Anaf.	Telof.	IFp	IFm	IFa	IFt
Control	2178	204	9,3	114	33	14	43	55,88	16,17	6,86	21,07
4 h	2231	134	5,78	65	32	15	22	48,5	23,88	11,19	16,41
8 h	2040	116	5,68	54	32	14	16	46,55	27,58	12,06	13,79
24 h	2158	108	5,04	41	32	20	15	37,96	29,62	18,51	13,88
48 h	2456	109	4,43	24	35	25	25	22,02	32,11	22,93	22,93
72 h	2344	57	2,43	9	36	3	9	15,78	63,15	5,26	15,78

Tabla IV.- Valores de I.M. e I.F. a distintos tiempos de tratamiento, correspondientes al Extracto Hexanoico de A. ageratum L. (Dosis: 2.5 mg r.s./ml)

Tiempo Tratamiento	Células Totales	Células División	I.M.	Prof.	Metaf.	Anaf.	Telof.	IFp	IFm	IFa	IFt
Control	2178	204	9,3	114	33	14	43	55,88	16,17	6,86	21,07
4 h	2172	95	4,37	45	7	16	27	47,36	7,36	16,84	28,72
8 h	2075	45	2,16	9	0	6	30	20,01	0	13,33	66,66
24 h	2100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
48 h	2257	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
72 h	2030	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla VII.- Valores de I.M. e I.F. a distintos tiempos de tratamiento, correspondientes al Extracto Clorofórmico de A. ageratum L.
(Dosis: 5 mg r.s./ml)

Tiempo Tratamiento	Células totales	Células división	I.M.	Prof.	Metaf.	Anaf.	Telof.	IFp	IFm	IFa	IFt
Control	2433	304	11,1	196	35	2	43	64,47	11,51	9,86	14,14
24 h	2285	8	0,03	20	13	7	3	52,63	34,21	5,26	7,89
10 h	2597	89	3,48	63	11	3	8	70,78	12,35	7,86	8,98
12 h	2143	76	3,42	55	13	8	5	72,36	17,05	3,5	6,57
14 h	2200	94	4,27	66	8	8	12	70,21	8,5	8,5	12,76
16 h	2211	160	7,23	115	17	30	20	71,87	10,62	5,01	12,5

Tabla VIII.- Valores de I.M. e I.F. a distintos tiempos de tratamientos y posterior recuperación correspondientes al Extrato Hexanoico de A. ageratum L.
(Dosis: 5 mg r.s./ml)

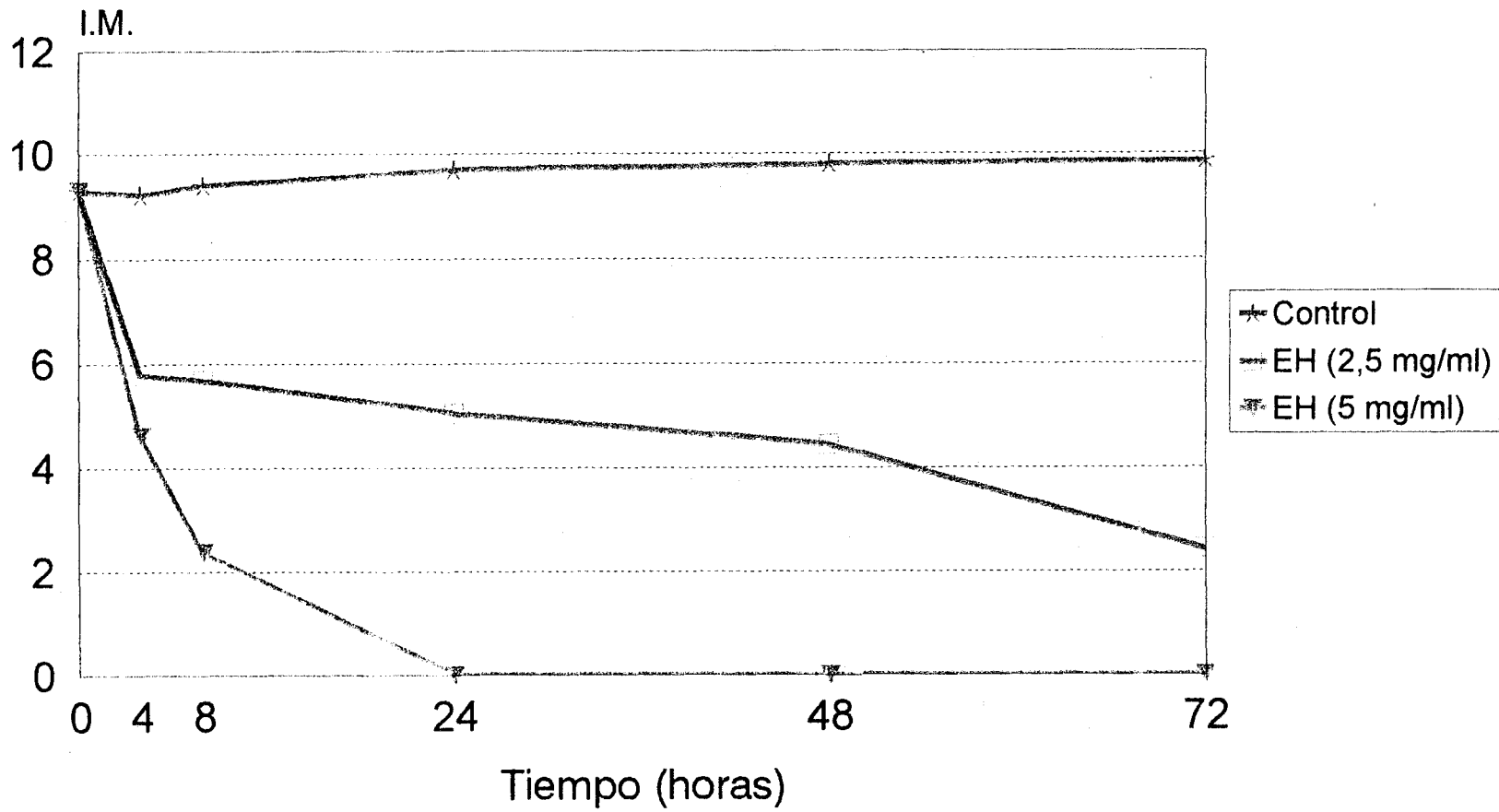


Fig 35.- Variación del I.M. en función del tiempo de tratamiento del Ext^o Hexanoico de A. ageratum.

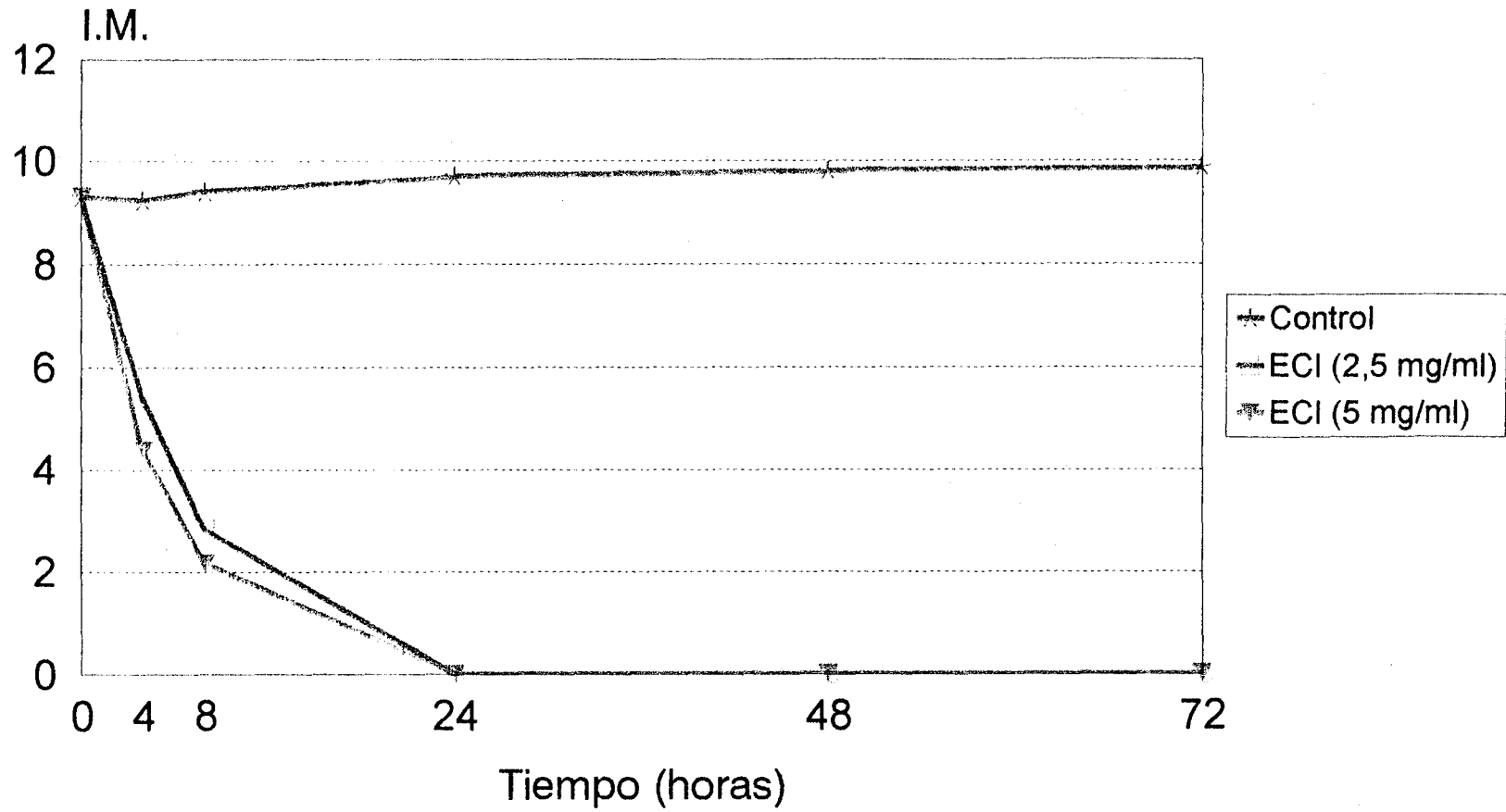


Fig 36.- Variación del I.M. en función del tiempo de tratamiento del Extº Clorofórmico de A. ageratum.

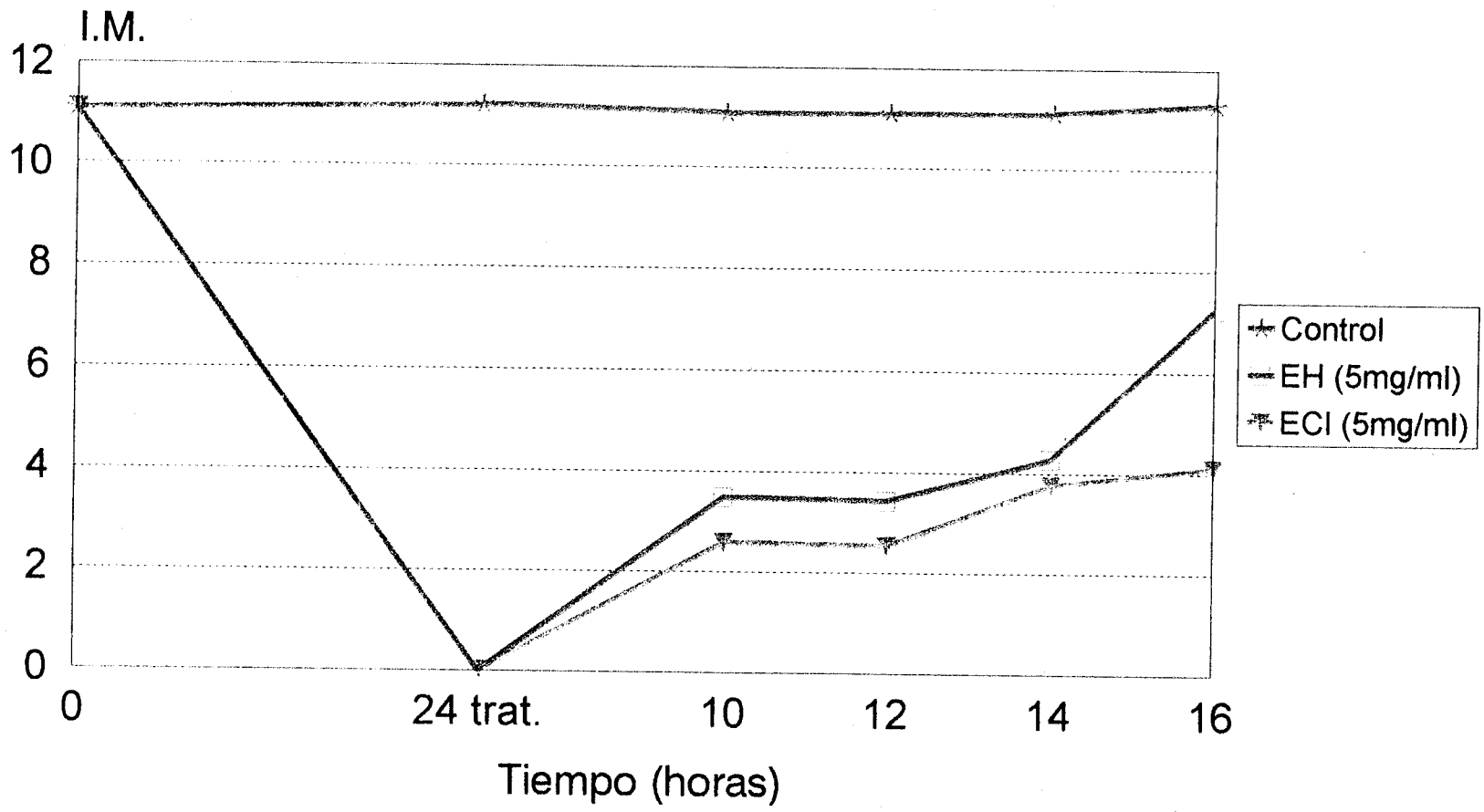


Fig 37.- Variación del I.M. tras 24 horas de tratamiento y posterior recuperación de los Ext^o Hexanoico (EH) y Clorofórmico (ECI) de A. ageratum (5mg/ml).

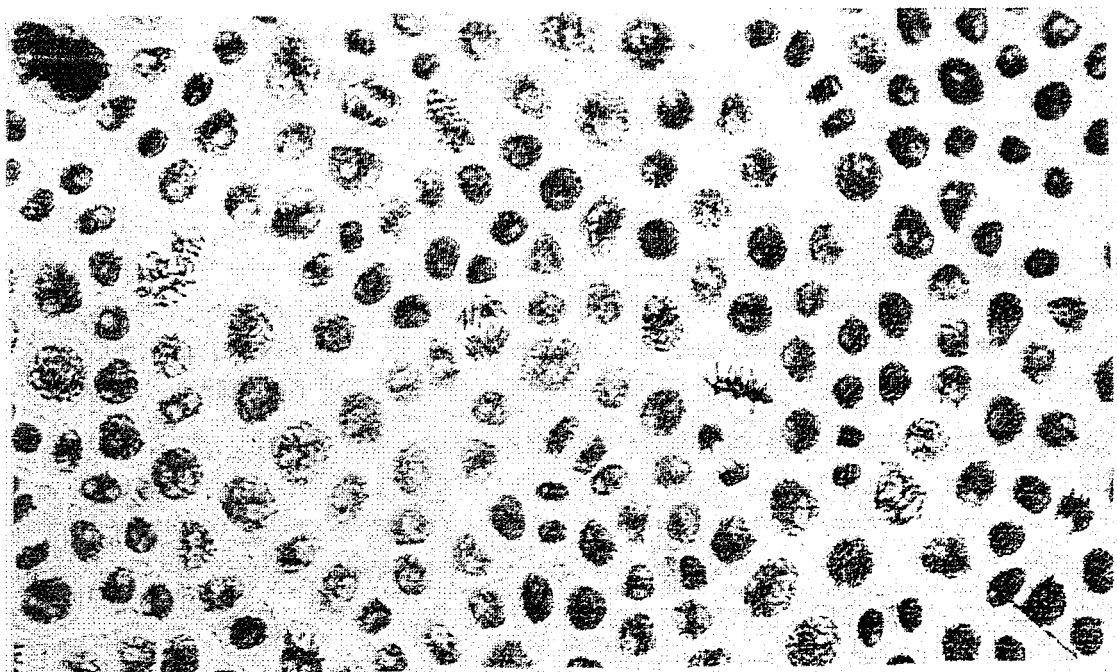


Fig 38.- Células meristemáticas de *Allium cepa* correspondientes a la preparación control (20 X 1,2).

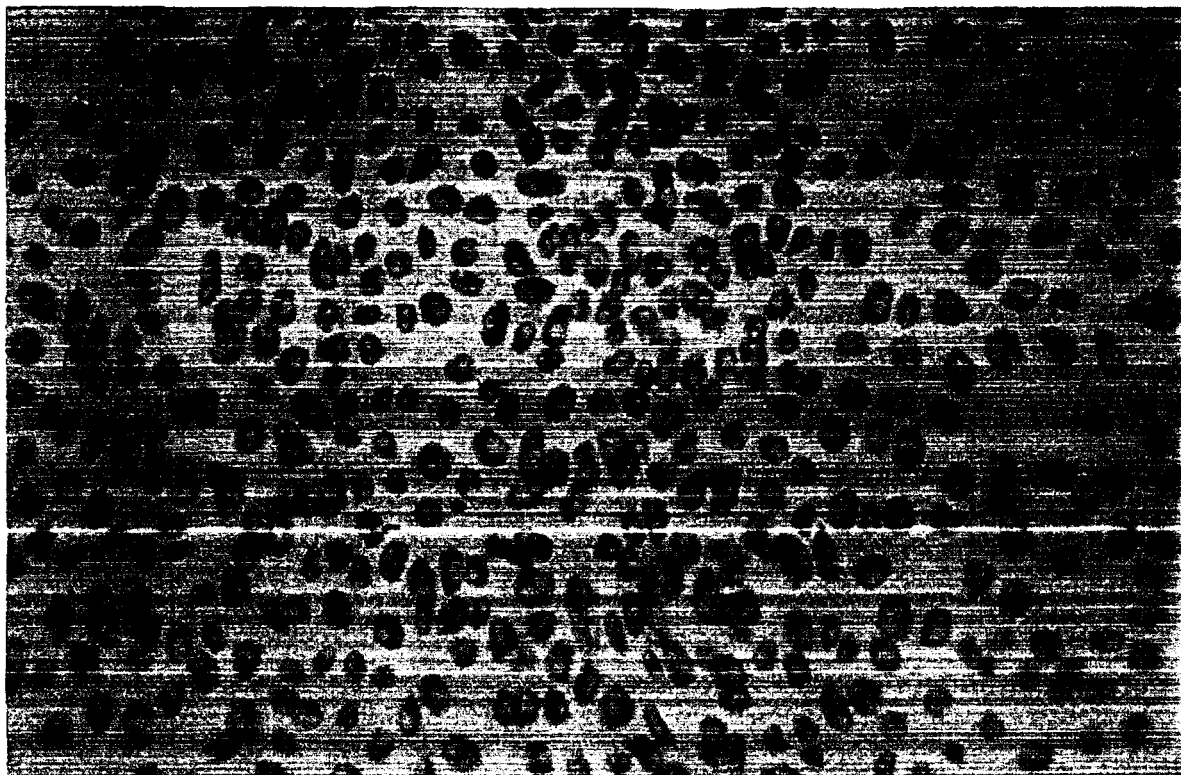


Fig 39.- Células meristemáticas de *Allium cepa* a las 72 h de tratamiento con el extracto hexanoico (5 mg r.s./ml) (20 × 1,2).

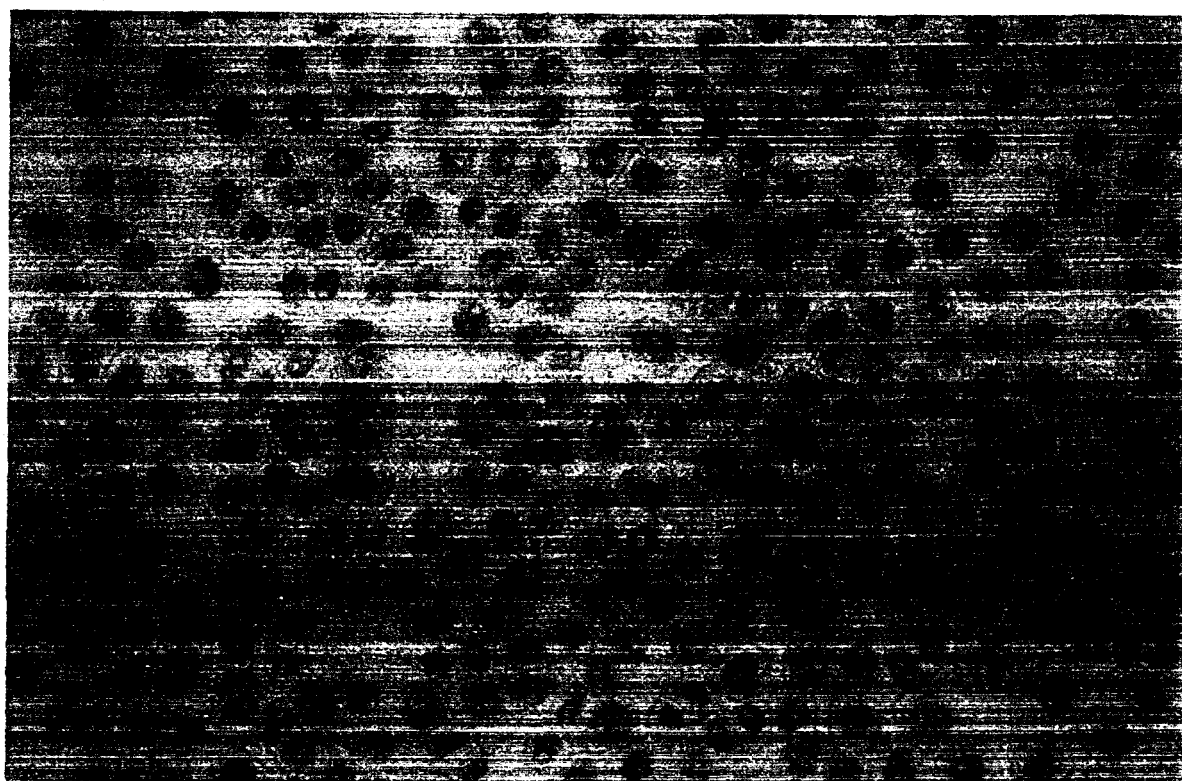


Fig 40.- Células meristemáticas de *Allium cepa* a las 72 h de tratamiento con el extracto clorofórmico (5 mg r.s./ml) (20 × 1,2).

III.3.1.1.d.- Discusión de resultados

Los extractos hexanoico y clorofómico de *Achillea ageratium* L. originan un descenso del I.M. a medida que se prolonga el tiempo de tratamiento, siendo este más marcado a la dosis más alta ensayada (5 mg/ml) con la que se alcanza el I.M. = 0 a las 24 h de tratamiento. Sin embargo, esta total inhibición del desarrollo celular también se consigue con la dosis de 2,5 mg/ml del extrato clorofómico. Esta acción tan marcada puede ser atribuida al contenido en derivados terpénicos de dichas muestras, compuestos que ya han sido descrito con esta acción (Knoshima, T. Y col.; 1995) (Kaminaga, T. Y col.; 1996) (Ahumada, M.C. y col.; 1997) (Yasukawa, K. Y col.; 1998).

La detención provocada en la mitosis se restableció con los dos extractos ensayados, después de someter las raíces a tiempos variables de recuperación en agua, pero sin alcanzar en ningun caso el valor inicial.

Durante todo el tratamiento las células presentaron un aspecto normal, sin deformaciones protoplámicas, ni alteraciones nucleares.

III.3.1.2.- ENSAYOS EN CULTIVOS DE CÉLULAS ANIMALES

(Línea celular HEp-2 y Mc Coy)

A menudo es necesario determinar la proporción de células viables en una población, ya sea, como un paso en el control de la estandarización del cultivo antes de ser usado; o para ensayar la respuesta de un cultivo ante una variable experimental en la preparación de un cultivo primario, o en el tratamiento de una línea celular con una droga citotóxica o un anticuerpo (Freshney, R. I; 1983).

III.3.1.2.a.- Condiciones generales de la experiencia

- Cultivos utilizados. Preparación de subcultivos.

Ensayamos la actividad citostática frente a las líneas celulares: HEp-2 y Mc Coy proporcionadas por el Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de Sevilla.

Rutinariamente, las células se subcultivaron en frascos para cultivos de tejidos (Greiner Labor-technik) de 75 cm² de superficie y 250 mL de capacidad en el medio adecuado. Antes de la inoculación, 24 horas, tomamos los correspondientes frascos de células que contenían una monocapa continua (generalmente se utilizaron cultivos de 3 días de crecimiento) y eliminamos el medio metabolizado. Para dispersar las células se utilizó una solución de tripsina-verseno (T-V) previamente calentada a 37 °C (para

favorecer la acción enzimática de la tripsina), lavamos la monocapa con 5 mL de dicha solución con el fin de arrastrar las células desprendidas y decantamos. Añadimos nuevamente 5 mL de T-V que dejamos en contacto con las células durante un minuto aproximadamente, hasta que comienza a desprenderse la monocapa. Pasado este tiempo, retiramos el exceso de T-V y llevamos el frasco a estufa a 36 °C hasta observar el total desprendimiento de las células. A continuación se añaden 8 mL del medio de crecimiento "medio esencial mínimo de Eagle" (M.E.M.) y se dispersa el masa celular. Posteriormente resuspendemos el células en 30 mL de M.E.M. y tomamos una pequeña muestra para realizar un conteo y así saber el número de células para poder disponer del número de frascos y cantidad de medio que sea necesario. Ajustamos dicha suspensión celular a 100.000 cél/mL añadiendo la cantidad necesaria de M.E.M. Por último, distribuimos la células en frascos de 25 cm² de superficie y 50 mL de capacidad, a razón de 5 mL por frasco, incubamos a 36 °C durante 24 horas para la obtención de una monocapa continua.

Las características de las células están recogidas en las tablas X y XI.

- Inoculación de las muestras.

Todas las muestras antes de ser inoculadas, se esterilizaron por filtración a través de una membrana Millipore de 0,22 μ .

Se inoculó 0,5 mL de la muestra a ensayar (tanto para las muestras problemas como patrón) en cada frasco que contenía 5 mL del medio de crecimiento, dejando siempre frascos controles.

Todas las muestras se incubaron a 36 °C durante 72 horas.

- Determinación de la concentración de las proteínas celulares.

Antes de la determinación de las proteínas celulares, sometemos el cultivo a un proceso de purificación. Para ello, eliminamos el medio una vez transcurridos las 72 horas de la inoculación, añadimos a cada frasco 5 mL de T-V y los llevamos a estufa a 36°C durante 10 minutos.

Cuando las células se han desprendido le añadimos 5 mL de M.E.M. y centrifugamos 10 minutos a 200 r.p.m.. Recogemos el precipitado y lo lavamos con 10 mL de PBS (tampón fosfato, pH 7,2) con el fin de eliminar los aminoácidos que quedan en el medio. Centrifugamos durante 10 minutos. El precipitado se resuspende nuevamente en 1 mL de PBS y así lo empleamos para hacer la determinación proteica.

Dicha determinación se realizó por el método colorimétrico descrito por BRADFORD (Bradford, M.M.; 1976); basado en la observación de que el colorante "azul brillante de Coomasie" puede presentar coloración roja o azul según esté libre o unido a proteínas, dando máximos de absorción a 465 nm y 595 nm respectivamente (Reisner, A.H. y col.; 1975).

El complejo proteína-colorante tiene un alto coeficiente de extinción molar, por lo que la técnica puede detectar μg de proteínas. La unión a proteínas se realiza en un corto espacio de tiempo (2 min) y el color es estable durante 1 hora aproximadamente.

El reactivo utilizado es BIO-RAD (Gimb H).

La determinación se realizó en tubos de vidrio de 10 mL, cada uno de los cuales contenía:

Tubo nº	I	II	III	IV	V	VI
Standard albúmina (μL)	-	20	40	60	70	-
Tritón X-100 1% (μL)	10	10	10	10	10	10
Agua bidestilada (μL)	90	70	50	20	20	85
Solución a valorar (μL)	-	-	-	-	-	-
Reactivo (mL)	1	1	1	1	1	1

El standard de albúmina se preparó a una concentración de 100 µg /mL , por lo que las cantidades de proteínas en cada tubo correspondían a:

Tubo n°	I	II	III	IV	V	VI
µ g Albúmina	0	2	4	6	7	-

Después de mezclar bien el contenido de todos los tubos, se dejan a temperatura ambiente durante 3-5 minutos, y a continuación medimos las absorbancias a 595 nm en un espectrofotómetro PERKIN ELMER, lambda 3.

Todas las determinaciones fueron dobles.

Con los valores obtenidos para las soluciones de albúminas, construimos una recta patrón, representando en ordenadas absorbancias, y en abcisas la cantidad de proteínas en µg contenidas en cada tubo. La ecuación de la recta resultante fue:

$$y = 0,00651 x - 0,00875.$$

La cantidad de proteínas de nuestras muestras expresadas en µg, se calculan a partir de esta ecuación.

Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición del crecimiento celular frente al control.

- Fijación y tinción del cultivo celular.

Se realizó para observar la morfología característica de las células cultivadas y así poder detectar la posible presencia de transformaciones.

Previamente a la fijación del cultivo, decantamos el medio de crecimiento de las células (una vez transcurrido el período de incubación) y lavamos con solución salina tamponada (P.B.S) a 37 °C.

Fijamos con alcohol etílico del 70 % durante 24 horas, donde se mantiene hasta el momento de hacer la tinción, que se llevó a cabo con Hematoxilina-Eosina.

Para ello lavamos (2 veces) con agua destilada y tratamos con Hematoxilina de Harris (Difco), durante 3 minutos, y a continuación con carbonato de litio unos minutos más (hasta que aparezca un cambio de coloración de morado a azul). Volvemos a lavar (dos o tres veces más) y mantenemos el agua durante 5 minutos. Decantados nuevamente, tratamos con Eosina (Difco) durante 20 segundos, se vuelve a decantar y lavamos seguidamente con agua.

Las preparaciones, mantenidas en glicero-gelatina, se observaron y fotografiaron con un equipo microfotográfico Olympus BH.

Establecida	Células procedentes de carcinoma epidermoide de laringe de un hombre adulto, establecidas por A.E. Moore, L. Sabachewshy y A.W. Toolan en 1952 (Cancer Res., 15, 588 ; 1955)
Morfología	Epiteloide
Nº modal de cromosomas	76 (59-195)
Subcultivos	Cada 3 días
Tiempo de tripsinización	0,2 %, aproximadamente 5 minutos
Medio	Medio esencial mínimo Eagle + suero bovino fetal 5 % + solución penicilina-estreptomicina (5000 UI/mL- 5000 µg/mL) 2 %
Cambio de cultivo	Diarios a partir del tercer día de siembra
Tº de incubación	36 °C

Tabla X.- Características de la línea celular HEp-2.

Establecida	Células procedentes del fluido sinovial de la articulación de rodilla de un paciente con artritis degenerativa, establecidas por Pomerat y col. (Z. Zellforsch, 47 ,158-174; 1957).
Morfología	Predominio de leucocitos polimorfonucleares.
Nº modal de cromosomas	-
Subcultivos	Cada tres días
Tiempo de tripsinización	0,2 %; aproximadamente 5 minutos
Medio	Medio esencial mínimo de Eagle + aminoácido no esenciales+ BBS Earle 90 % + suero bovino fetal 10 %
Cambio de cultivo	Diarios a partir del tercer día de siembra
Tº de incubación	36 °C

Tabla XI .- Características de la línea celular Mc Coy.

III.3.1.2.b.- Muestras ensayadas.

- Extractos hexanoico y clorofómico.

Las dosis a ensayar se tomaron de acuerdo con los protocolos dados por el National Cancer Institute (N.C.I.) (Anon, P.; 1962) (Geran, R.I. y col.; 1972) que recomienda la dosis máxima de 30 $\mu\text{g r.s./mL}$ como DE_{50} para los extractos vegetales en estos cultivos celulares. Como patrón se utilizó 6-Mercaptopurina a la dosis de 0,5 $\mu\text{g r.s./mL}$.

Una vez inoculados los frascos de cultivo con las cantidades correspondientes para obtener las concentraciones anteriormente indicadas, se incubaron a 36 °C durante 72 horas.

A continuación, y previa purificación, se procedió a la determinación de las proteínas celulares por el método colorimétrico de BRADFORD, expuesto en el apartado III.3.1.2.a

- Compuestos aislados: Estigmasterol, β -Sitosterol y α -Amirina.

Las dosis de 4, 6 y 8 $\mu\text{g r.s./mL}$ se seleccionaron en base a que el N.C.I. recomienda una dosis máxima de 6 $\mu\text{g r.s./mL}$ como DE_{50} para principios activos, en estos dos cultivos celulares.

Para facilitar la disolución, al ser compuestos poco solubles en agua, se añadió Tween 80 en una proporción no superior al 10 %.

Estas soluciones fueron medidas frente al control y a la solución patrón de 6-Mercaptopurina.

III.3.1.2.c.- Resultados.

Los valores de absorbancia de las muestras, sus equivalentes en μg de proteínas, y los porcentajes de inhibición del crecimiento celular frente al control para cada uno de los extractos ensayados con respecto a las células HEp-2 se recogen en la tabla XII y los correspondientes a los cultivos de células McCoy en la tabla XIII.

Las tablas XIV y XV muestran los valores de inhibición obtenidos al tratar los cultivos celulares Hep-2 y Mc Coy con los compuestos aislados.

La representación gráfica de estos resultados se muestran en las figuras 41, 42, 43 y 44.

Las figuras 45 y 46 corresponden a culturas controles de células de Hep-2 y Mc Coy respectivamente. En la figura 47 se observa las células Hep-2 después del tratamiento con el extracto hexanoico (15 μg) y en las figuras 48 y 49 dichas células después de tratarlas con β -Sitosterol (8 μg) y la α -Amirina (4 μg) respectivamente.

	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Abs (595 nm)	Concentración proteínas (μg)	Inhibición Celular (%)	DI ₅₀
Control	-	0,074 \pm 0.001	11,38	-	
6- Mercaptopurina	5	0,014 \pm 0,008 ***	4,26	52,85	
Ext ^o Hexanoico	30	0 ***	0	100	
	15	0,031 \pm 0,009 **	5,2	95,44	8,47
Ext ^o Clorofómico	5	0,050 \pm 0,019 *	7,95	30,13	
	30	0 ***	0	100	
	15	0,057 \pm 0,011 **	9,3	91,87	11,35
	5	0,063 \pm 0,020 n.s.	9,79	13,94	

** p<0,01 * p<0,05 n.s. no significativo

Tabla XII.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los Extractos Hexanoico y Clorofómico de A. ageratum a distintas dosis en las células HEP-2.

	Dosis ($\mu\text{g/ml}$)	Abs (595 nm)	Concentración proteínas (μg)	Inhibición Celular (%)	DI ₅₀
Control	-	0,115 \pm 0,006	18,77	-	
6- Mercaptopurina	5	0,059 \pm 0,0028 **	10,49	44,11	
Ext ^o Hexanoico	40	0,033 \pm 0,0018 *	6,35	66,16	
	30	0,052 \pm 0,0070 n.s.	9,41	49,86	26,5
	20	0,074 \pm 0,0041 n.s.	10,15	45,9	
Ext ^o Clorofórmico	40	0,041 \pm 0,0010 **	7,35	60,79	
	30	0,079 \pm 0,0031 *	10,79	42,47	34,23
	20	0,1038 \pm 0,005 n.s.	14,61	22,16	

** p<0,01 * p<0,05 n.s. no significativo

Tabla XIII.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los Extractos Hexanoico y Clorofórmico de *A. ageratum* a distintas dosis en las células Mc Coy.

	Dosis (µg/ml)	Abs (595 nm)	Concentración proteínas (µg)	Inhibición Celular (%)	DI ₅₀
Control	-	0.095 ± 0.001	18,77	-	
6- Mercaptopurina	5	0.014 ± 0.0080 **	4,25	52,85	
Estigmasterol	8	0,042 ± 0,0021 ***	7,78	27,82	
	6	0,077 ± 0,0041 **	13,16	0	10,39
	4	0,092 ± 0,0015 ***	15,46	0	
β-Sitosterol	8	0,019 ± 0,0070 *	4,25	60,52	
	6	0,071 ± 0,0073 n.s.	12,24	23,11	7,43
	4	0,103 ± 0,0060 *	17,15	0	
α-Amirina	8	0,007 ± 0,0067 **	2,42	77,55	
	6	0,044 ± 0,0063 *	4,11	61,87	5,65
	4	0.018 ± 0.0029 n.s.	8,1	24,86	

** p<0,01 * p<0,05 n.s. no significativo

Tabla XIV.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los compuestos aislados de *A. ageratum* a distintas dosis en las células HEp-2.

	Dosis (µg/ml)	Abs (595 nm)	Concentración proteínas (µg)	Inhibición Celular (%)	DI 50
Control	-	0,115 ± 0,006	18,77	-	
6- Mercaptopurina	5	0,059 ± 0,0028 **	10,49	44,11	
Estigmasterol	8	0,050 ± 0,0018 ***	9,02	51,94	
	6	0,057 ± 0,0056 **	10,17	45,81	7,19
	4	0,089 ± 0,0098 n.s.	15,09	19,56	
β-Sitosterol	8	0,037 ± 0,0064 **	7,05	62,43	
	6	0,058 ± 0,0031 **	10,17	45,85	6,14
	4	0,065 ± 0,0072 *	11,45	38,99	
α-Amirina	8	0,023 ± 0,0034 **	4,88	74	
	6	0,036 ± 0,0052 **	6,68	63,4	4,59
	4	0,059 ± 0,0076 *	10,41	44,53	

** p<0,01 * p<0,05 n.s. no significativo

Tabla XV.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los compuestos aislados de A. ageratum a distintas dosis en las células Mc Coy.

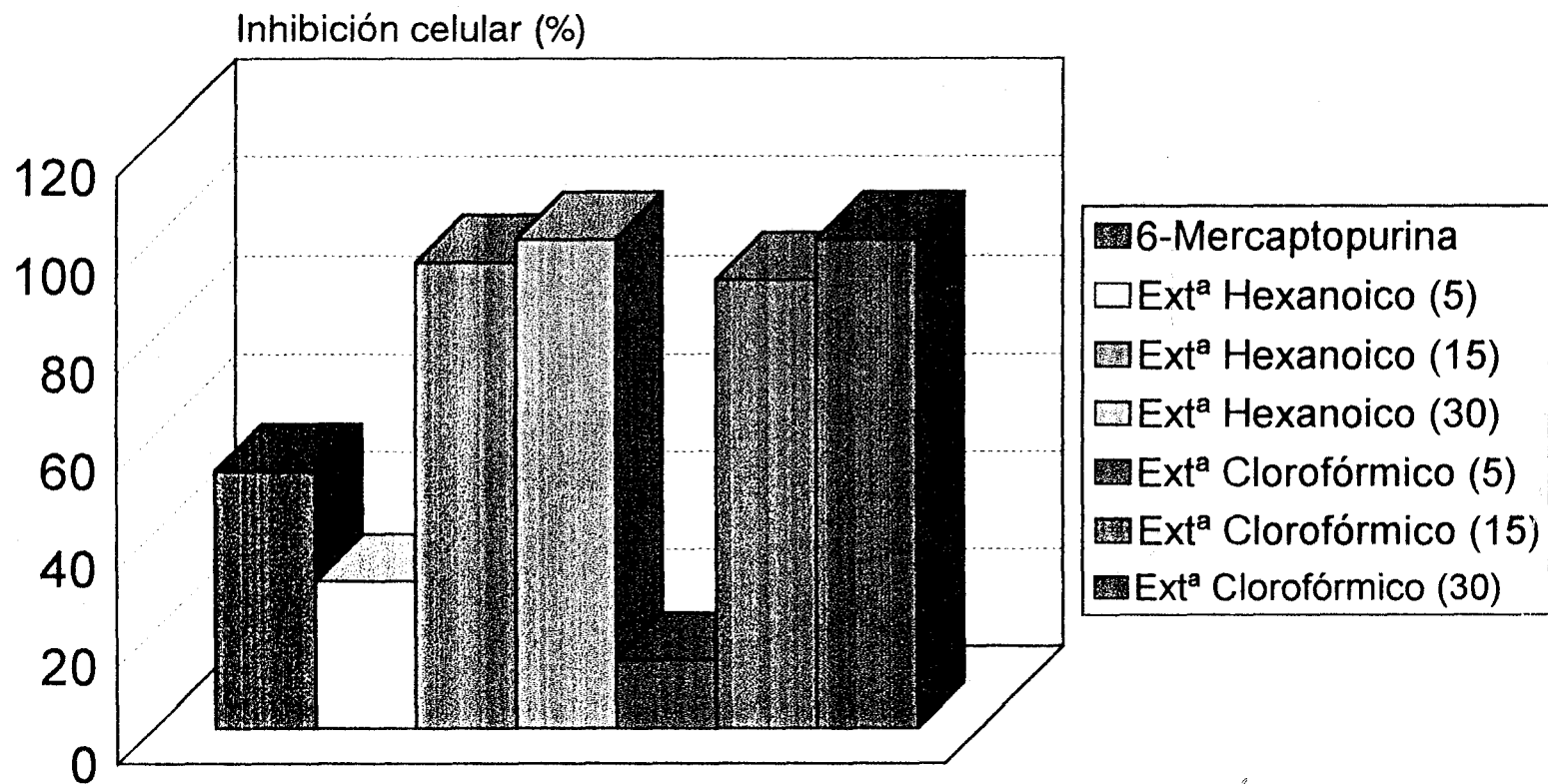


Fig 41.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los Extractos Hexanoicos y Clorofórmico de A. ageratum a distintas dosis en las células HEP-2.

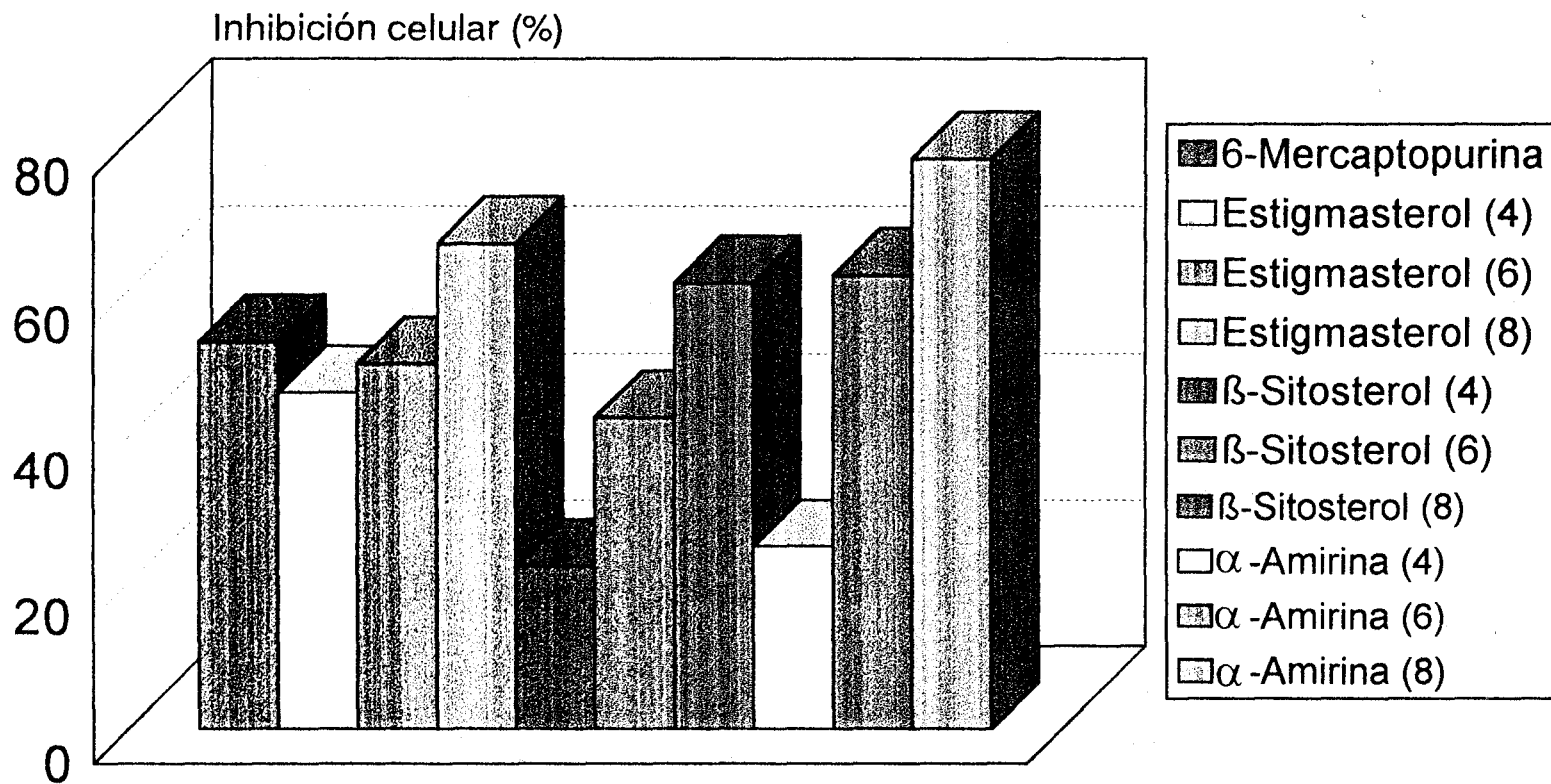


Fig 42.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los compuestos de A. ageratum a distintas dosis en las células HEp-2.

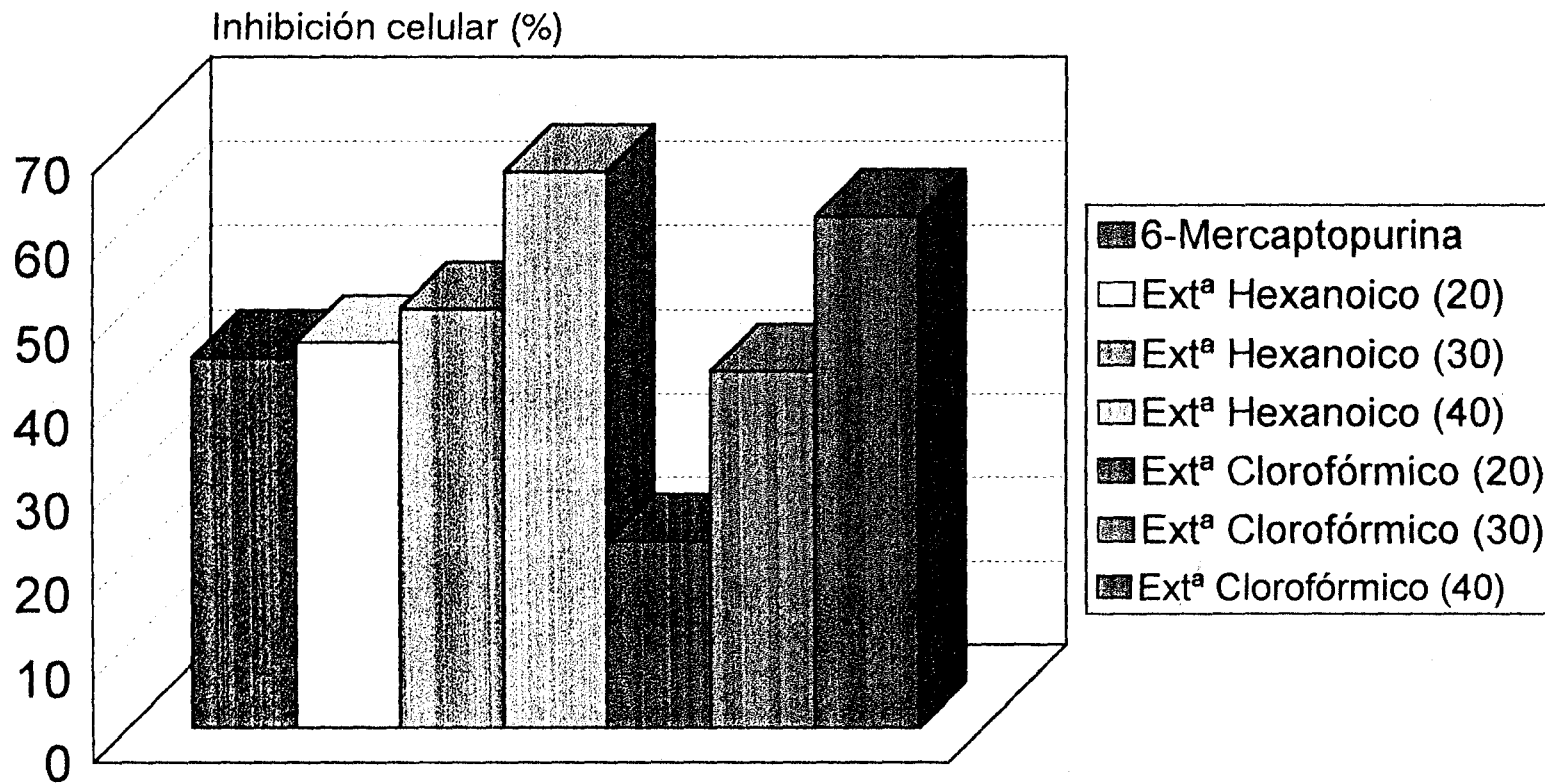


Fig 43.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los Extractos Hexanoicos y Clorofórmico de A. ageratum a distintas dosis en las células Mc Coy.

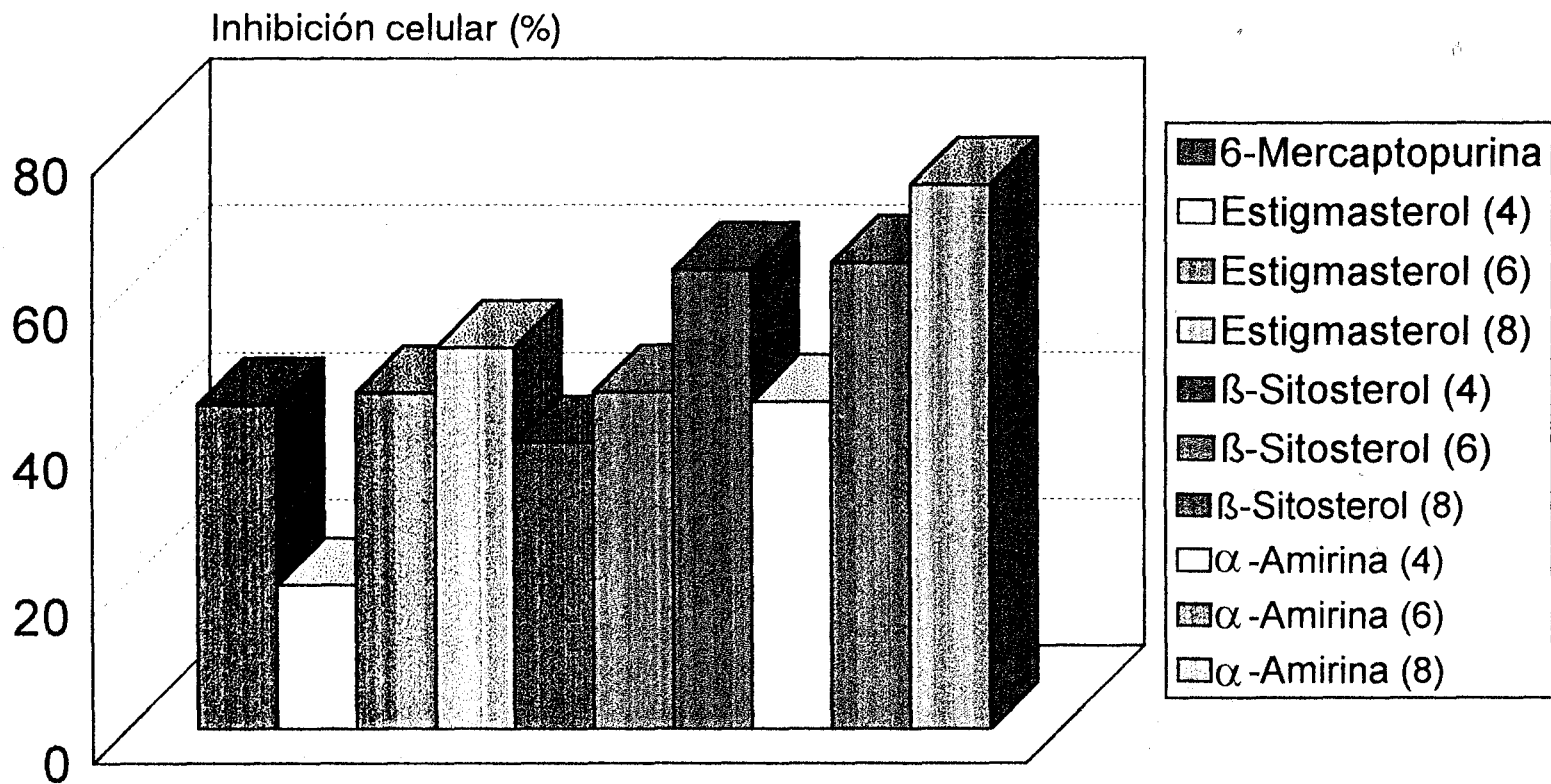


Fig 44.- Valores obtenidos en las pruebas realizadas con los compuestos de A. ageratum a distintas dosis en las células Mc Coy.

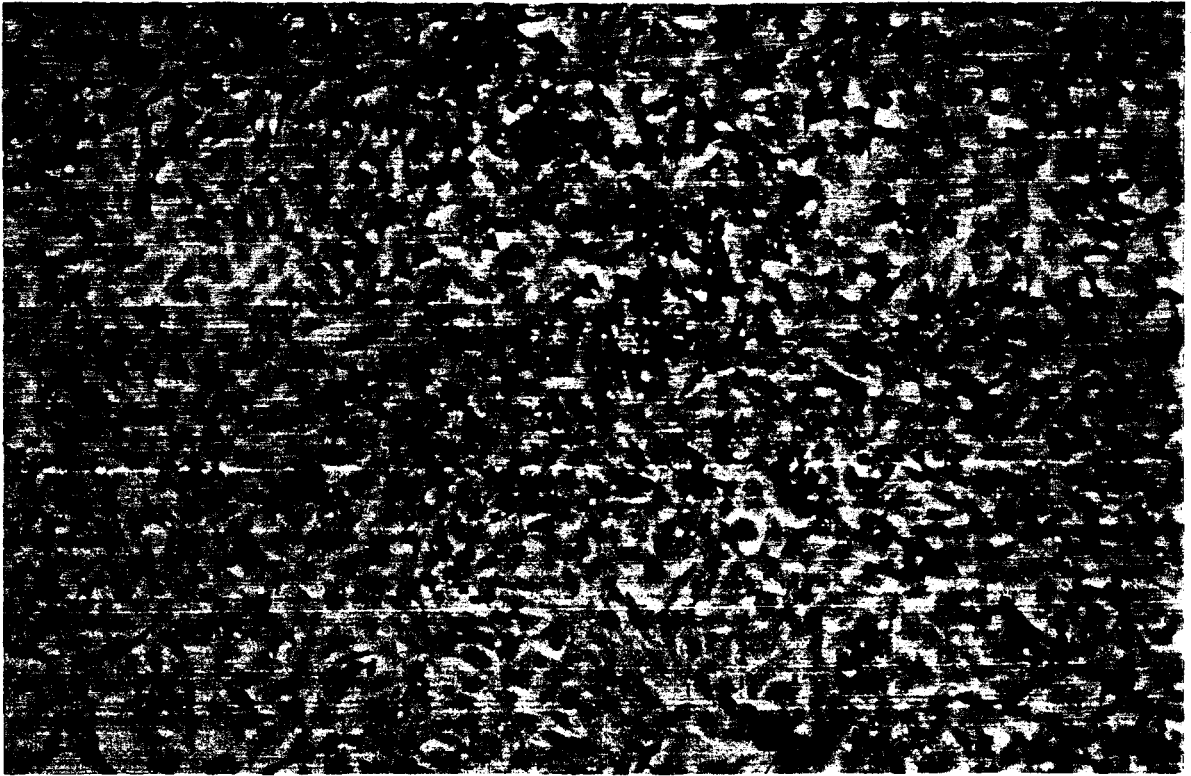


Fig 45.- Cultivo control de células Hep-2 ($10 \times 1,2$).

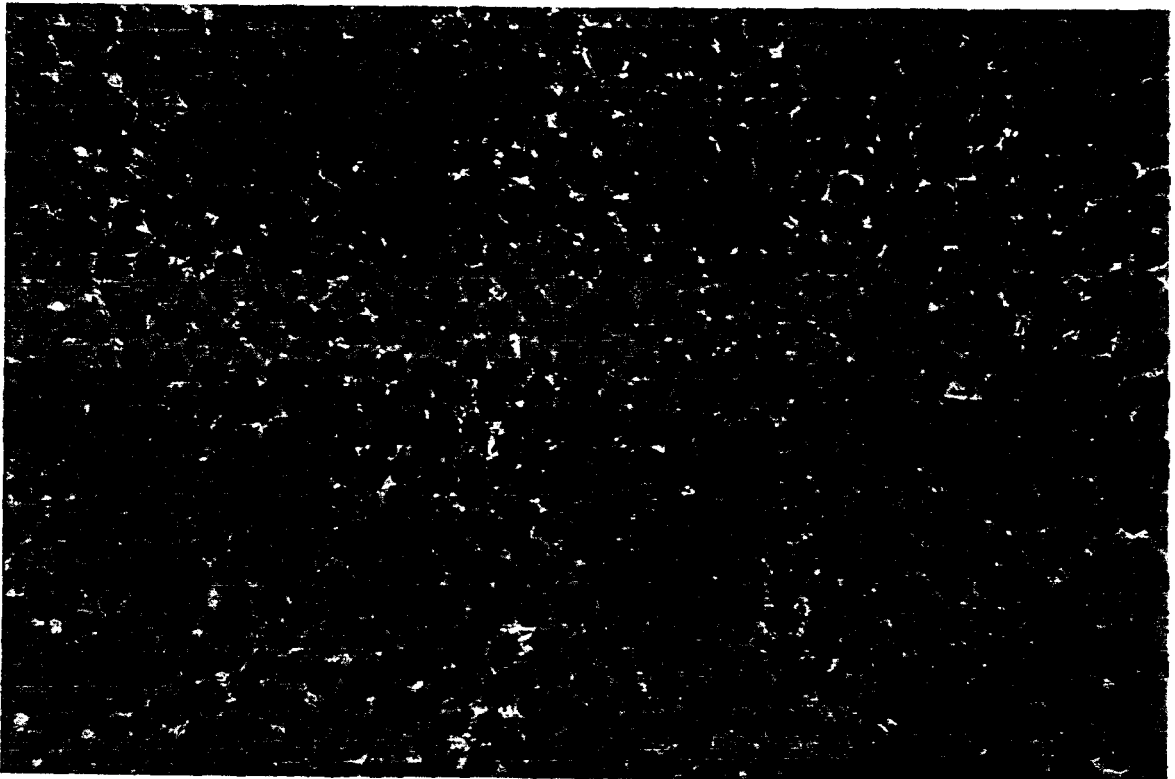


Fig 46.- Cultivo control de células Mc Coy ($20 \times 1,2$).

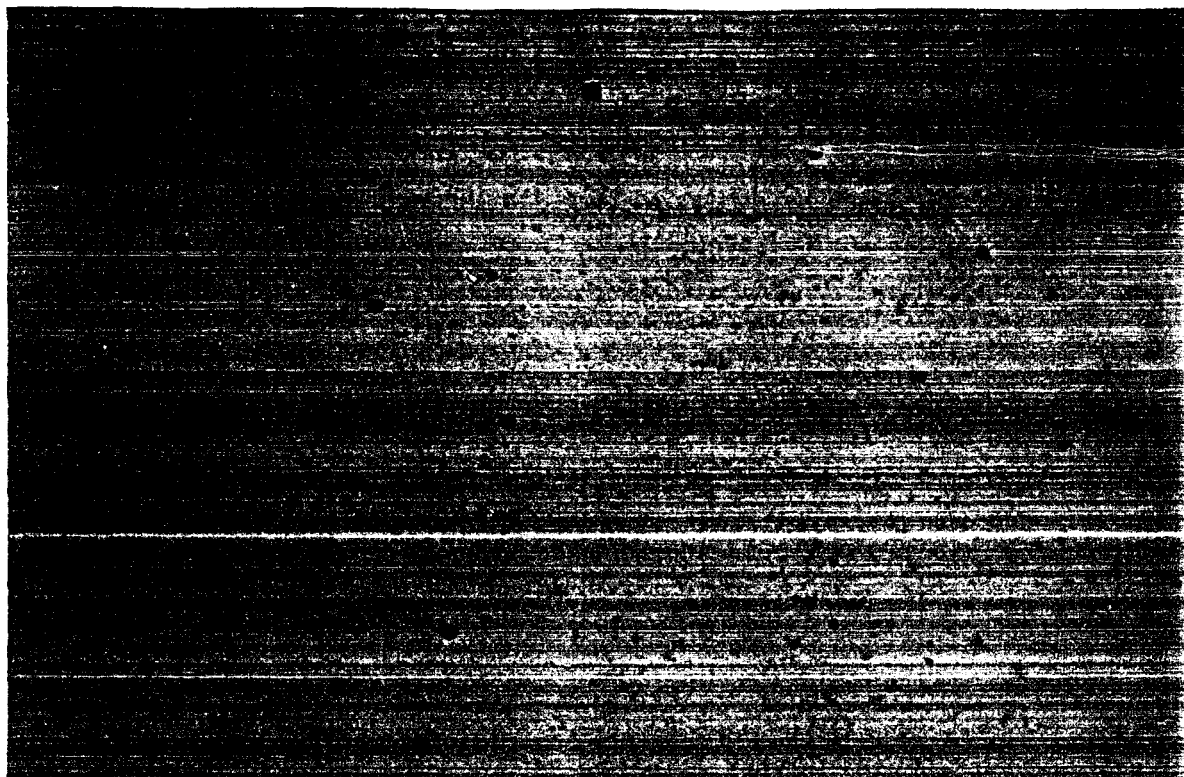


Fig 47.- Células Hep-2 tratadas con el extracto hexanoico a la dosis de 15 μg ($10 \times 1,2$).

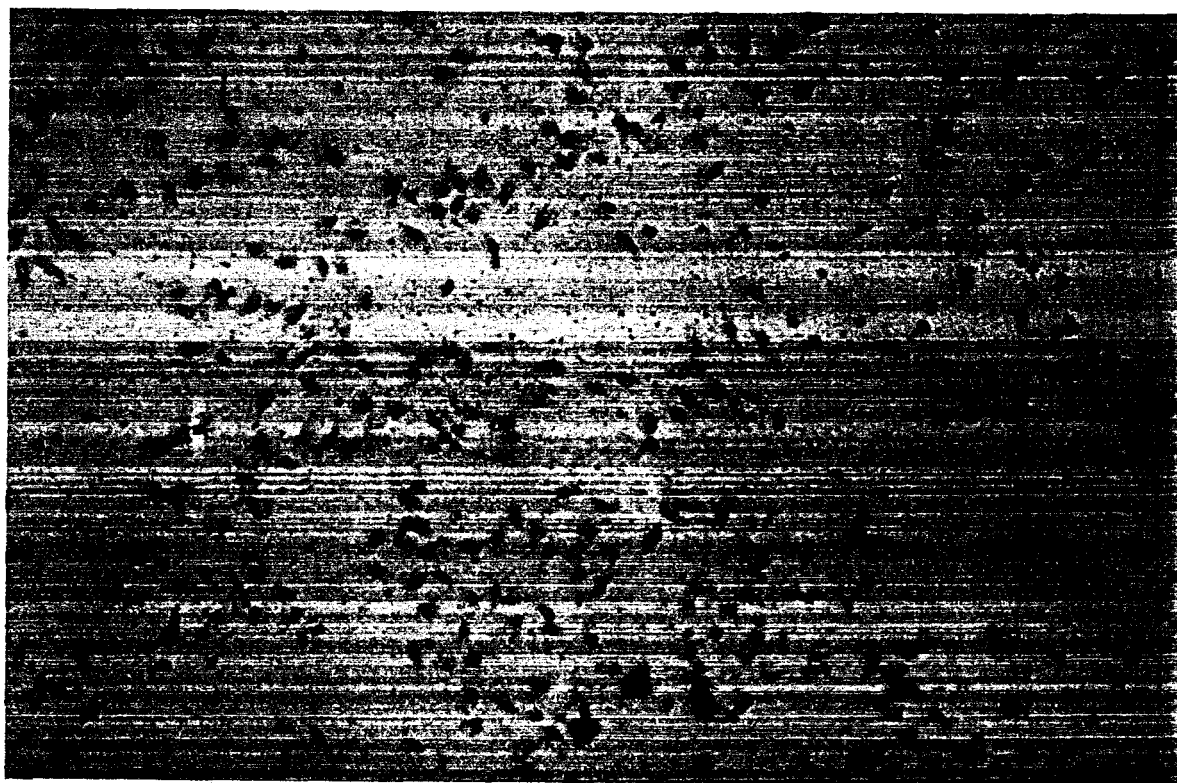


Fig 48.- Células Hep-2 tratadas con β -Sitosterol a la dosis de 8 μg ($10 \times 1,2$).

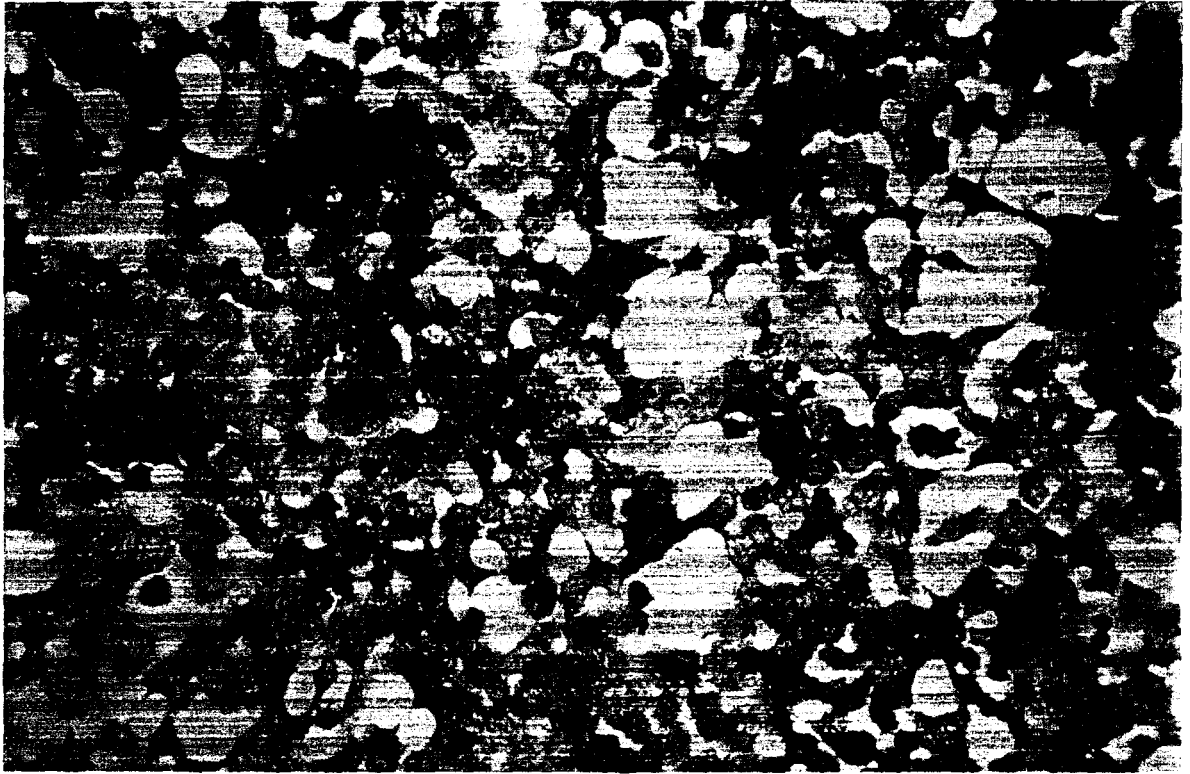


Fig 49.- Células Hep-2 tratadas con α -Amirina a la dosis de 4 μ g ($20 \times 1,2$).

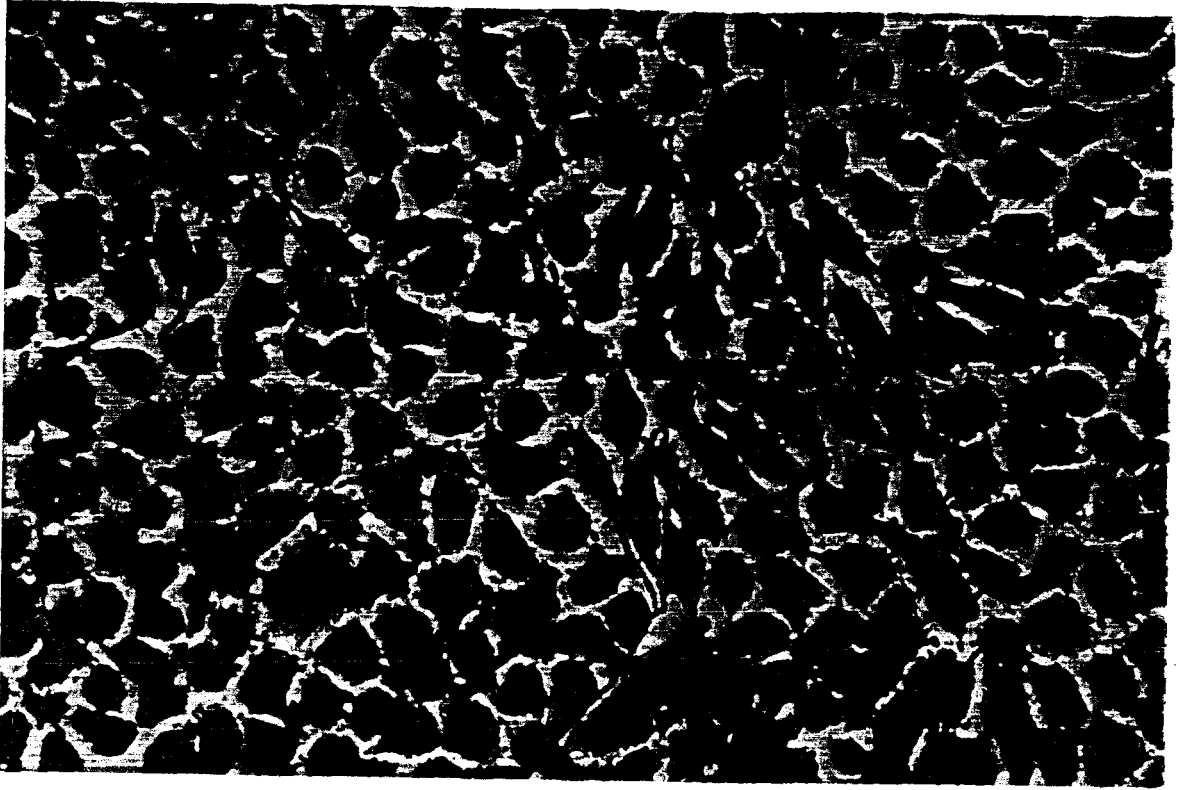


Fig 50.- Células Mc Coy tratadas con el extracto cloroformico a la dosis de 20 μg ($40 \times 1,2$).

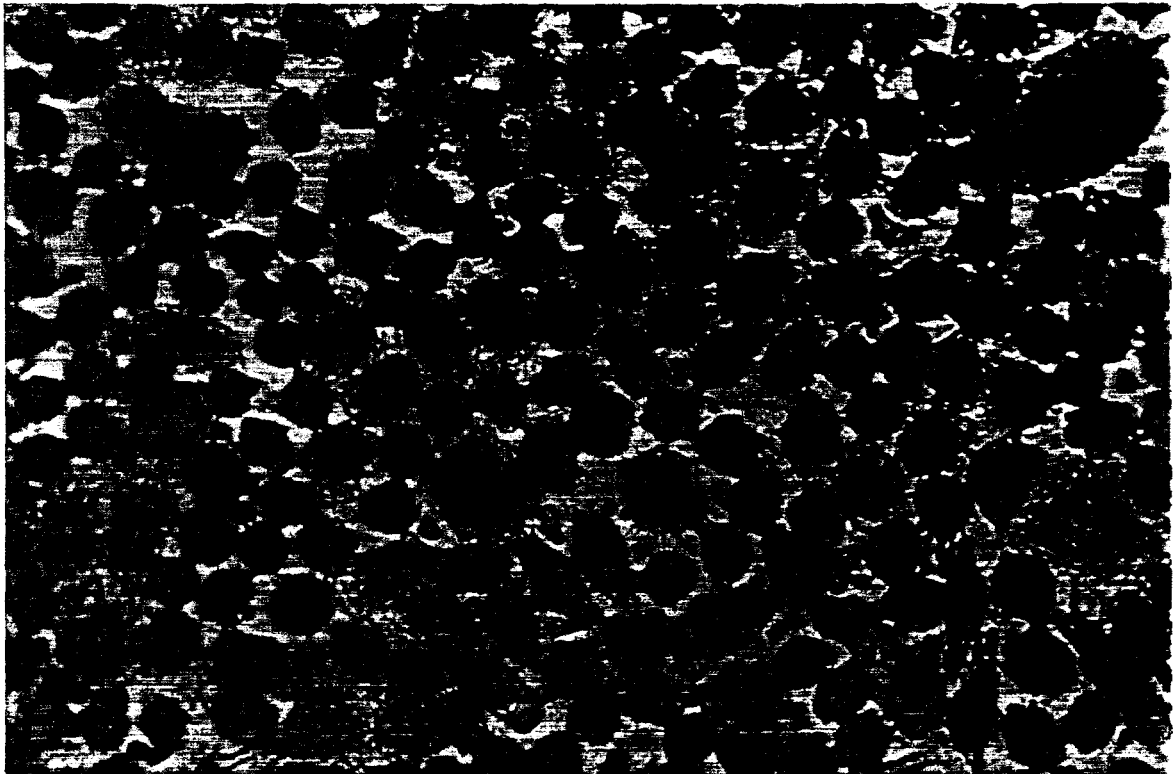


Fig 51.- Células Mc Coy tratadas con β -Sitosterol a la dosis de 4 μg ($40 \times 1,2$).

III.3.1.2.d.- **Discusión de los resultados.**

La actividad citostática obtenida con los dos extractos estudiados, frente a las dos líneas celulares ensayadas, es más acentuada frente al cultivo celular Hep-2, obteniéndose en este caso unas DI_{50} inferiores a las recomendadas por el Instituto Nacional del Cancer de Estados Unidos (I.N.C.) (Geran, R.I. y col.; 1972) para extractos de plantas; donde las dosis deben ser igual o menor 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un primer ensayo y menor de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en un segundo ensayo, para considerar estos ensayos potencialmente citotóxicos.

De todos los compuesto ensayados sólo α -Amirina presenta una DI_{50} inferior a la recomendada por el I.N.C. para compuestos puros, siendo ligeramente más activa frente a células Mc Coy.

Tdo esto, nos hace pensar en la posibilidad de que otros compuestos existentes en el extracto puedan contribuir a las actividad citostática de *Achillea ageratum* L.

III.3.2.- ENSAYOS DE ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.

Desde el siglo I (Font Quer, 1990) hay datos referentes a la utilización de esta especie como antiinflamatorio en medicina popular. Esto unido, a que los extractos hexanoicos y clorofórmicos son ricos en esteroides y triterpenos, es lo que nos ha inducido al estudio de esta actividad.

Para ello, de las numerosas técnicas de valoración de principios con actividad antiinflamatoria hemos seleccionado los más interesantes, realizando métodos de estudio "in vivo" e "in vitro".

III.3.2.1.- MÉTODOS DE ESTUDIO "IN VIVO".

III.3.2.1.1.- EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR CARRAGENINA

Se ha elegido el método propuesto por Winter (Winter, N.W. y col.; 1962), que es una técnica preliminar que nos permite valorar la actividad antiinflamatoria sobre un modelo de inflamación aguda, ya que la utilización del pletismómetro de mercurio permite una rápida y reproducible determinación cuantitativa de la reacción inflamatoria consecuente a la inyección subplantar de carragenina en la pata de la rata.

La carragenina es un mucopolisacárido obtenido de *Chondrus crispus*, alga marina del Mar de Irlanda (Almagro, C.B.; 1976), que no parece ser influenciada ni por la cepa, sexo ni peso del animal, y por tanto, es más fácilmente reproducible el resultado; además de la correlación existente entre las dosis utilizadas a nivel de laboratorio y clínico (Otterness, I.J. y Gans, D.J. ; 1988).

La determinación cuantitativa del edema de la pata de la rata se efectúa mediante un pletismómetro de mercurio de LENCE (Lence, P. ; 1962), especialmente diseñado para medir el volumen de la pata. Se marca con tinta la pata de la rata a nivel del maleólo lateral y a continuación se sumerge en un recipiente lleno de mercurio. El aumento del volumen que experimenta el mercurio se registra en una escala. La medida se realiza inmediatamente después de la inyección plantar de carragenina, y a las 1, 3 y 5 horas posteriores a la misma. Se calcula en cada caso, el porcentaje de inflamación en relación con el volumen inicial.

La carragenina produce una reacción inflamatoria de tipo bifásico (Cook, L. et al.; 1957), es decir, durante la primera hora tras su administración se eleva rápidamente debido al trauma de la inyección (Di Rosi, M. y col. ; 1971) (Doherty, M.A. y Robinson, L.M.; 1975) y en muy alto grado el volumen de la pata, este efecto comienza a decrecer a los 30 min. aproximadamente. Transcurrida dicha hora se inicia la segunda fase que se mantiene hasta las tres horas posteriores. Al principio de la misma se observa un aumento suave del volumen, pero a los 30 min. tiene lugar un incremento muy acelerado. Aparentemente la primera fase está relacionada con la liberación de los mediadores de la inflamación, histamina y serotonina. Por el contrario, la segunda parece deberse a la liberación de quininas.

En estudios recientes se ha indicado que la fase de liberación de la histamina y serotonina se prolonga durante toda la primera hora y es seguida por un aumento en la permeabilidad vascular, relacionada con la liberación de quininas que se mantiene hasta las tres horas.

Pero el efecto inflamatorio se mantiene hasta transcurridas seis horas desde la administración, ya que la migración de leucocitos al lugar de la inflamación libera una prostaglandina que colabora con la permanencia del edema.

III.3.2.1.1 a. - Condiciones generales de la experiencia

Se han utilizado ratas de la raza Wistar machos y hembras de peso medio comprendido entre 150-200 g, las cuales fueron agrupadas en lotes de 6 y mantenidas en ayunas 18 horas previas a la experiencia.

La inflamación se provoca por la inyección de 0,1 mL de una suspensión de carragenina al 1 % en la aponeurosis plantar de la pata derecha de la rata.

Una hora antes de la inyección del agente flogógeno se procede a la administración de los extractos a ensayar por vía oral.

Para facilitar la disolución en solución salina fisiológica de los extractos insolubles en agua, se ha utilizado Tween 80 en una proporción no superior al 10 %.

Al lote control se le administró solución salina fisiológica (10 mL/Kg animal) con Tween 80.

El antiinflamatorio seleccionado como patrón ha sido Indometacina, administrada a una dosis de 25 mg/Kg animal.

III.3.2.1.1.b.- Muestras y dosis ensayadas

* Extracto hexanoico de *Achillea ageratum* L. a las dosis de 250, 500 y 750 mg/Kg de animal.

* Extracto clorofórmico de *Achillea ageratum* L. a las dosis de 250,500 y 750 mg/Kg de animal.

III.3.2.1.1.c.- Resultados

El porcentaje de inhibición del edema para cada ensayo se determina por la expresión:

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(V_t - V_0) \text{ control} - (V_t - V_0) \text{ muestra}}{(V_t - V_0) \text{ control}} \times 100$$

(LANHERS, M.C. y col.; 1992)

V_0 = Volumen antes del tratamiento con carragenina.

V_t = Volumen de la pata a las 1, 3 y 5 horas después de la administración de la carragenina.

Las dosis efectivas 50 (DE_{50}) se han calculado mediante el análisis de Probit.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas XVI, XVII y XVIII y se representan graficamente en las figuras 52 y 53.

	Dosis (mg/kg animal)	Variación Vo	del 1 h	Volumen 3 h	(ml) 5 h	Inhibición 1 h	del edema 3 h	(%) 5 h
Control	-	1.60 ± 0.01	2.01 ± 0.04	2.77 ± 0.08	2.80 ± 0.11	-	-	-
Indometacina	25	1.40 ± 0.07 ***	1.60 ± 0.03 ***	1.60 ± 0.04 **	1.65 ± 0.005 **	67,2	75,9	69,14
Ext ^o Hexanoico	250	1.72 ± 0.03 **	2.09 ± 0.009 ***	2.60 ± 0.02 ***	2.74 ± 0.006 ***	0	27,21	16,39
	500	1.93 ± 0.01 ***	1.83 ± 0.07 n.s.	1.99 ± 0.05 **	2.03 ± 0.06 n.s.	1,46	51,45	50,1
	750	1.50 ± 0.02 **	1.87 ± 0.028 *	1.95 ± 0.025 **	2.02 ± 0.02 **	8,29	61,7	56,33

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tabla XVI.- Actividad antiinflamatoria del extracto hexanoico de A. ageratum

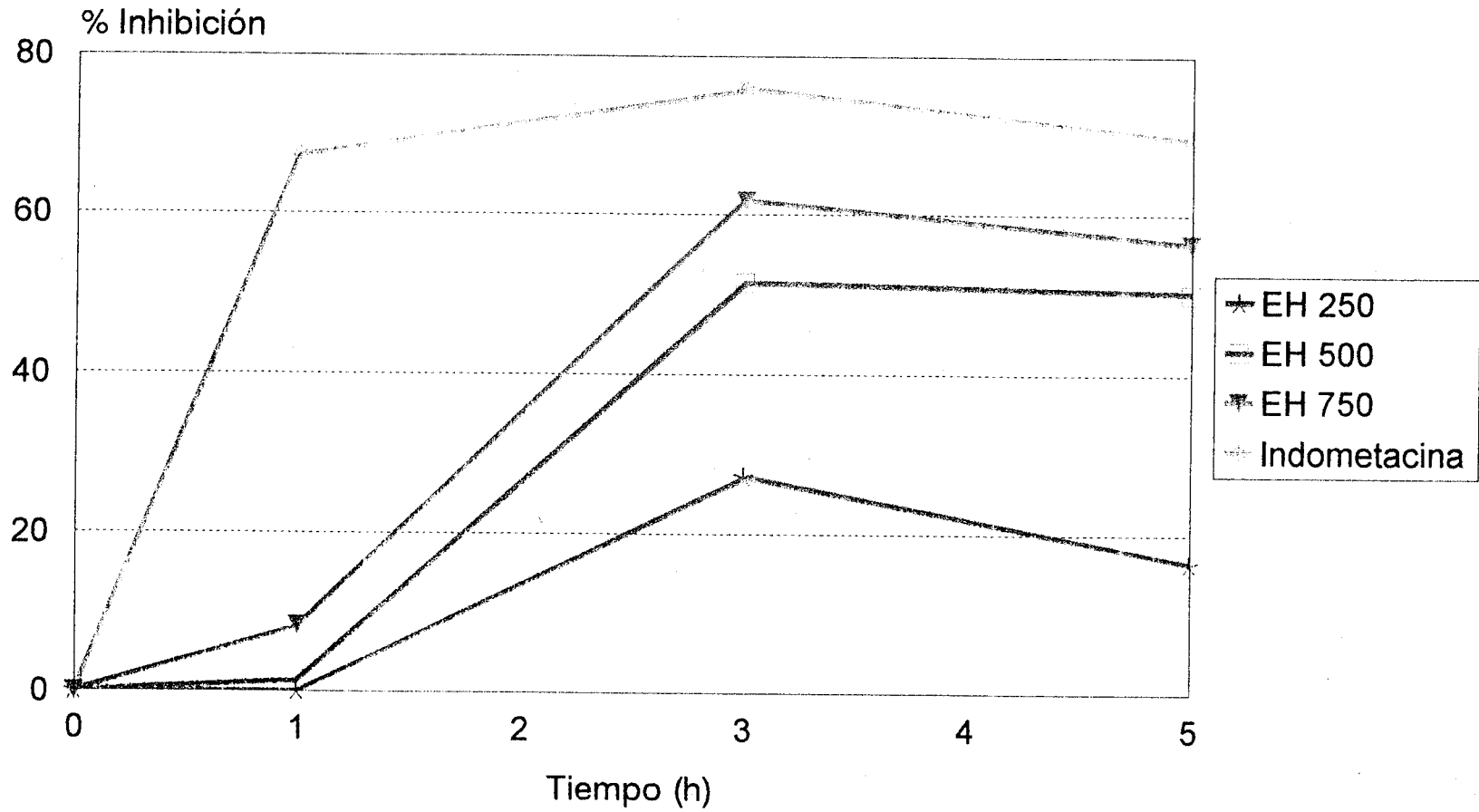


Fig 52.- Actividad antiinflamatoria del extracto hexanoico (EH) de *A. ageratum* a distintas dosis a lo largo del tiempo.

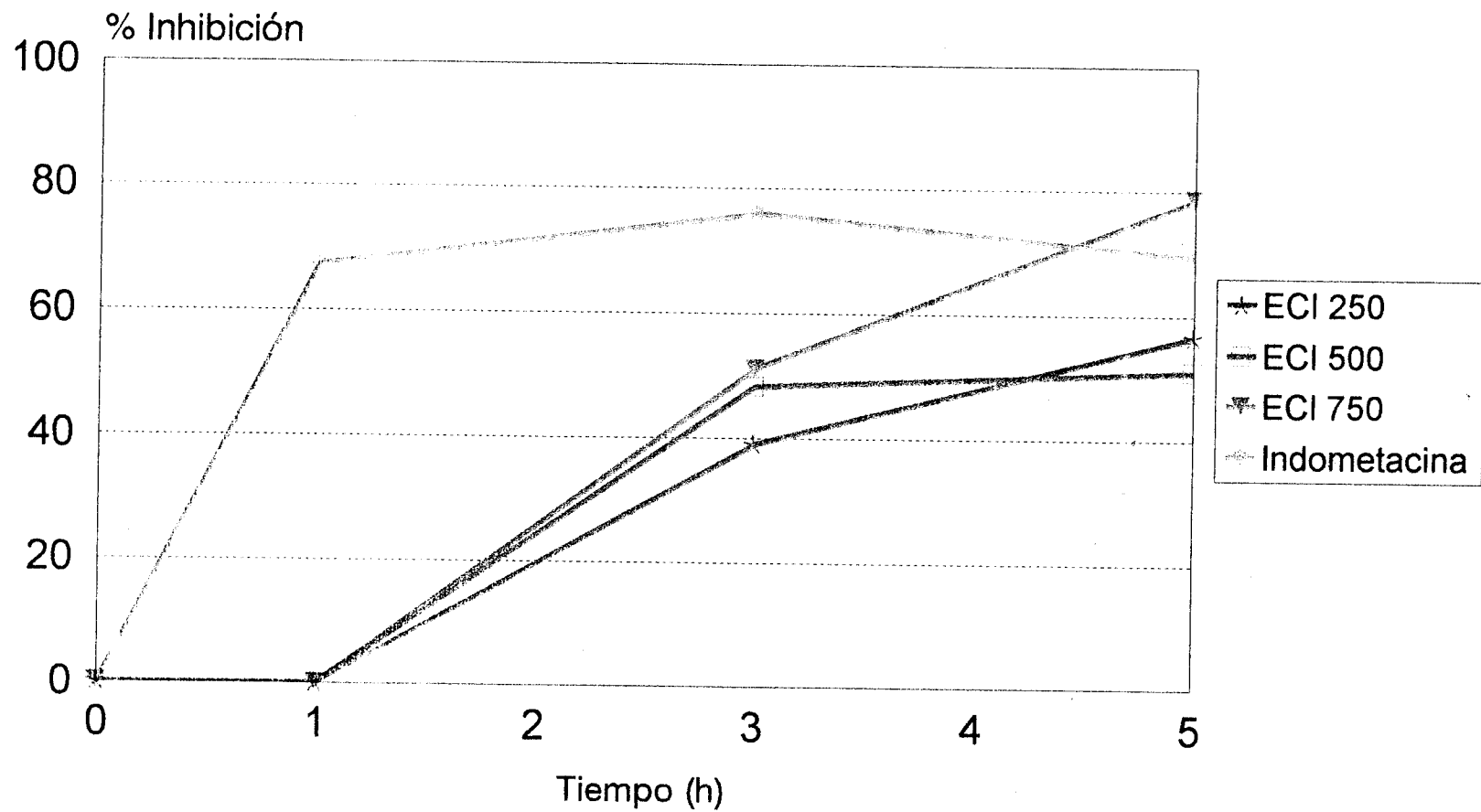


Fig 53.- Actividad antiinflamatoria del Extº Clorofómico (ECI) de A. ageratum a distintas dosis a lo largo del tiempo.

III.3.2.1.1.d.- Discusión de resultados

Los dos extractos ensayados, hexanoico y clorofórmico, muestran actividad antiinflamatoria, siendo mucho más acusada en el caso del extracto clorofórmico con la dosis más alta ensayada.

El extracto hexanoico se muestra más activo tres horas después del tratamiento, con una DE_{50} de $544,16 \pm 17,11$ mg r.s./ml. Sin embargo, en el caso del extracto clorofórmico el efecto máximo se produce a las 5 horas de tratamiento con una DE_{50} de $87,71 \pm 11,07$ mg r.s./ml.

Según estos resultados, el extracto hexanoico podría ejercer, en parte, su actividad sobre la 2ª fase de la inflamación aguda. Esta es inducida por la liberación de mediadores como prostaglandinas, proteasas, bradiquininas y enzimas lisosomales, con lo cual el mecanismo de acción pudiera estar relacionado con la inhibición de la liberación de algunos de estos mediadores.

Sin embargo, en el caso del extracto clorofórmico, al presentar una mayor actividad a la 5ª hora después del tratamiento, su mecanismo de acción podría estar relacionado con la migración leucocitaria, ya que los leucocitos liberan en el lugar de la inflamación prostaglandinas que colaboran con la permanencia del edema (Vinegar, R. Y col.; 1987).

III.3.2.1.2.- EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR ACETATO DE TETRADECANOIL FORBOL (TPA) Y ÁCIDO ARAQUIDÓNICO (AA)

(Payá, M. y col.; 1993).

El edema es un fenómeno característico de la reacción inflamatoria aguda, para su evaluación y estudio uno de los métodos más utilizados es el "test del edema auricular de ratón". Este modelo "in vivo" es de gran utilidad para valorar la actividad antiinflamatoria tópica, permite además evaluar el acumulo de neutrófilos que accede a la zona dañada, a partir de los homogenados de las orejas de ratón.

El test del edema auricular inducido por 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA) y ácido araquidónico (AA) permite valorar la actividad de inhibidores de las vías ciclooxigenasa (CO) y lipoxigenasa (LO) en un modelo "in vivo", ya que, inhibidores de la vía 5-LO son generalmente más efectivos frente al edema inducido por AA (Calixto, J.B. y col.; 1991) y aquellos que son inhibidores de la vía CO son más efectivos frente al inducido por TPA (Carlson, R.P. y col.; 1985).

El edema que se produce tras la aplicación de AA (Fig.-54) es debido a una rápida generación de PGE_2 y LTC_4/D_4 . Transcurridos 30 min., se produce una intensa migración de neutrófilos que alcanza el máximo a la hora, momento en el que el edema es máximo.

El TPA (Fig.-55) (Krauter, G. y col.; 1996), es un agente promotor aislado del aceite de Croton (*Croton tiglium*) (Hecker, E.; 1968) (Van Duren, B.L.; 1969), que induce la liberación de ácido araquidónico causando, el acumulo de PGE₂ y la aparición del edema (Hara, H. y col.; 1992) (Miyake, A. y col.; 1993).

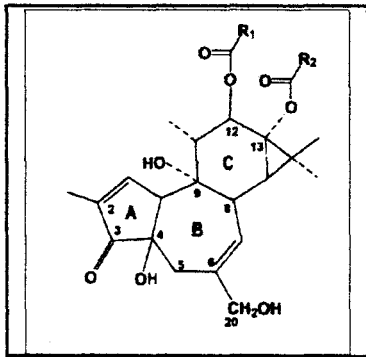
La estimulación de las células epidermiales con TPA o ionóforos de calcio produce una fosforilación y consecuentemente una disminución en la regulación del receptor, permitiendo algunas respuestas proliferativas a la respuesta del antígeno.

El TPA puede inhibir la frecuencia repetitiva de Ca²⁺ del tránsito de células separadas, esto puede ser explicado por la acción inhibitoria de la PKC en el sitio intracelular que se relaciona con este catión (Fig.-56).

Aunque suene paradójico, el papel del feed-back negativo puede extenderse a largo plazo en respuestas como la proliferación celular; ya que el receptor para el crecimiento epidermial (EGF) ha mostrado repetidamente estar fosforilado por PKC, tanto *in vivo* como *in vitro* (Nishizuca, Y.; 1988).



Fig 54.- Estructura del ácido araquidónico.



R₁: $-(CH_2)_{12}-CH_3$

R₂: CH_3

Fig 55.- Estructura de 12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato (Krauter, G.y col.; 1996).

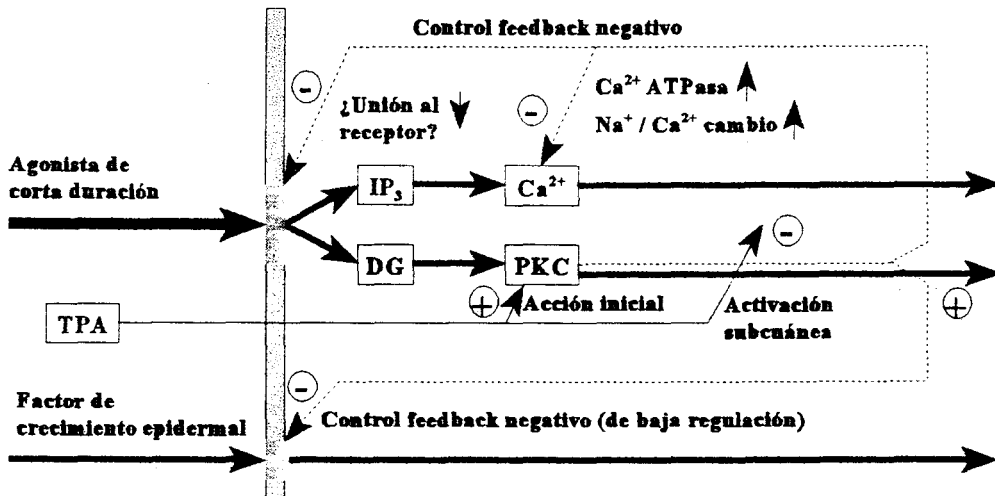


Fig 56.- Modelo de acción dual de PKC y de TPA (Nishizuca, Y.; 1988).

III.3.2.1.2.a. - Condiciones generales de la experiencia

Se han utilizado ratones de raza Swiss machos y hembras de aproximadamente 20-30 g de peso correctamente alimentados, los cuales fueron agrupados en lotes de seis.

La inflamación es provocada por la aplicación tópica de TPA (1 mg / 8ml acetona) o de AA (100 mg / ml acetona) ayudándonos con una micropipeta, depositando en cada caso 10 μ L del agente irritante en la superficie externa e interna de la oreja izquierda del ratón, de tal modo que la cantidad final sea de 2,5 μ g / oreja para el TPA y de 2,0 mg /oreja en el caso del AA.

La administración de las muestras a ensayar es diferente dependiendo del agente flogógeno. Se administra simultáneamente o inmediatamente después en el caso de que el irritante sea el TPA, o bien 30 minutos después en el caso de que la fuente de inflamación sea el AA.

Todas las muestras se disolvieron en acetona, por ser un disolvente de suficiente volatilidad e inerte farmacológicamente en relación al proceso inflamatorio

Transcurridos 4 horas de la aplicación de TPA (Payá, M. y col.; 1993) o 90 minutos de la del AA (Griswold, D.E. y col.; 1987), los animales son sacrificados por dislocación cervical y, con ayuda de un sacabocados, se corta una porción circular central de la oreja inflamada e idénticamente otra de la oreja no inflamada, que posteriormente pesaremos para

evaluar el edema producido.

III.2.1.2.b- Muestras y dosis ensayadas

El ensayo con TPA se ha realizado con:

- * Ext^o hexanoico de *Achillea ageratum* L. a las dosis de 1, 3 y 5 mg/ oreja.
- * Ext^o clorofórmico de *Achillea ageratum* L. a las dosis de 1, 3 y 5 mg/ oreja.
- * Estigmasterol a la dosis de 0,5 mg/oreja.
- * β -Sitosterol a la dosis de 0,5 mg/oreja.

En el ensayo con AA se ha utilizado:

- * Estigmasterol a la dosis de 0,5 mg/oreja.
- * β -Sitosterol a la dosis de 0,5 mg/oreja.

Las dosis han sido seleccionadas según Paya (Paya , M. y col.; 1993).

En ambos casos como patrón se ha seleccionado Indometacina a una dosis de 0,5 mg / oreja, y además en el caso del ensayo del AA se ha empleado también Dexametasona a una dosis de 0,05 mg / oreja, teniendo de esta forma tanto patrones inhibidores de la vía CO como de LO (Tadimeti, S.R. y col; 1993).

III.3.2.1.2.c. - **Resultados**

La actividad antiinflamatoria se determinó por gravimetría, calculando la diferencia de peso entre la oreja tratada y la no tratada, calculando así el porcentaje de inhibición con respecto al grupo control (Lanhers, M. C. y col.; 1992).

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(P_t - P_0) \text{ control} - (P_t - P_0) \text{ muestra}}{(P_t - P_0) \text{ control}} \times 100$$

P_0 = peso de la oreja no tratada con el agente flogógeno.

P_t = Peso de la oreja a las 4 h después de la aplicación de TPA o 1 h y 30 min. después de la administración de AA.

Las dosis efectivas 50 (DE_{50}) han sido calculadas mediante el análisis de Probit.

Los valores obtenidos en el estudio de la actividad antiinflamatoria tópica aguda inducida por TPA de los extractos hexanoico y clorofórmico se muestran en la tabla XIX, y los correspondientes a los principios activos en la tabla XX.

Las figuras 57, 58 y 59 corresponden a la representación gráfica de estos resultados.

Los valores correspondientes a la actividad antiinflamatoria tópica inducida por AA se presentan en la tabla XXI; y la figura 60 corresponde a una representación gráfica de los mismos.

	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición Edema	DE 50
Control	-	17,60 ± 0,56	-	
Indometacina	0,5	3,12 ± 0,48 ***	82,27	
Extº Hexanoico	1	10,66 ± 1,57 ***	39,43	3,06 ± 0,49
	3	9,10 ± 2,23 ***	51,7	
	5	7,40 ± 1,32 ***	57,95	
Extº Clorofórmico	1	8,70 ± 0,18 ***	50,56	0,93 ± 0,15
	3	5,91 ± 1,56 ***	66,42	
	5	3,08 ± 0,57 ***	82,5	

*** p < 0,001

Tabla XIX.- Actividad antiinflamatoria tónica aguda inducida por TPA de los extractos hexanoico y clorofórmico de A. ageratum.

	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición Edema
Control	-	17,60 ± 0,56	-
Indometacina	0,5	3,12 ± 0,48 ***	82,27
Estigmasterol	0,5	7,22 ± 1,37 **	58,97
β-Sitosterol	0,5	6,18 ± 0,37 ***	64,88

** p < 0,01 *** p < 0,001

Tabla XX.- Actividad antiinflamatoria tópica aguda inducida por TPA de los principios activos aislados de A. ageratum.

	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición
Control (AA)	2	15,31 ± 0,62	-
Dexametasona	0,05	9,41 ± 0,82 ***	38,01
Indometacina	0,5	14,68 ± 0,79 n.s.	4,41
Estigmasterol	0,5	9,88 ± 0,78 **	35,46
β-Sitosterol	0,5	11,00 ± 1,02 *	28,15

n.s. no significativo *p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tabla XXI.- Actividad antiinflamatoria tópica inducida por el ácido araquidónico de los compuestos aislados de A. ageratum.

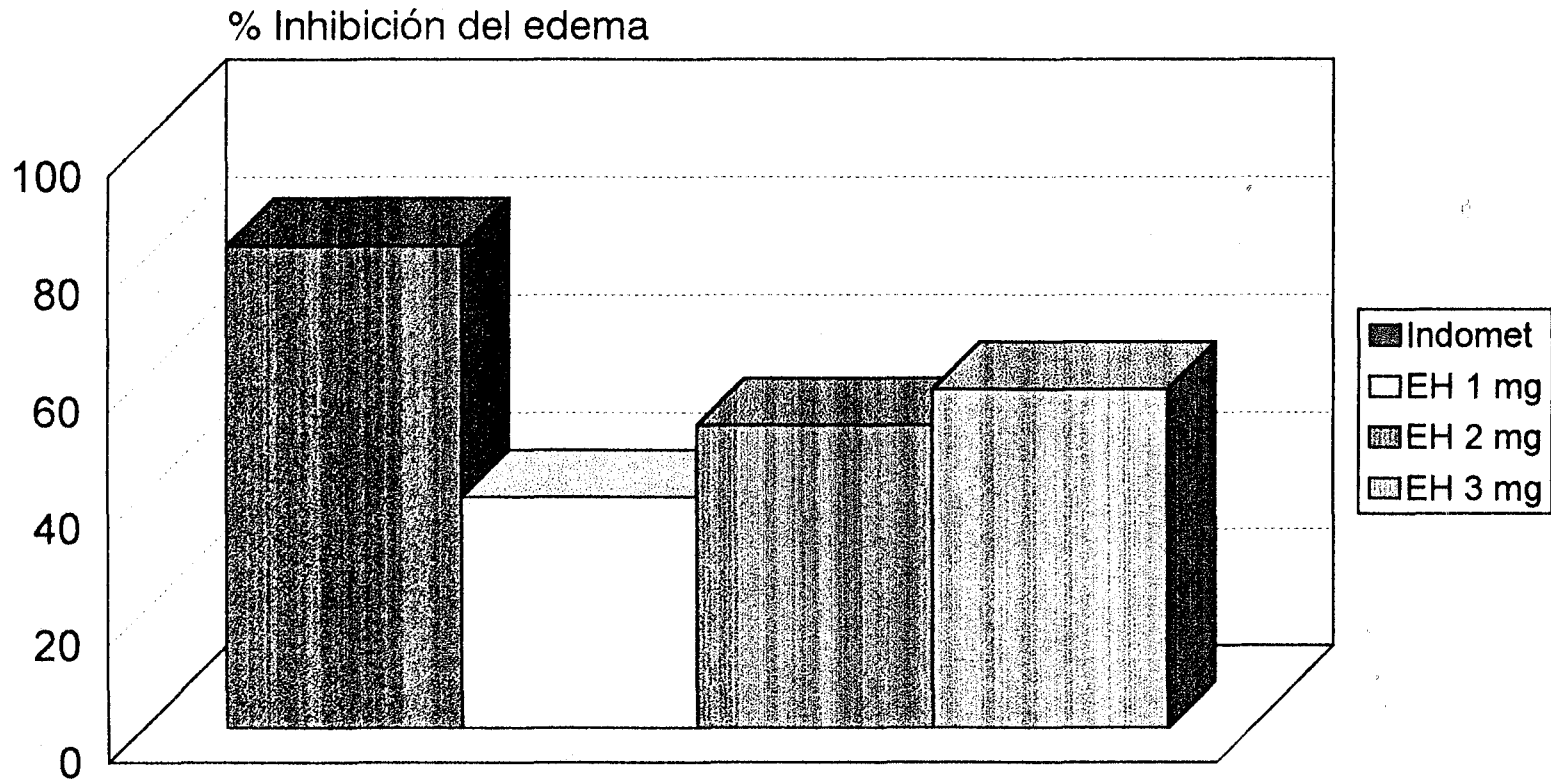


Fig 57.- Variación de la actividad antiinflamatoria tópica a distintas dosis inducida por TPA del Ext^o Hexanoico de A. ageratum.

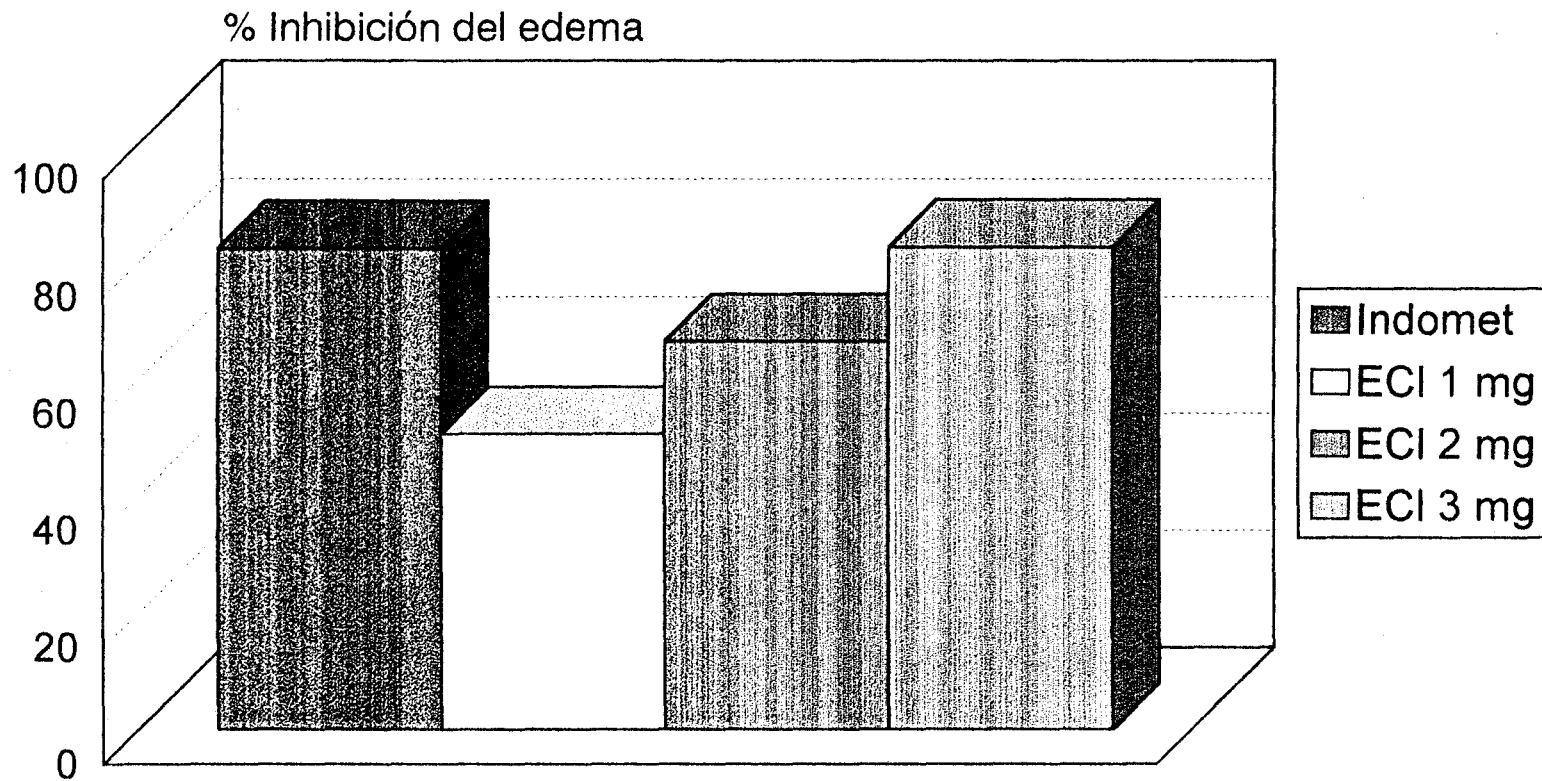


Fig 58.- Variación de la actividad antiinflamatoria tópica a distintas dosis inducida por TPA del Extº Clorofórmico (ECI) de A.ageratum.

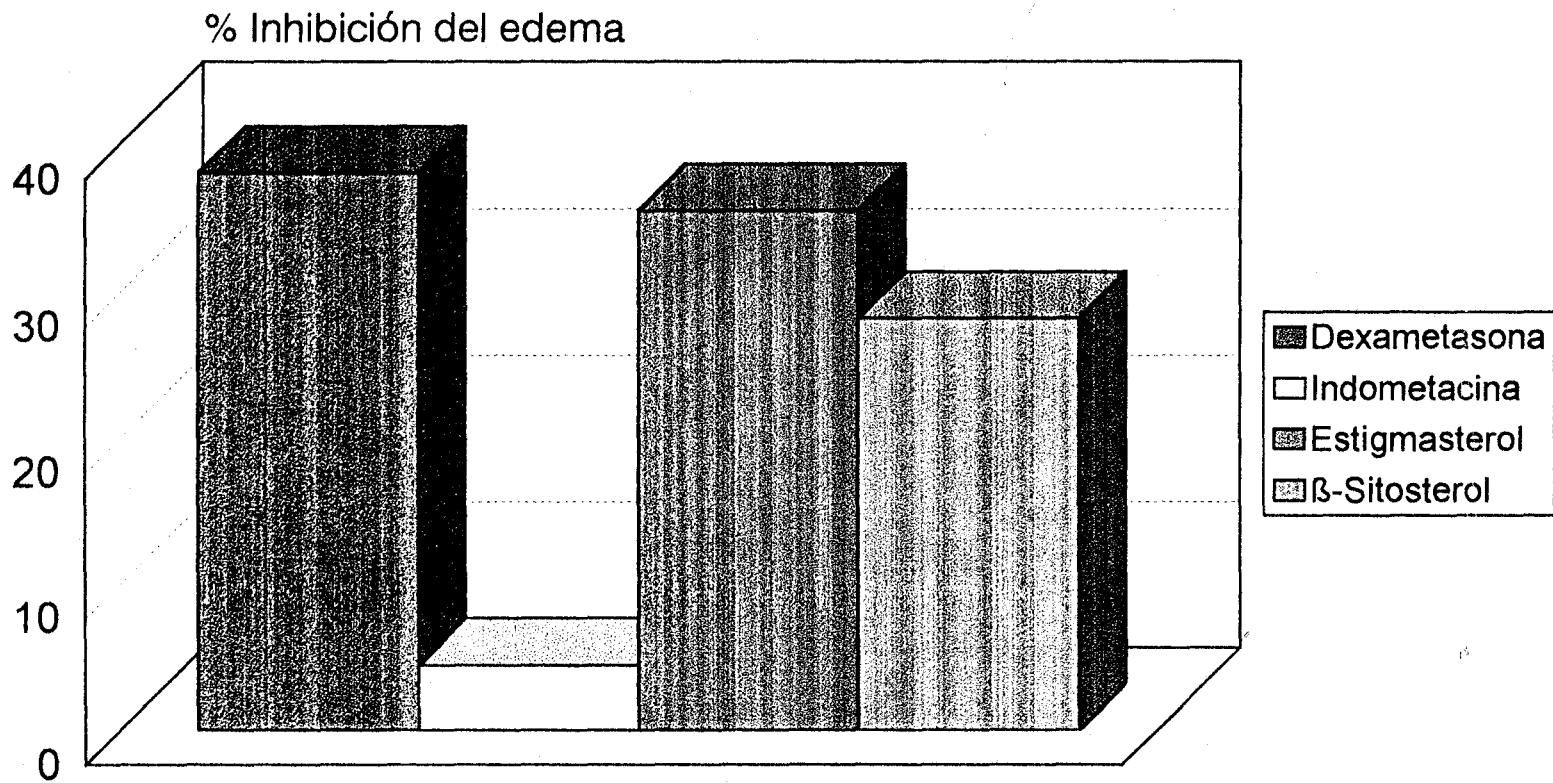


Fig 60.- Variación de la actividad antiinflamatoria tópica inducida por ácido araquidónico de los compuestos aislados de A. ageratum.

III.3.2.1.2.d. - Discusión de resultados.

La administración tópica de los extractos, tanto el hexanoico como el clorofórmico, presentan una elevada actividad antiinflamatoria, especialmente con el extracto clorofórmico, en el edema inducido con TPA, obteniéndose como resultado unas DE_{50} de $3,06 \pm 0,49$ $\mu\text{g}/\text{oreja}$ y de $0,93 \pm 0,15$ $\mu\text{g}/\text{oreja}$ respectivamente.

En el caso de los principios activos ensayados, se obtiene una respuesta antiedematogénica, tanto en el modelo del edema de oreja inducido por TPA como por el inducido por AA.

El primer modelo (TPA) depende principalmente de los niveles de PGE_2 , mientras que el edema inducido por AA está relacionado con prostaglandinas y leucotrienos. Pero además el acumulo de neutrófilos en la oreja de ratón y la liberación de mediadores de la permeabilidad vascular como histamina o bradicinina, pueden también jugar un papel importante en la respuesta inflamatoria por TPA o AA (Carlson, R.P. y col; 1985).

Con los resultados obtenidos en nuestros ensayos, no es posible poner de manifiesto con claridad si es la vía CO, o bien, la vía LO la que está implicada en el mecanismo de acción de los esteroides ensayados (Young, J.M. y col; 1984) (Chang, J. y col.; 1986) (Tadimeti, S.R y col.; 1993).

III.3.2.1.3.-*EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR MULTIPLES APLICACIONES DE TPA (INFLAMACIÓN TÓPICA CRÓNICA)* (Stanley, P.L. y col.; 1991)

Esta técnica utiliza también TPA como agente irritante aplicándolo repetidas veces durante varios días, lo que nos permite valorar la actividad antiinflamatoria sobre un modelo crónico de inflamación donde la vía de administración es también tópica (Stanley, P.L. y col.; 1991).

III.3.2.1.3.- **Condiciones generales de la experiencia**

Se han utilizado ratones de raza swiss machos y hembras de peso medio comprendido entre 20- 30 g, los cuales fueron agrupados en lotes de seis animales.

De acuerdo con la modificación del método de Stanley (Stanley, P.L. y col.; 1991), se aplicó tópicamente 10 μ L de TPA (2,5 μ g/oreja) en cada una de las caras de la oreja derecha del ratón con ayuda de una micropipeta en días alternos los días 0, 2, 4, 7 y 9 a las 10:00 horas.

Los compuestos testados se disolvieron en acetona y fueron aplicados tópicamente (0,5 mg/oreja), dos veces al día, durante cuatro días consecutivos; los días 7,8 y 9 a las 10:00 h (inmediatamente después de la aplicación de TPA) y a las 16:00 h (6 h después de la aplicación de TPA) y tan sólo una vez a las 10:00 h el día 10) (Tabla XXII).

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical el día 10 a las 16:00 h después de la última aplicación del compuesto testado.

Con la ayuda de un sacabocados se corta una porción circular central (6mm) de la oreja inflamada y de la no inflamada , que posteriormente pesaremos para evaluar el edema producido.

III.3.2.1.b.- Muestras y dosis ensayadas

- Extracto hexanoico a una dosis de 5 mg/oreja.
- Extracto clorofórmico a una dosis de 5 mg/oreja.
- Estigmasterol a una dosis de 0,5 mg/oreja.
- β -Sitosterol a una dosis de 0,5 mg/oreja.

Como patrón de referencia se utilizó Dexametasona (0,05 mg/oreja) disuelta en el mismo vehículo de los compuestos testados (acetona).

III.3.2.1.c.- Resultados

La actividad antiinflamatoria se determinó por gravimetría midiendo la diferencia de peso entre la oreja tratada y la no tratada, calculando así el porcentaje de inhibición con respecto al grupo control.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(P_1 - P_0) \text{ control} - (P_1 - P_0) \text{ muestra}}{(P_1 - P_0) \text{ control}} \times 100$$

P_0 = peso de la oreja no tratada con el agente flogógeno (TPA).

P_1 = Peso de la oreja después de múltiples aplicaciones con el agente flogógeno (TPA).

Los resultados obtenidos con los extractos hexanoico y clorofórmico, así como los principios activos aislados se muestran en la tabla XXIII y XXIV respectivamente.

Una representación gráfica de los mismos se presenta en la figura 61 y 62.

	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición Edema
Control	-	22,50 ± 1,95	-
Dexametasona	0,05	9,75 ± 0,86 ***	56,66
Extº Hexanoico	5	19,56 ± 0,799 *	13,06
Extº Clorofómico	5	16,58 ± 0,98 ***	26,31

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tabla XXIII.- Actividad antiinflamatoria tópica crónica inducida por la aplicación múltiple de TPA de los extractos hexanoico y clorofómico de A. ageratum.

	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición Edema
Control	-	22,50 ± 1,950	-
Dexametasona	0,05	9,75 ± 0,860 ***	56,66
Estigmasterol	0,5	13,37 ± 0,907 ***	40,57
β-Sitosterol	0,5	14,30 ± 0,66 ***	36,44

p<0,01 *p<0,001

Tabla XXIV.- Actividad antiinflamatoria tópica crónica inducida por la aplicación múltiple de TPA de los principios aislados de A. ageratum.

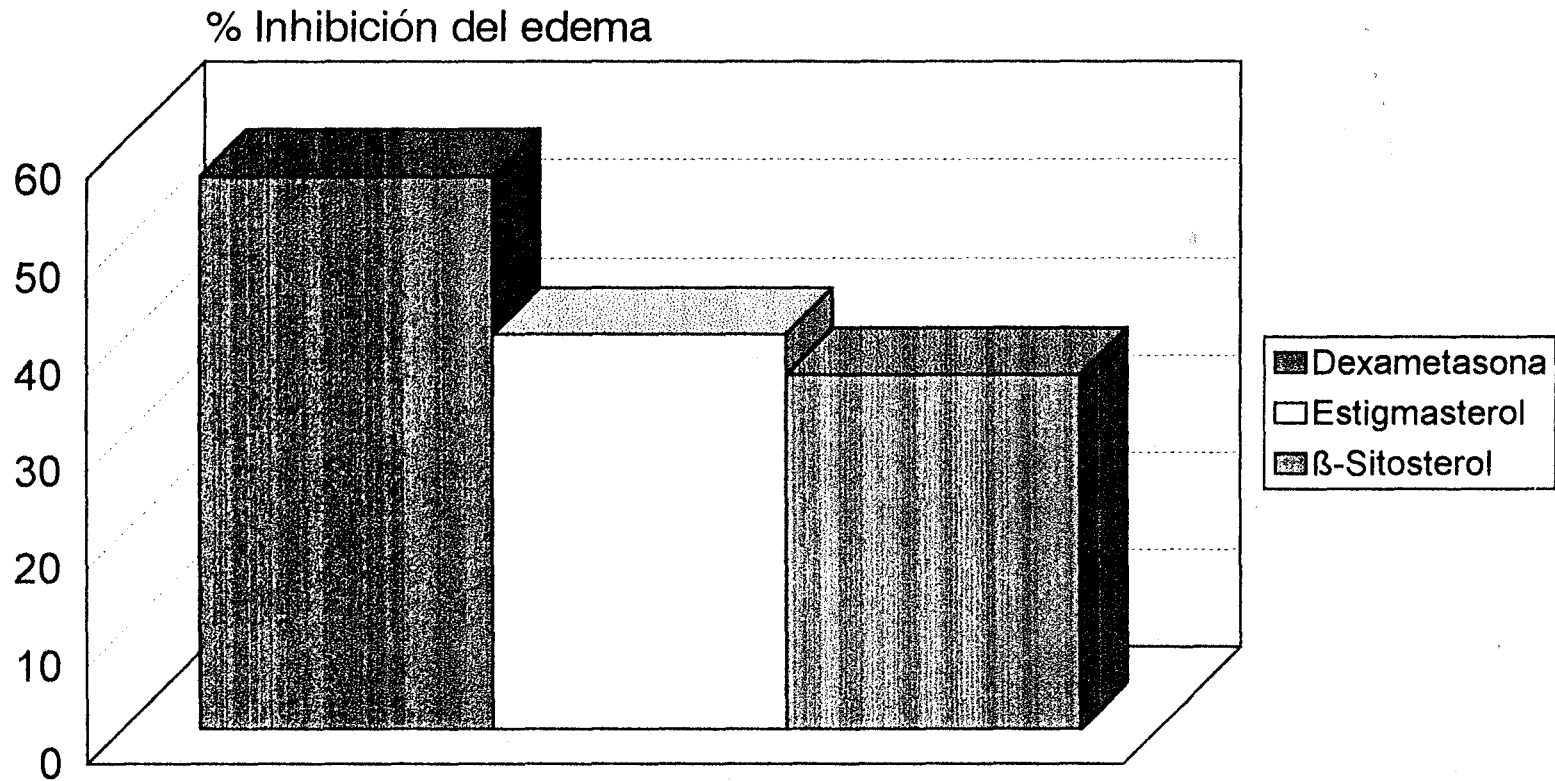


Fig 62.- Variación de la actividad antiinflamatoria tópica inducida por la aplicación múltiple de TPA de los compuestos aislados de A. ageratum.

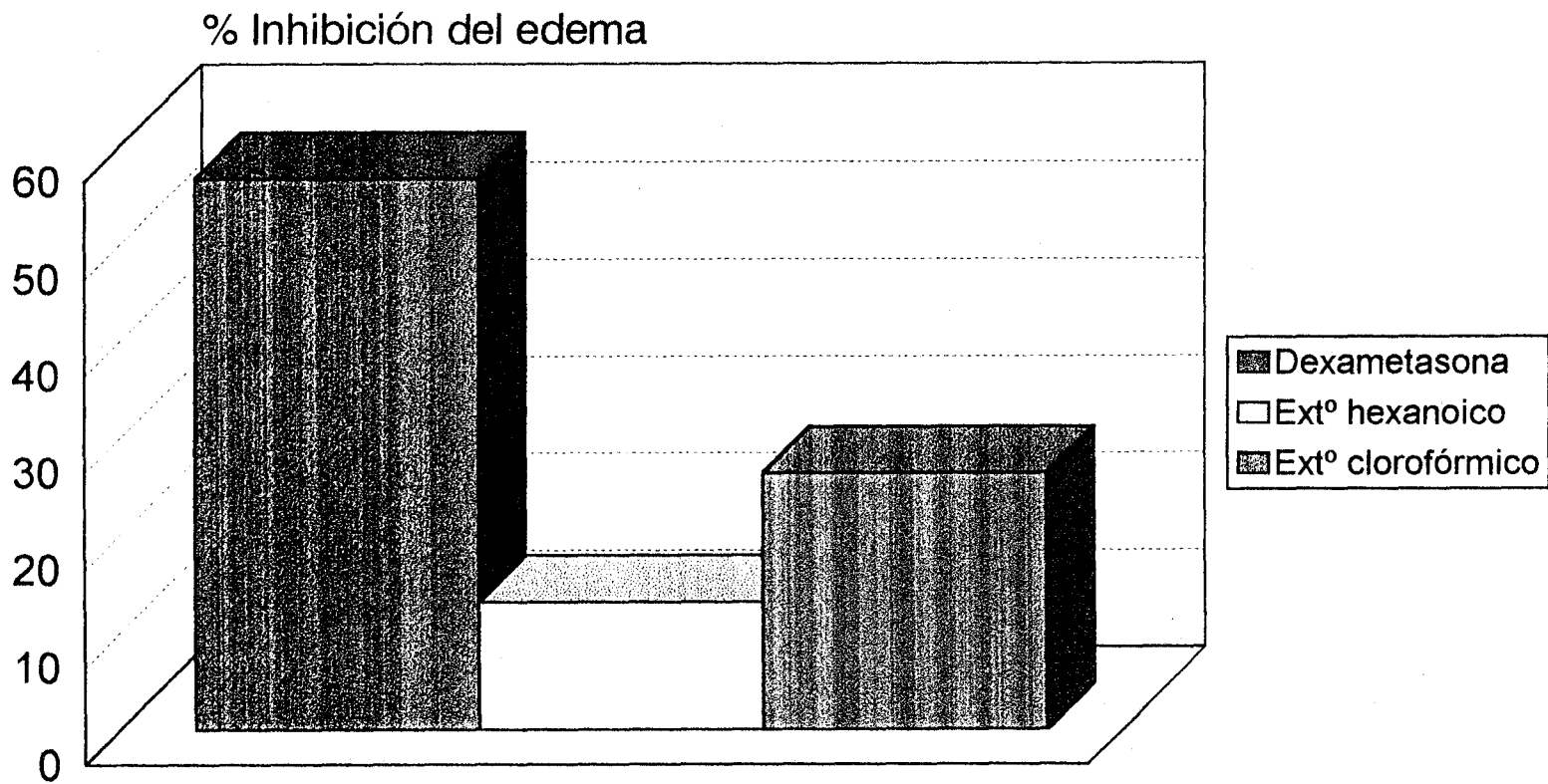


Fig 61.- Variación de la actividad antiinflamatoria tópica inducida por la aplicación múltiple de TPA de los extractos hexanoico y clorofórmico.

III.3.2.1.d.- **Discusión de resultados**

Los resultados obtenidos en los extractos ensayados nos muestran una leve actividad antiinflamatoria tónica crónica, siendo algo más elevada en el caso del extracto clorofórmico.

Por el contrario, los principios activos testados muestran una moderada actividad antiedematogénica, llegando a unos valores de inhibición de un 40,57 % en el caso del Estigmasterol y un 36,44 % con el β -Sitosterol.

En este sentido, estos compuestos testados parecen ser activos en la antagonización de la fase crónica de la inflamación, en la cual la secreción de enzimas hidrolíticas y la activación de las células mononucleares fagocíticas son las protagonistas de la degeneración del tejido. En esta fase TPA aumenta la actividad de la ornitina-decarboxilasa y 8-lipoxigenasa e induce la transcripción del gen IL-1 β (Recio, M.C. y col.; 1995).

III.3.2.1.4.- *EDEMA AURICULAR INDUCIDO POR ETILFENIL PROPIOLATO (EPP)* (Toneli, G. y col.; 1965).

Una vez puesto de manifiesto la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados, para tratar de elucidar su posible mecanismo de acción hemos establecido unas condiciones experimentales en las que hemos usado EPP como agente irritante, para la inducción del edema auricular; ya que la inflamación causada por este agente flogógeno es solamente inhibida por compuestos tipo corticoides (Dexametasona) y no por agentes antiinflamatorios no-esteroides (Brattsand, M. y col.; 1982).

Etil fenil propiolato causa respuestas morfológicas y bioquímicamente similares a las inducidas por TPA, siendo acciones aparentemente mediadas por un mecanismo que no implica una interacción directa con la proteína quinasa C (PKC), como ocurre con TPA (Nishizuka, Y.; 1988).

III.3.2.1.4.- Condiciones generales de la experiencia

Se han utilizado ratones de la raza Swiss, machos y hembras de aproximadamente 20-30 g de peso, correctamente alimentados, los cuales fueron agrupados en lotes de seis animales.

La inflamación es provocada por la aplicación tópica de EPP (50 mg/ ml de acetona), depositando con la ayuda de una micropipeta, 10 μ L del agente flogógeno en la

superficie externa y en la interna de la oreja izquierda del ratón, de tal forma que la cantidad final de EPP sea de 1 mg/oreja; mientras que a la oreja derecha tan sólo se le aplica el vehículo (acetona).

Las muestras a ensayar se administran 16 horas antes de la inducción del edema auricular. Transcurrida 1 hora tras la administración tópica de EPP, los animales son sacrificados por dislocación cervical y con ayuda de un sacabocados se corta una porción circular central de la oreja inflamada e idénticamente igual de la oreja no inflamada, que posteriormente pesamos para evaluar el edema producido.

III.3.2.1.4.- **Muestras y dosis ensayadas**

* Estigmasterol a la dosis de 0,5 mg/oreja.

* β -Sitosterol a la dosis de 0,5 mg/oreja.

Como patrón se utilizó Dexametasona, a una dosis de 0,05 mg/ oreja.

III.3.2.1.4.- **Resultados**

La actividad antiinflamatoria se determinó por gravimetría, midiendo la diferencia de peso entre la oreja tratada y la no tratada, calculando así el porcentaje de inhibición con respecto al grupo control.

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(P_1 - P_0) \text{ control} - (P_1 - P_0) \text{ muestra}}{(P_1 - P_0) \text{ control}} \times 100$$

P_0 = Peso de la oreja no tratada con el agente flogógeno.

P_1 = Peso de la oreja a la hora después de la administración del agente flogógeno (EPP).

Los resultados se muestran en la tabla XXV, y una representación gráfica de los mismos en la figura 63.

	Dosis (mg/oreja)	Edema (mg)	% Inhibición Edema
Control	-	5,97 ± 0,70	-
Dexametasona	0,05	2,07 ± 0,43 ***	65,26
Estigmasterol	0,5	3,60 ± 0,44 **	39,69
β-Sitosterol	0,5	3,51 ± 0,57 *	41,37

* p<0,05 **p<0,01 ***p<0,001

Tabla XXV.- Actividad antiinflamatoria tópica inducida por EPP de los compuestos aislados de A. ageratum.

III.3.2.1.4.- **Discusión de resultados**

Los compuestos ensayados β -Sitosterol y Estigmasterol, producen una importante reducción del edema tóxico inducido por Etil Fenil Propiolato, siendo los valores obtenidos de 39,69 % y 41,37 % respectivamente.

Debido a que la inflamación producida por EPP es tan solo inhibida por compuestos tipo corticoide y no por antiinflamatorio no esteroideos (Braltsand, M. y col.; 1982), parece ser que el mecanismo de acción de los principios ensayados podría ser similar al que presentan estos compuestos.

III.3.2.1.5.- *BLOQUEO PRODUCIDO POR ANTIGLUCOCORTICOIDES SOBRE LA ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA.* (Tsurufuji, S. y col.; 1979)

Para profundizar en el estudio del mecanismo de acción antiinflamatoria, hemos realizado esta técnica, en la que se provoca un aumento de la permeabilidad vascular por administración de serotonina, provocando con anterioridad un bloqueo de los receptores glucocorticoides con Progesterona, una inhibición de ARNm con Actinomicina D e una inhibición de la síntesis de proteínas con Cicloheximida; ya que los compuestos a ensayar son de naturaleza esteroídica y podrían tener un mecanismo de acción similar.

La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides se debe en parte , a su efecto inhibitorio sobre la producción de prostaglandinas. Esto ha sido demostrado en diferentes tejidos y cultivos celulares (Kantrowitz, F. y col.; 1975) (Tashjian, A.H. y col.; 1975) (Floman, Y. y Zor, U.; 1976) (Blackwell, G.F. y col.; 1978) (Tam, S. y col.; 1997). Igualmente se ha puesto de manifiesto que la inhibición de ARNm, por Actinomicina D y la síntesis de proteínas por Cicloheximida interfieren el efecto inhibitorio de producción de prostaglandinas por agentes esteroídicos.

Con la siguiente técnica se pretende estudiar la acción antiexudativa de los principios aislados, sobre el edema de pata de ratón inducido con serotonina:

Para ello nos basamos en:

a) La utilización de inhibidores competitivos de los receptores glucocorticoides con progesterona (Fig 64).

b) La inhibición de ARNm con Actinomicina D y de síntesis de proteínas con Cicloheximida (Fig 65).

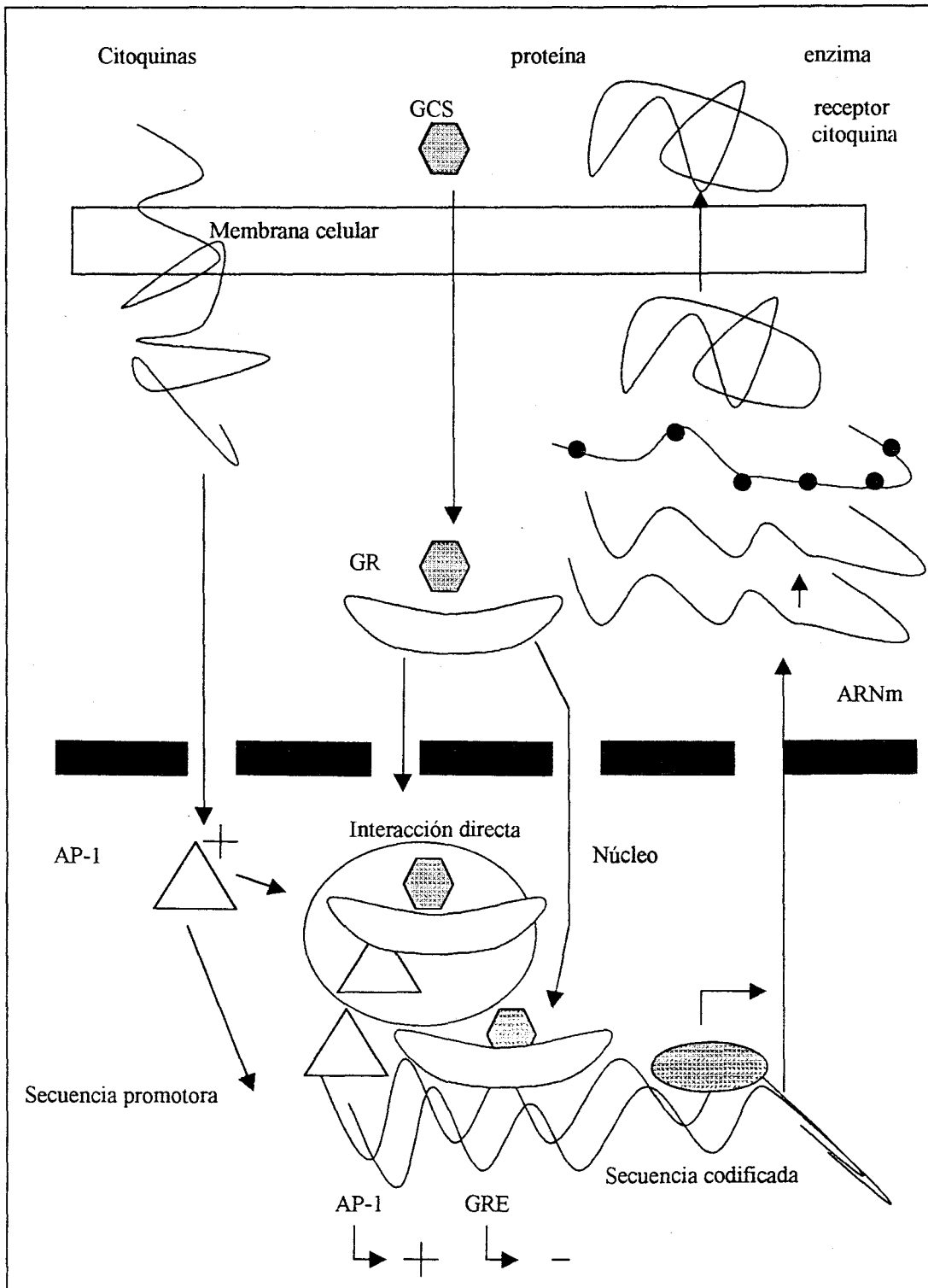


Fig 64.- Interacción directa entre el factor de transcripción AP-1 y el receptor glucocorticoide (GR).

III.3.2.1.5.a.- Condiciones generales de la experiencia:

Se han utilizado ratones de raza swiss machos y hembras de aproximadamente 20-30 g de peso, alimentados correctamente, los cuales fueron agrupados en lotes de seis.

La inflamación fue inducida por la inyección subplantar de 0,05 mL de una solución al 1 % de serotonina en SSF (0,9 %, pH= 7,4) en la pata izquierda, 3 horas después del tratamiento con los productos a ensayar.

Progesterona (100 mg/Kg animal), disuelta en aceite de oliva, fue administrada subcutáneamente en el area dorsal 1 h antes del tratamiento con los productos a ensayar.

La administración de Actinomicina D (2mg/Kg animal) y Cicloheximida (6 mg/kg animal) disueltos en SSF (0,9 %, pH = 7,4) se realizó simultáneamente con los compuestos testados, y una hora y media después, con el fin de mantener su efecto subcutáneamente en el area dorsal.

Los compuestos a ensayar, disueltos en aceite de oliva, fueron inyectados subcutáneamente en el área dorsal contraria a donde se inyectó la progesterona, actinomicina D o cicloheximida, según cada caso.

III.3.2.1.5.b.- Muestras y dosis a ensayar

- Estigmasterol con una dosis de 50 mg/Kg animal.
- β -Sitosterol con una dosis de 50 mg/Kg animal.

Como patrón se utilizó la Dexametasona (0,5 mg/kg animal) diluida en EtOH/0,9 % Solución Salina Fisiológica (SSF) (1:19 v/v).

III.3.2.1.5.c.- Resultados

El porcentaje de inhibición del edema para cada grupo se determina por la expresión:

(Lanhers, M.C. y col.; 1992)

$$\% \text{ Inhibición} = \frac{(V_t - V_0) \text{ control} - (V_t - V_0) \text{ muestra}}{(V_t - V_0) \text{ control}} \times 100$$

V_0 = Volumen antes del tratamiento con serotonina.

V_t = Volumen de la pata a los 12 minutos después de la administración de serotonina.

En las tablas XXVI, XXVII y XXVIII se presentan los resultados obtenidos y en las figuras 66, 67 y 68.

La significación estadística se ha realizado mediante la "t" de Student.

	Edema (ml x10 ⁻²)	% Inhibición
Control	4,60 ± 0,41	—
Dexametasona	1,00 ± 0,46 ***	78,26
Estigmasterol	2,40 ± 0,49 *	47,82
β-Sitosterol	2,33 ± 0,49 ***	49,33
Control + Progesterona	3,63 ± 0,61	—
Dexametasona + Progesterona	3,34 ± 0,42 ###	8,33
Estigmasterol + Progesterona	9,60 ± 0,66 #	0
β-Sitosterol + Progesterona	5,61 ± 0,32 ##	0

***###p<0,001 **##p<0,01 *#p<0,05 (* con respecto al control, # con respecto al control más progesterona)

Tabla XXVI.- Efecto de Progesterona en la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de A. ageratum.

	Edema (ml x10 ⁻²)	% Inhibición
Control	4,60 ± 0,41	—
Dexametasona	1,00 ± 0,46 ***	78,26
Estigmasterol	2,40 ± 0,49 *	47,82
β-Sitosterol	2,33 ± 0,49 ***	49,33
Control + Cicloheximida	2,40 ± 0,59	—
Dexametasona + Cicloheximida	2,00 ± 0,32 ###	16,66
Estigmasterol + Cicloheximida	9,20 ± 1,21 #	0
β-Sitosterol + Cicloheximida	7,00 ± 0,43 ##	0

***###p<0,001 **##p<0,01 *#p<0,05 (* con respecto al control, # con respecto al control más Cicloheximida)

Tabla XXVIII.- Efecto de Cicloheximida en la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de A. ageratum

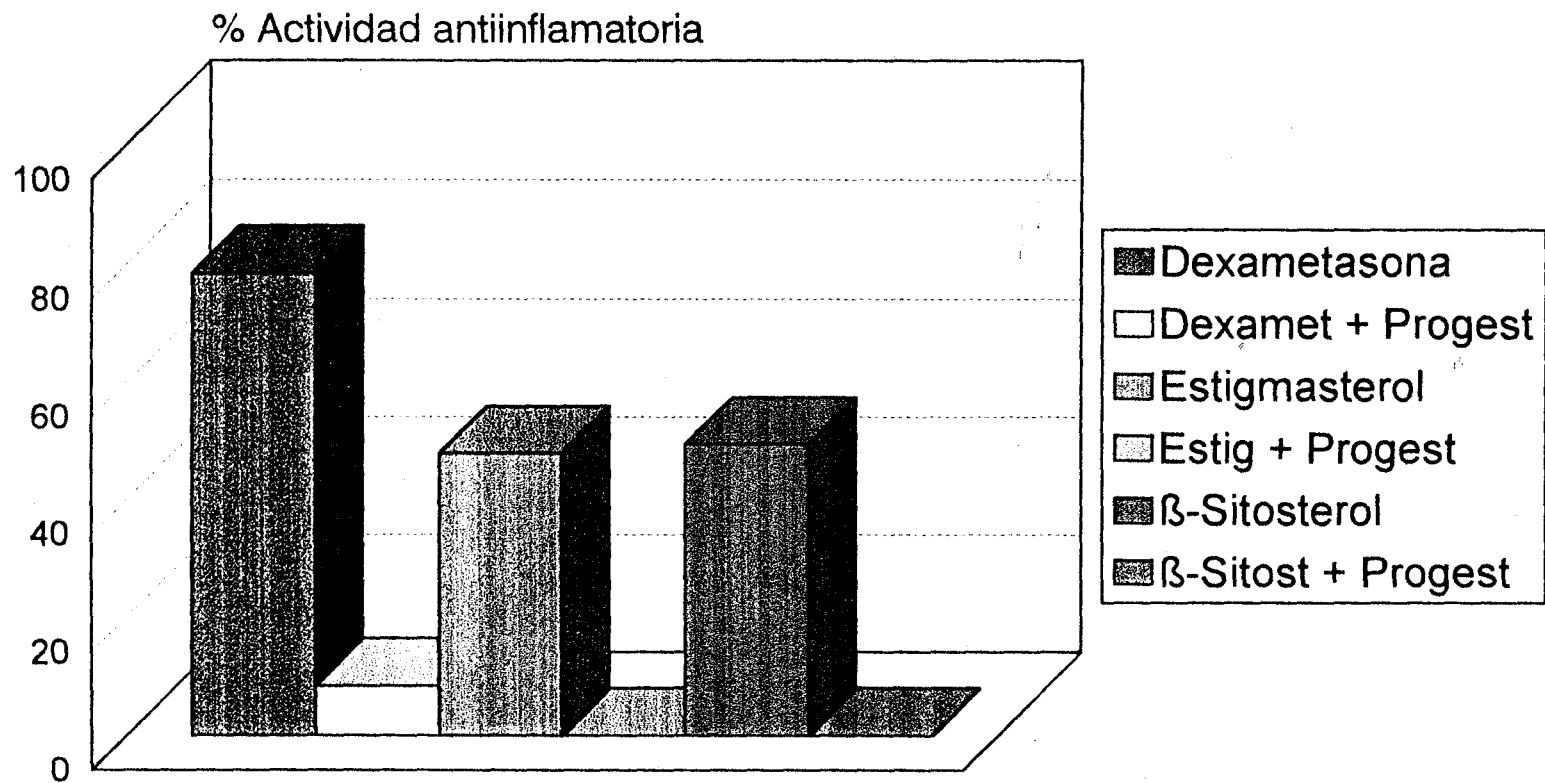


Fig 66- Efecto de Progesterona en la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de A. ageraum.

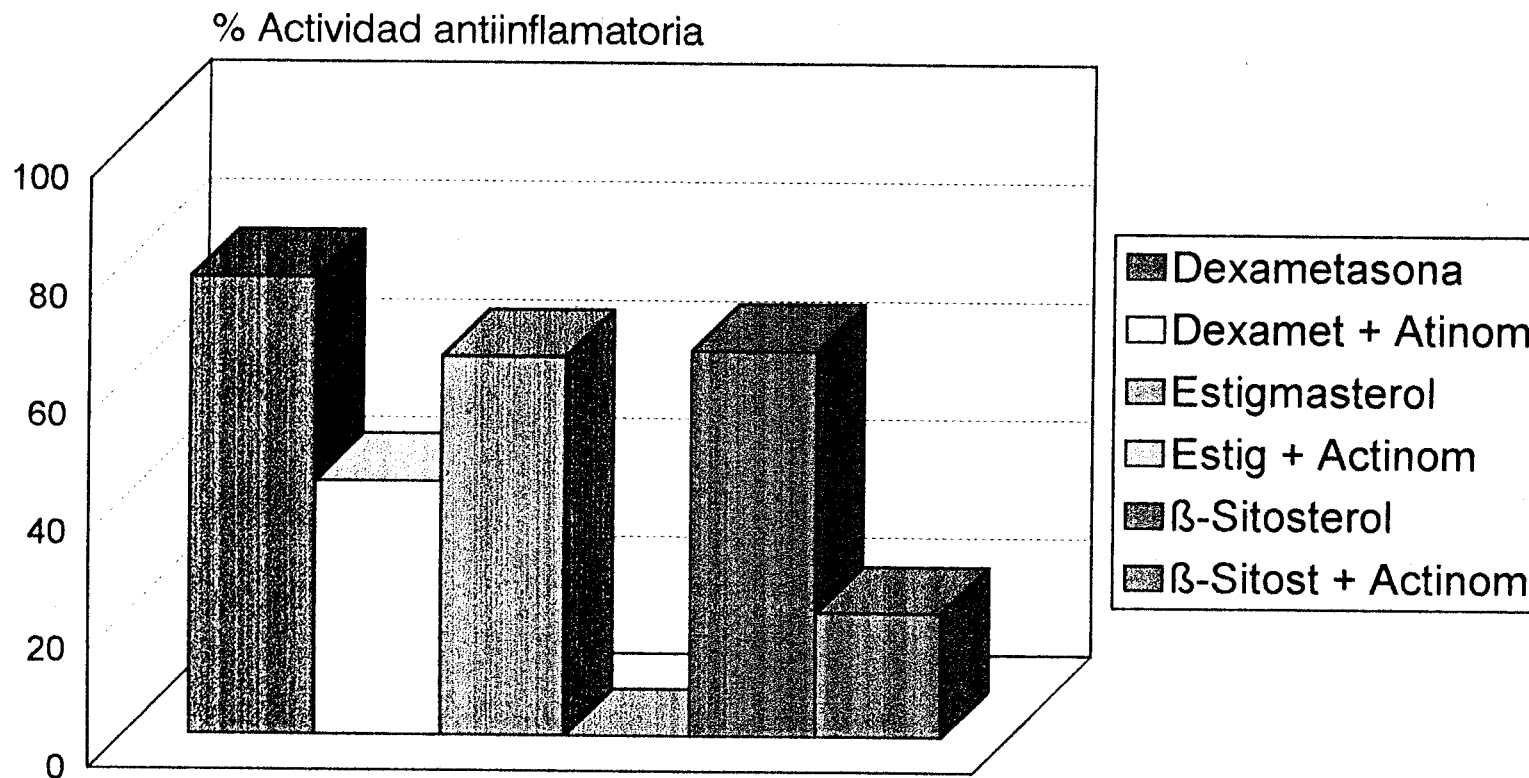


Fig 67.- Efecto de la Actinomicina D en la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de A. ageratum

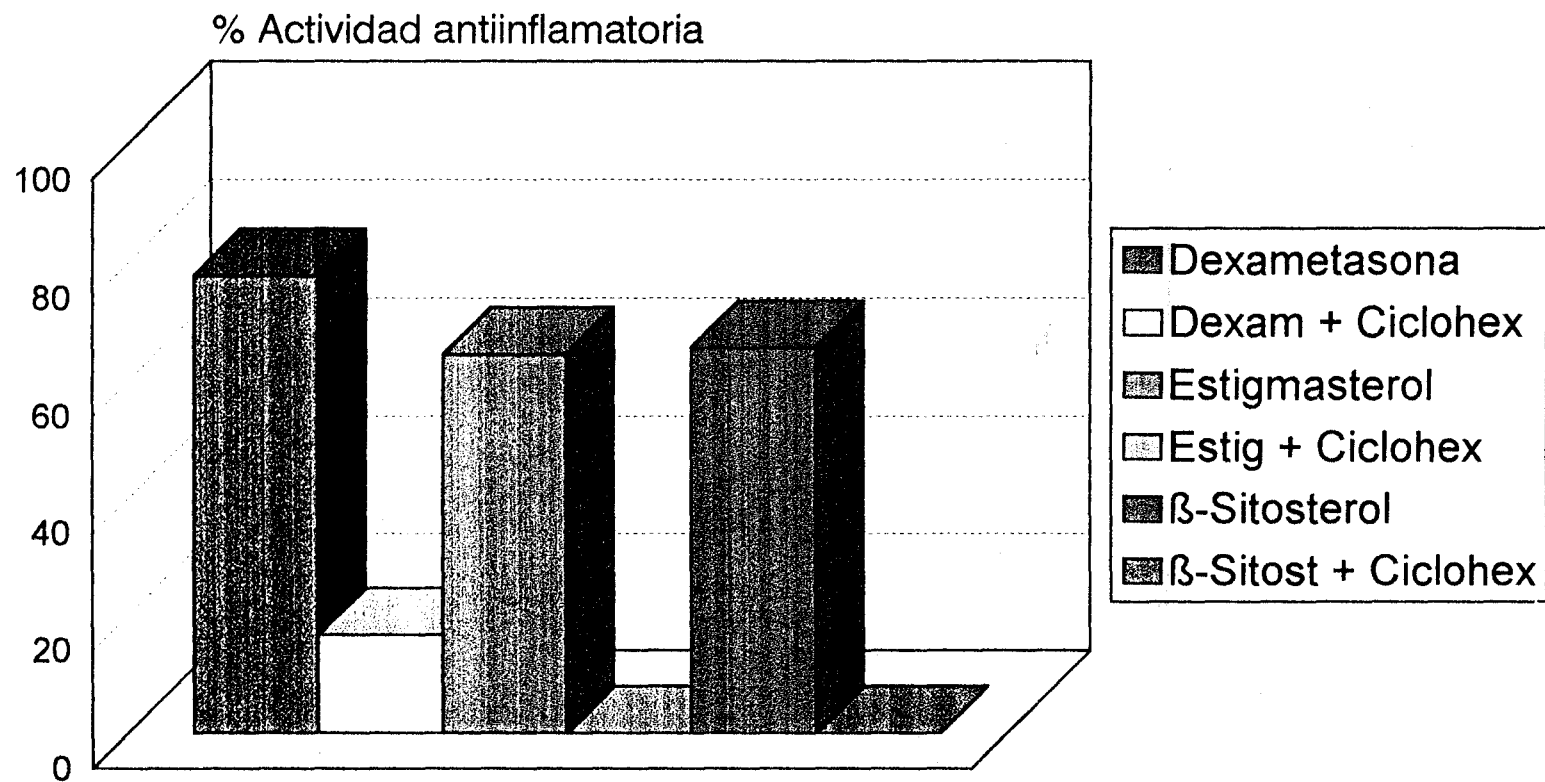


Fig 68.- Efecto de la Cicloheximida en la actividad antiinflamatoria de los compuestos aislados de A. ageratum.

III.3.2.1.5.d.- Discusión de resultados.

Estigmasterol y β -Sitosterol producen una significativa inhibición del edema determinándose unos valores de 47,82 % y 49,33 %, respectivamente.

Al administrar estos compuestos junto con Progesterona desaparece el efecto antiinflamatorio de ambos, comportándose de un modo similar al patrón utilizado (Dexametasona) (Fig 66), pudiendo deducir por tanto que parte del efecto producido es debido a que actúan sobre los receptores glucocorticoides (Rousseau, G.G. y col.; 1972).

Igualmente cuando son administrados conjuntamente con Actinomicina D y Cicloheximida (Fig 67 y 68) se produce un cambio significativo en la respuesta inflamatoria, por lo que podemos deducir la relación de la actividad antiinflamatoria de estos compuestos en la transcripción de ARNm y síntesis de proteínas nos indica que esta acción está mediada igualmente, en parte, por nuevos ARNm y nueva síntesis de proteínas; procesos que interfieren en el efecto inhibitorio de la producción de prostaglandinas (Giri, S.N. y col.; 1975) (Tsurufujisi, S. y col.; 1977) (Floman, Y. y Zor, U.; 1976).

III.3.2.2 .- METODOS DE ESTUDIO "IN VITRO"

III.3.2.2.2.- *ACTIVIDAD DE LA ENZIMA MIELOPEROXIDASA (MPO)* (Suzuki, K. y col.; 1983) (De Young, L. M. y col.; 1989)

El edema de oreja inducido por TPA, además de ser un método muy utilizado en la medida de la actividad antiinflamatoria, es un modelo válido para la elucidación del mecanismo de acción de dicha actividad farmacológica. En este sentido, la medida de infiltración celular puede ser un indicador relevante de la destrucción celular en el tejido dérmico (Bradley, P.P. y col.; 1982).

La mieloperoxidasa (MPO), enzima característica de PMNs (azurófilos), constituye entre un 2 y un 5 % del peso en seco del neutrófilo y su función primordial es utilizar el peróxido de hidrógeno, generado tras la activación del neutrófilo, para oxidar los iones cloruros presentes en el medio y dar lugar a compuestos poderosamente oxidantes que han sido identificados como ácido hipocloroso y que es el responsable de la acción bactericida atribuida a la MPO.(Fig 69)

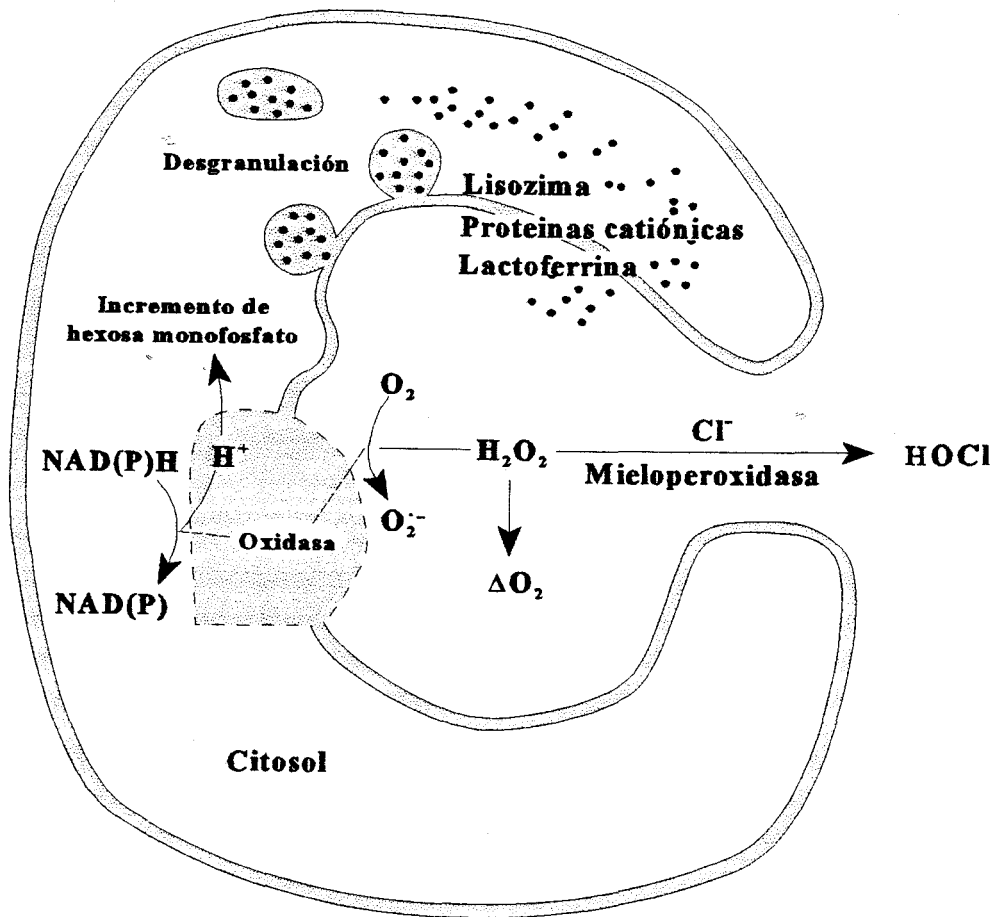


Fig 69.- Neutr3falo activado (Rice-Evans, C.A. y col.; 1991)

Durante el proceso fagocitario el anión superóxido es también liberado al exterior junto con otros agentes oxidantes, lo que ayuda a atacar dianas extracelulares tales como, células cancerígenas opsonizadas, microorganismos y parásitos; pero al mismo tiempo puede dañar tejidos próximos. Normalmente existen mecanismos homeostáticos que limitan el daño tisular más próximo al lugar de la inflamación sin difundir a lugares más lejanos.

La liberación de enzimas es un proceso complejo en el que intervienen segundos mensajeros como el calcio y los nucleótidos, complejos enzimáticos como la proteinquinasa C (PKC) y estructuras celulares como el citoesqueleto (O'Flaherty, J.T. y col.; 1991).

III.3.2.2.2.a. - Condiciones generales de la experiencia.

Este método de determinación enzimática está basado en la oxidación dependiente de H_2O_2 de un donador de electrones artificial.

Para el estudio de la actividad Mieloperoxidasa (MPO) hemos utilizado una modificación del método descrito por Suzuki (Suzuki, K. y col.; 1983), similar al descrito por De Young y col. (1989). En dicha técnica las secciones de 6 mm de tejido de oreja se homogenizan con 1,5 ml 80 mM de buffer tampón fosfato de sodio (pH 5.4) que contiene 0,5 % de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HETAB).

Estos 1,5 ml se centrifugan a 3000 rpm a 4 °C durante 15 min recogiendo posteriormente los sobrenadantes.

*** Medida espectrofotométrica**

A una alícuota del sobrenadante, 200 μL , se añade una solución que contiene 400 μL de tampón PBS ($\text{pH} = 7,4$), 300 μL de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}$ (0,284M ; $\text{pH} = 5,4$) y 80 μL de H_2O_2 (0,026 %); e incubamos durante 5 min a 37 °C. Pasado ese tiempo añadimos 80 μL de 3,3',5,5'-Tetrametilbencidina HCl (TMB) que se obtiene a partir de una solución madre de TMB HCl 0,0212 M en n,n-dimetilformamida y se mantiene a 37 °C durante 3 min, y a continuación se le añade acetato de sodio (120 μL) y se colocan los tubos en hielo. De este modo la enzima cataliza la oxidación de TMB HCl por H_2O_2 con producción de un cromógeno azul con absorbancia máxima a 620 nm.

Las lecturas se realizaron en un espectrofotómetro PerKin-Elmer 1310, Lambda 3.

III.3.2.2.2.b.- Muestras a ensayar

- * Ext^o hexanoico: 1, 3 y 5 mg / oreja (inflamación aguda y crónica).
- * Ext^o clorofórmico: 1, 3 y 5 mg / oreja (inflamación aguda y crónica).
- * Estigmasterol: 0,5 mg / oreja (inflamación aguda y crónica).
- * β -Sitosterol: 0,5 mg / oreja (inflamación aguda y crónica).

Como patrones hemos utilizado:

- Indometacina: 0,5 mg / oreja (inflamación aguda).
- Dexametasona: 0,05 mg / oreja (inflamación crónica).

III.3.2.2.2.c.- Resultados

Los resultados se expresan en unidades de actividad enzimática (U_{MPO}) (Grisham, M.B. y col.; 1990).

$$U_{MPO} = \frac{Am - Ab}{T V_r}$$

A_m = Absorbancia de la muestra

A_b = Absorbancia del blanco

T = Tiempo de reacción (3 min)

V_r = Volumen final de la reacción (4,8050 ml)

Los resultados de actividad MPO en los procesos de inflamación aguda se recogen en las tablas XXIX y XXX y en las figuras 70, 71 y 72; las de inflamación crónica en las tablas XXXI y XXXII y en las figuras 73 y 74.

	Dosis (mg/oreja)	U MPO	% Inhibición Mieloperoxidasa	DE 50
Control	-	0,0506 ± 0,0055	-	
Indometacina	0,5	0,0002 ± 0,00013 ***	99,41	
Extº Hexanoico	1	0,0178 ± 0,00291 ***	64,93	
	3	0,0182 ± 0,00180 ***	65,59	0,59 ± 0,16
	5	0,0114 ± 0,00437 ***	77,37	
Extº Clorofórmico	1	0,0186 ± 0,00236 ***	63,28	
	3	0,0155 ± 0,00145 ***	69,31	0,64 ± 0,19
	5	0,0751 ± 0,00156 ***	85,2	

***P<0,001

Tabla XXIX.- Actividad Mieloperoxidasa de los extractos hexanoico y clorofórmico de A. ageratum L. en la inflamación aguda.

	Dosis (mg/oreja)	U _· MPO	% Inhibición Mieloperoxidasa
Control	-	0,0603 ± 0,00479	-
Indometacina	0,5	0,00221 ± 0,00104 ***	96,32
Estigmasterol	0,5	0,0158 ± 0,00069 ***	73,76
β-Sitosterol	0,5	0,0094 ± 0,00215 ***	84,34

***p<0,001

Tabla XXX.- Actividad Mieloperoxidasa de los compuestos aislados de A. ageratum L. en inflamación aguda.

	Dosis (mg/oreja)	U MPO	% Inhibición Mieloperoxidasa
Control	-	0,0520 ± 0,00760	-
Dexametasona	0,05	0,0321 ± 0,00761 *	38,34
Extº Hexanoico	5	0,0444 ± 0,01182 n.s.	14,66
Extº Clorofómico	5	0,0413 ± 0,01253 n.s.	20,67

*p<0,05 n.s. no significativo

Tabla XXXI.- Actividad mieloperoxidasa de los extractos hexanoico y clorofómico de A. ageratum en inflamación crónica.

	Dosis (mg/oreja)	U MPO	% Inhibición Mieloperoxidasa
Control	-	0,0520 ± 0,00760	-
Dexametasona	0,05	0,0321 ± 0,00761 *	38,34
Estigmasterol	0,5	0,0361 ± 0,00638 n.s.	30,66
β-Sitosterol	0,5	0,0333 ± 0,00246 *	34,93

*p<0,05 n.s. no significativo

Tabla XXXII.- Actividad Mieloperoxidasa de los compuestos aislados de A. ageratum en inflamación crónica.

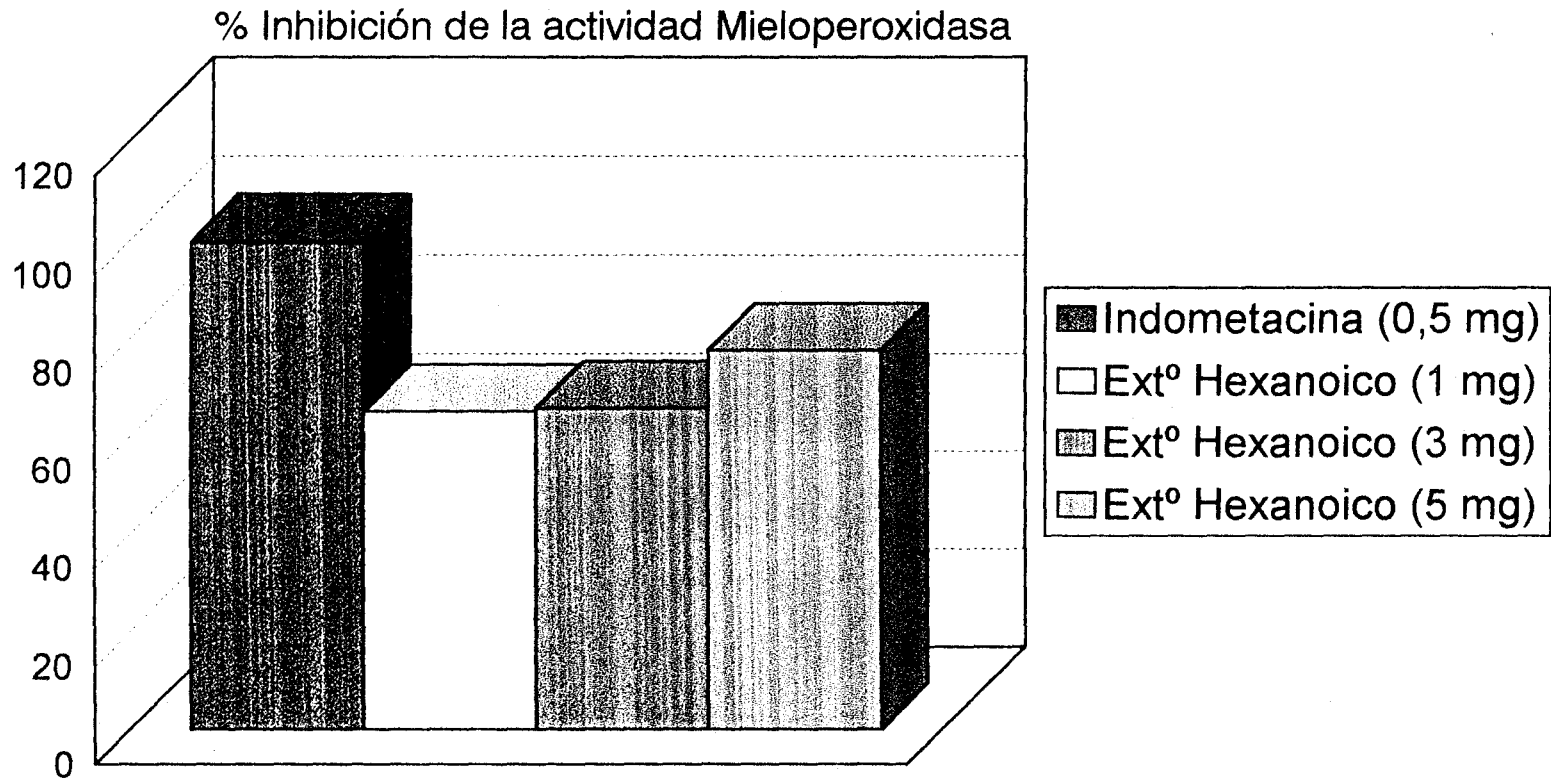


Fig 70.- Actividad Mieloperoxidasa del Extracto Hexanoico de A. ageratum a distintas dosis en inflamación aguda.

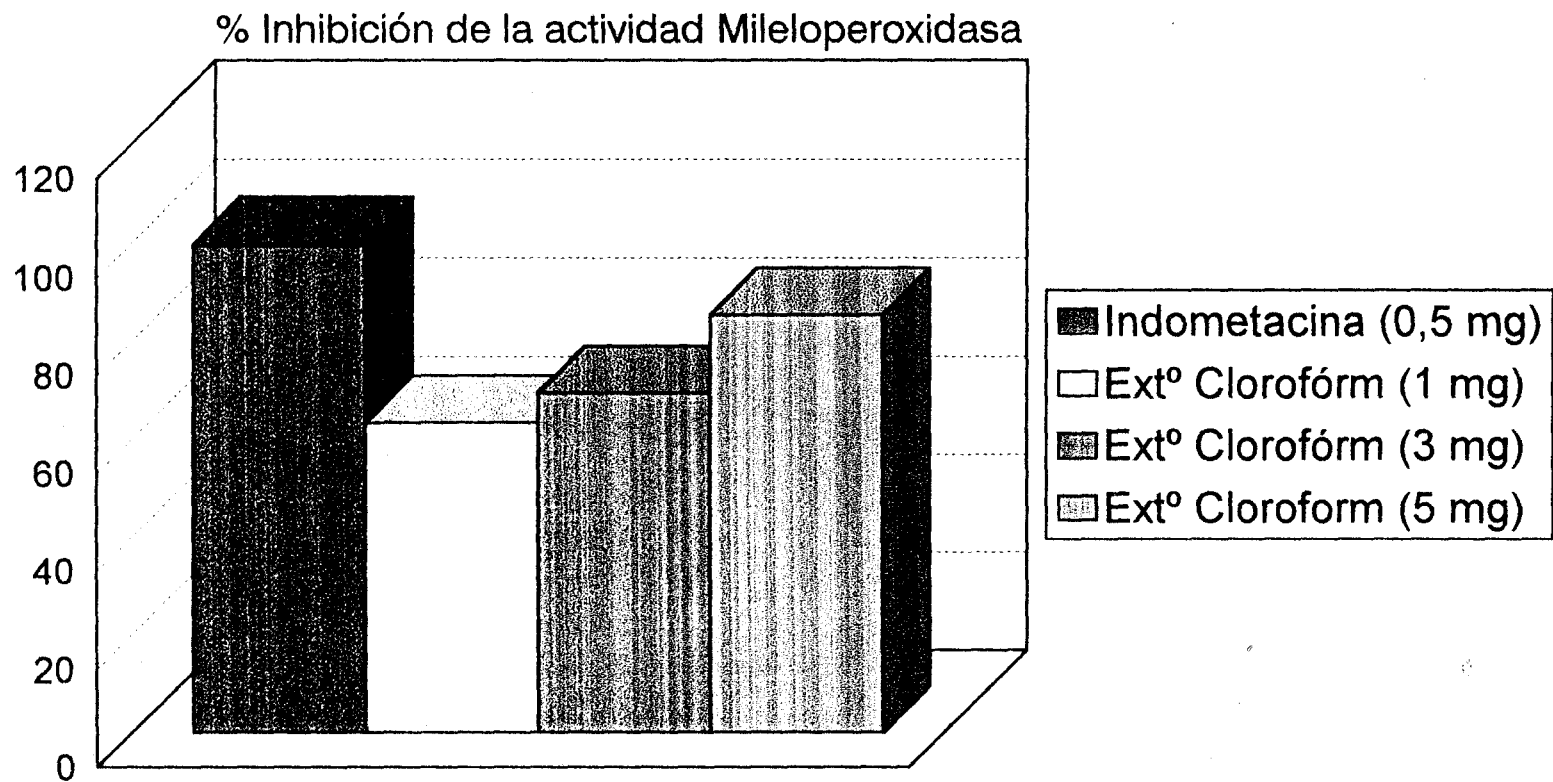


Fig 71.- Actividad Mieloperoxidasa del Extracto Clorofórmico de A. ageratum a distintas dosis en inflamación aguda.

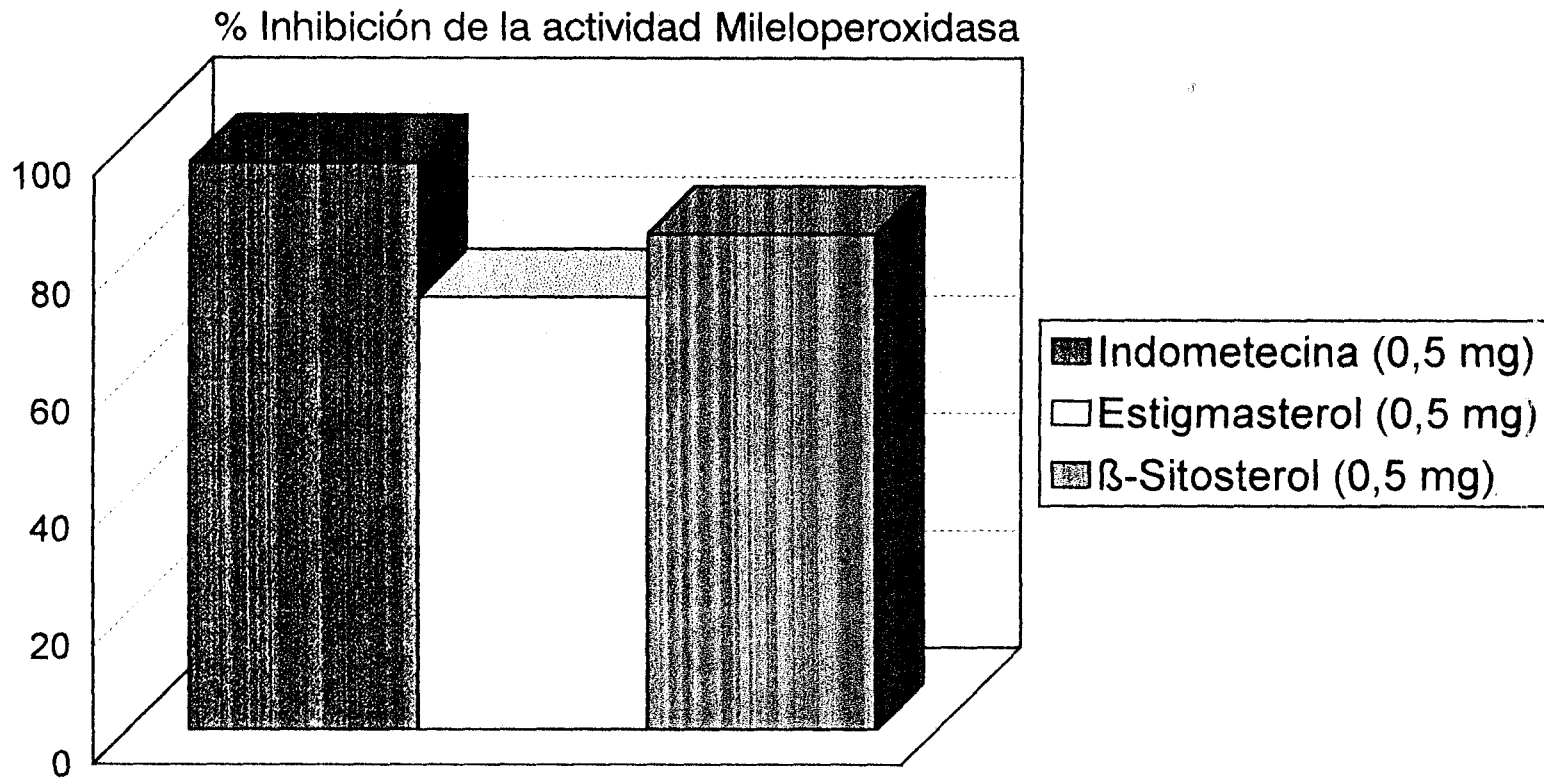


Fig 72.- Actividad Mieloperoxidasa de los compuestos aislados de A. ageratum en inflamación aguda.

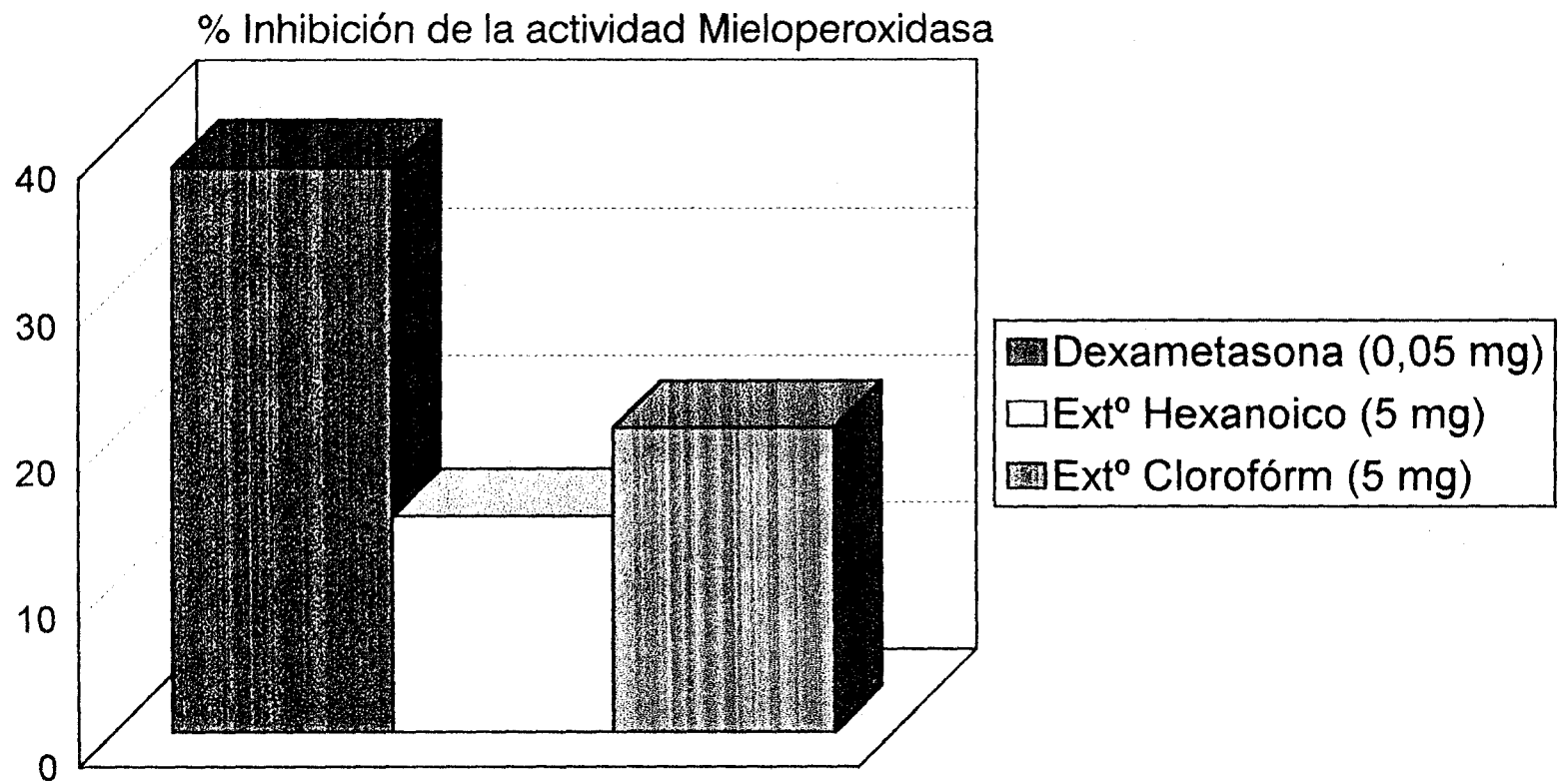


Fig 73.- Actividad Mieloperoxidasa de los extºs Hexanoico y Clorofórmico de A. ageratum en inflamación crónica.

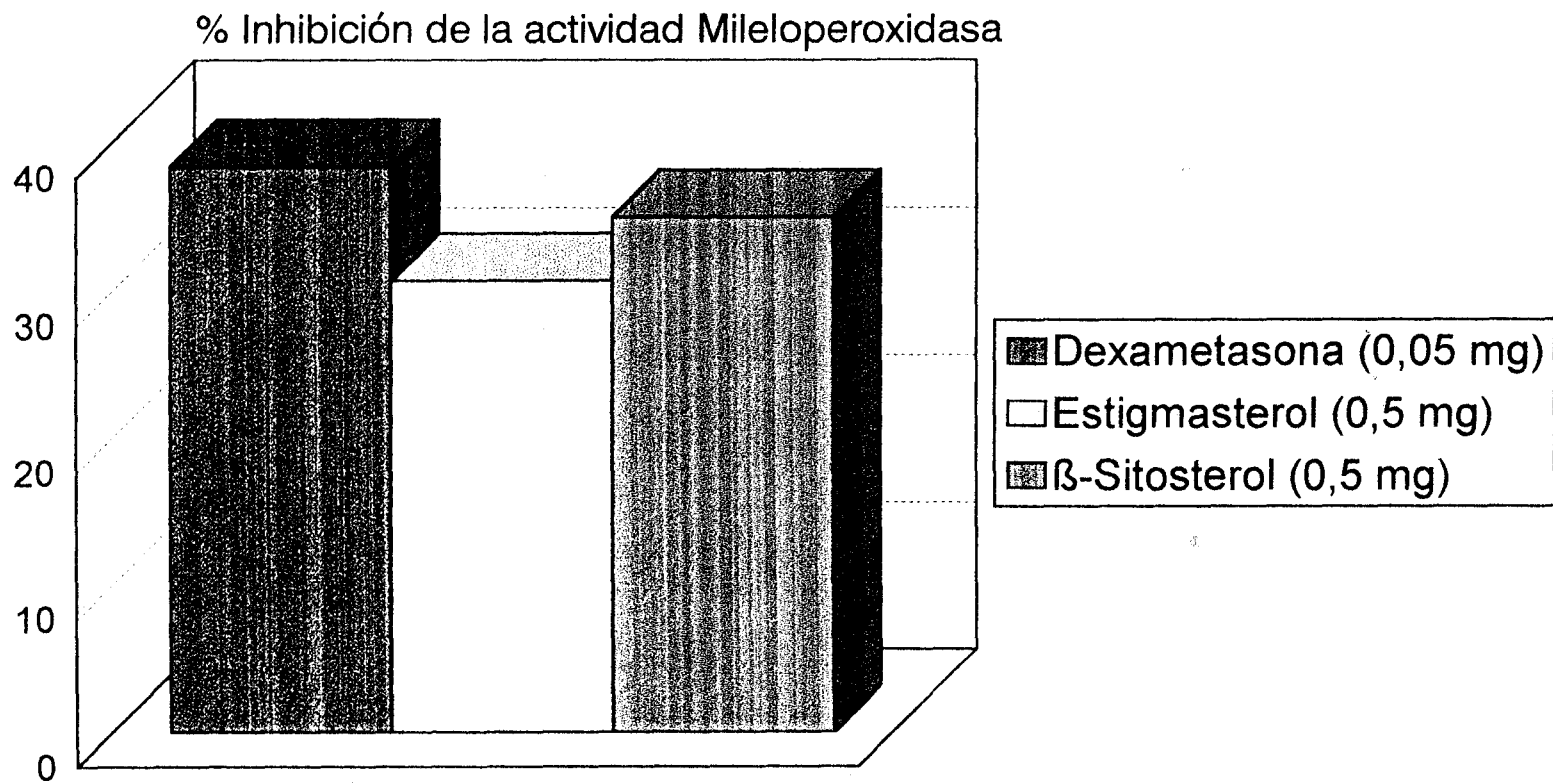


Fig 74.- Actividad Mieloperoxidasa de los compuestos aislados de A. ageratum en inflamación crónica.

III.3.2.2.2.d.- **Discusión de resultados.**

La medida de la infiltración celular puede ser un indicador relevante de la destrucción tisular. En general en los distintos modelos de inflamación dérmica, la MPO, enzima característica de los PMNs se utiliza para la cuantificación de dichas células en el tejido dérmico (Bradley, P.P. y col.; 1982).

En el caso de la inflamación aguda inducida por TPA, la inhibición producida tanto por los extractos, a distintas dosis, como por los principios activos testados, confirmó la reducción del acumulo de neutrófilos en este modelo.

Tanto los inhibidores de la via CO como los de LO, así como antihistamínicos y antiserotoninérgicos, pueden alterar de forma significativa la acumulación de la enzima MPO, aunque no se corresponda de una forma paralela con la inhibición del edema; sin embargo, podemos destacar que el grupo que suprime más contundentemente la infiltración celular en este modelo son los inhibidores de la via CO (Bailey, P.I. y col.; 1983) (Koh, M.S. y col.; 1979) (Issekutz, A.C. y col.; 1986).

Por el contrario, en el modelo de inflamación crónica inducida también por TPA, los extractos muestran una actividad muy baja con respecto al control, no siendo así en el caso de los principios ensayados, los cuales se asemejan ampliamente al comportamiento dexametasona., utilizada como patrón de referencia

IV.- CONCLUSIONES

- 1.- En el estudio fitoquímico realizado con el extracto hexanoico de *Achillea ageratum* L. se ha puesto de manifiesto la presencia de : α -amirina y una mezcla de compuestos entre los que se ha identificado : 2-amino imidazol; 1H-Cicloprop(e)azulen-4-ol ó Globulol; 2, 6, 10- trimetil 2, 6, 9, 11, dodecatetraeno ó Farneseno; ácido hexadecanoico; ácido 1, 2, 3, 4A, 9, 10, 10A octahidro, 1,4A dimetil; 7(1 metil etil) 1 fenantreno carboxílico; 2, 4 bis(dimetil bencil) fenol y 2, 4 bis(dimetil bencil), dimetil etil fenol.
- 2.- En el extracto clorofórmico se han aislado e identificado dos esteroides: (22E)-Stigmasta-5, 22-dien-3 β -ol conocido como Estigmasterol y Stigmast-5-en-3 β -ol conocido como β -Sitosterol.
- 3.- Los ensayos de actividad citostática realizados con los extractos hexanoico y clorofórmico muestran una elevada actividad frente a cultivos celulares vegetales y animales.
- 4.- De todos los compuestos ensayados frente a cultivos de células animales, α -amirina es la que presenta una mayor actividad.

- 5.- Los estudios realizados en modelos de inflamación aguda y crónica, ponen de manifiesto que tanto los extractos como los compuestos ensayados son más activos en procesos procesos inflamatorios agudos.
- 6.- El mecanismo de acción de estos compuestos es similar al de los corticoides.
- 7.- Con los resultados obtenidos podemos justificar el empleo de la especie *Achillea ageratum* L. en procesos inflamatorios.

V.- BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

- ABERHART, D.J. ET CASPI, E. (1979). "On the mechanism of the hydrogen chloride-catalized isimerization of 5α -cholest-8(14)-en-3 β -ol to $5\alpha,17\beta$ -cholest-14-en-3 β -ol fate of the 17α -hydrogen atom". J. Am. Chem. Soc., 101, 1013-1019.

- ALAIS, J.; LABLACHE-COMBIER, A.; LACOSTE, L. ET VIDAL, G. (1976). "Effect of the culture medium on the sterol composition of *Leptosphaeria typhae*". Phytochemistry, 15, 49-57.

- ALEXIS, M.N. (1987). "Glucocorticoids. New insigths into their molecular mechanisms". Trends. Pharmacol. Sdi., 8: 10-11.

- AL HINDAWI, M.K.; AL DEEN, H.I.; NABI, M.H. AND ISMAIL, M.A. (1989). "Antiinflammatory activity of some Iraqi plants using ontact rats". J. Ethno-pharmacol., 26, 163-168.

- ALMAGRO, C.B. (1976). "Test de la carragenina en: esquemas y practicas de farmacología". Ed. Espaxs., Barcelona.

- AQUINO, R.; DE FEO, V.; DE SIMONE, F.; PIZZA, C. ET CIRINO, G. (1991). "Plant metabolites. New compounds and antiinflammatory activity of *Uncaria tomentosa*". Journal of Natural Products., 59 (2), 453-459.

- AWAD, A.B.; CHEN, Y.C.; FINK, C.S. ET HENNESSEY, T. (1996). " Beta-sitosterol inhibit HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids". *Anticancer Res.*, 16(5A), 2797-2804.

- BAILEY, P.J. ET STURM, A. (1983). "Immune complexes and inflammation: the reserve passive arthus reaction in thee rat". *Biochem. Pharmacol.*, 32, 475-481.

- BARBAGALLO, C.; MANGERI, T.L.; PAVONE, P.; ET TENASI, M.T. (1979). "Activita citologica della porgiosina sul test *Allium cepa* L.". *Riv. Biol. Norm. Patol.*, 5, 25-31.

- BLACKWEL, C.J.; FLOWER, R.J.; NIJKAMP, F.P. AND VANE, J.R. (1978). "Phospholipase A₂ activity of guinea pig isolated perfused lung: stimulation and inhibition by antiinflammatory steroids". *Br. J. Pharmacol.*, 62, 79-89.

- BENVENISTE, P. (1986). "Sterol biosynthesis". *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 37, 275-308.

- BEZANGER-BEAUQUESNE, L.(1982). "Plantes superieur antitumorales". *Plantes Médicinales et Phytotherapie*, XVI (3), 206-229.

- BRADLEY, P.P.; PREBAT, D.A.; CHRISTENSEN, R.D. AND ROTHSTEIN, G. (1982). "Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with

an enzyme marker". J. Invest. Dermatol., 78, 206-209.

-BRATTSAND, R.; THALÉN, A.; ROEMPKE, K.; KALLSTROM, T. ET GRUVSTAD, E. (1982). "Influence of 16 α ,17 α -acetal substitution and steroid nucleus fluoration on the topical to systemic activity ratio of glucocorticoids". J. Steroid Biochem., 16, 779-786.

- BYUN, B.H.; SHIN, I.; YOON, Y-S; KIM, S.I. ET JOE, C.O. (1997). "Modulation of protein kinase C activity in NIH 3T3 cells by plant glycosides from *Panax ginseng*". Planta Medica, 63, 389-392.

- CABALLERO, A. (1940). " Flora anlítica de España. Madrid.

- CALIXTO, J.B.; ZANINE, J.C.; CRUZ, A.B.; YUNES, R.A. AND MEDEIROS, Y. (1991). "Extract and compounds obtained from *Mandevilla vetulina* inhibit arachidonic acid-induced oedema in mice, but not rat stomach contraction". Prostaglandins, 41, 515-526.

- CAPPALLETTI, E.M.; TREVISAN, R. ET CANIATO, R. (1982). "Eternal antirheumatic and antineuralgic herbal remedies in the traditional medicine of north-eastern Italy". Journal of Ethnopharmacology, 6, 161-190.

- CARSON, R.P.; O'NEILL-DAVIS, L.; CHANG, J. AND LEWIS, A.J. (1985). "Modulation of mouse esr oedema by cyclooxygenase and lipooxygenase onhibitors and other pharmacologic agents". *Agents Action*, 17, 197-204.

- CHATUVERDI, A.K.; PALMAR, S.S.; BHATNAGAR, S.C.; MISRA, G. ET NISAN S.R. (1974). "Anticonvulsivant and antiinflammatory activity of natural plant coumarins and triterpenoid". *Res. Commun. Chem. Phatol. Pharmacol.*, 9, 11.22.

- CHAWLA, A.S.; SHARMA, A.K.; HAUDA, S.S. ET DHAR, K.L. (1992). "Chemical investigation and antiinflammatory acitivity of Vitex negundo seeds" . *Journal of Natural Products*, 55(2), 163-167.

- COLMEIRO, M. (1871). "Diccionario de los diversos nombres vulgares de muchas plantas usuales o notables del antiguo y nuevos mundos". Madrid.

- COLOT, M.(1972). "Notions techniques de pharmacologie generale". Masson et Cie. Paris.

- CONNOLLY, J.D. ET HILL, R.A. (1989). "Fracture analysis of chemically strengthned glass disk". *Nat. Prod. Repts.*, 6, 475-501.

- CONNOLLY, J.D. ET OVERTON, K.H. (1972). "Chemistry of Terpenes and Terpenoids" (A.A. Newman, ed.). Academic Press, London. 207-287.

- CONNOLLY, J.D, FREE, A.A., ANJANEYULU, V., RAVI, K. ET SAMBASIVARAO, G. (1986). "Fracture analysis of chemically strengthened glass disk. Acta Crystallogr. sect., 42, 1352-1354.

- CONSTANTINESCU, D.G.; CONSTANTINESCU, M.; RETECIANU, M. AND OTELIANU, R. (1962). "Aphitobiological method of alkylating compound". *Arzheimittel. Forsch*, 12, 827-831.

- CONSTANTINESCU, D.G.; RETECIANU, M.; OTELIANU, R. AND CONSTANTINESCU, M.(1963). "The phytobiological testing of the cytostatic action of the ethylenimino-p-benzoquinones used in the chemoterapy of cancer. *Pharmazie*, 18, 699-703.

- COOK, L. AND WEIDLEY,E. (1957). " Behavioural effects of some pscpharmacological agents". *Ann. Ny Acad. Sci.*, 66, 740-752.

- DELLA LOGGIA, R.; TUBARO, A.; SOSA, S.; BECKER, H.; SAAR, S.T. ET ISAAC, O. (1994). "The role of triterpenoids in the topical antiinflammatory activity of *Calendula officinalis* flowers". *Planta Med*, 60, 516-520.

- DELLA LOGGIA, R.; SOSA, S.; TUBARO, A.; KRASNER, U. ET JURENITSCH, I.(1992). "Antiinflammatory principles from *Achillea aspenifolia* an *Achillea pratensis*" . *Planta Med.*, 58(1), 641-642.

- DE YOUNG, L.M.; KHEIFETS, J.B.; BALLARON, S.L. AND YOUNG, J.M. (1989). "Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents". *Agents and Actions*, 26, 335-341.

- DI ROSI, M.; GIROUD, I.P. AND WILLOUGHBY, D.A. (1971). "Studies of the mediators of acute inflammatory sites by carrageenan and triterpene". *J. Pathol.*, 104, 15.

- DOHERTY, N.S. AND ROBINSON, B.U. (1975). "The inflammatory response to carrageenan". *J. Pharm. Pharmacol.*, 27, 701.

- DUSH, CH-Y; PEZZUTO, J.M.; KINGHORN, A.D.; LEUNG, S.L. ET FARNSWORTH, N.R. (1987). "Plant anticancer agents XLIV. Citotoxic constituents from *Stizophyllum piparium*". *Journal of Natural Products*, 50, 1, 63-74.

- ELGAMAR, M.H.A.; HANNA, A.G. ET DUDDECK. (1990). "Constituents of essential oil from *Achillea santolina*". *Fitoterapia*, 62(4), 359.

- FELDMAN, R.S.; MEYER, J.S. ET QUENZER, L.F. (1997). "Principles of neuropsychopharmacology". Sunderland: Sinauer Associates.

- FERNNER, G.P.; PATERSON, G.W. ET KOINES, P.M. (1986). "Synthesis and characterization of tris (β -diketonato) technetium (III) and (IV) complexes". *Lipids*, 21, 48-51.

- FIRESTONE, G.L.; PAYVAR, F. ET YAMAMOTO, R.R. (1980). "Glucocorticoid regulation of protein and compartmentalization". *Nature*, 300:221-225.

- FLOMAN, Y. AND ZOR, U. (1976). "Mechanism of steroid action in inflammation: inhibition of prostaglandin synthesis and release". *Prostaglandins*, 12, 403-413.

- FLOWER, R.J. (1991). "Glucocorticoid, phospholipase A₂ and inflammation". *Trends Pharmacol. Sci.*, 2: 186-187.

- FONT QUER, P.(1990). "Plantas medicinales. El Dioscórides renovado". 12^a es. Ed. Labor. S.A. Barcelona.

- GARCIA, M.D., PUERTA, R. ; MARTINEZ, S. AND SAENZ, M,T, (1997). "Analgesic, antipyretic and antiinflammatory effects of *Achillea ageratum*". *Phytother Res.*, 11, 376-379.

- GARG AND NES (1984) de la bibliografía de la discusión de resultados del sitosterol
- GENIS, R.B. (1989). "Biomembranes, Molecular structure and Funtion". Springer-Verlang. Berlin.
- GIBBONS, G.F.; MITROPONLOS, K.A. ET MYANT, N.B. (1982). "Biochemistry of cholesterol". Elsevier, Amsterdan and New York.
- GOAD, L.J. (1976). "Biochemical and biophysical perspectives in marine biology". Vol 3, 213-319, Academic Press, London.
- GOLBERG, A.S.; MUELLER, E.C. EIGEN, E. ET DESALVA, S.J.(1969). "Isolation of the antiinflammatory principles from Achillea millefolium (Compositae)". J. Pharm. Sci., 58, 938-941.
- GOLDSTEIN, J.L. ET BROWN, M.S. (1990). "LDL receptor: a modular membrane protein envolved for efficient cellular transport". Nature (Lond), 343, 425-430.
- GRISHAM, M.B.; BENOUIT, J.N. ET GRANGER, D.N. (1990). "Assesement o leukocyte en involvement during ischemia and reperfusion of the intestine", Meth. enzimol., 186, 729-742.

- HANDA, S.S.; CHAWLA, A.S. ET SHARMA, A.K. (1989). "Plants with antiinflammatory activity". *Fitoterapia*, LXII, 1, 3-31.

- HARA, H.; SUKAMOTO, T.; OHTAKA, H.; ABO, K.; TATUMI, Y.; SAITO, Y. SUZUKI, A. AND TSUKAMOTO, G. (1992). "Effects of baicalein and a-tocopherol on lipid peroxidation, free radical scavenging activity and 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-induced ear edema". *Eur. J. Pharmacol.*, 221, 193-198.

- HECKER, E. (1968). "Cocarcinogenesis principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other euphorbiaceae". *Cancer Res.*, 28, 2338.

- HEYWOOD, U.H. (1985). *Las plantas con flores*. Ed. Reverté S.A. Barcelona.

- HUANG, M-T; LYSZ, T.; FENARO, T.; ABIDI, T.F.; LASKIN, J.D. AND CONNEY, A.H. (1991). " Inhibitory effects of curcumiin on in vitro lipoxigenase and cyclooxygenase activities ein mouse epidermis". *Cancer Res.*, 51, 813-819.

- ISSEKUTZ, A.C.; SZPEJDA, M. ET RIPLEY, M.(1986). "Effects of lipoxigenase and ciclooxigenase inhibitors on neutrophil margination emigration and related inflammatory responses". In *Avances in Inflammation Research*, vol 11(Ed. I. Otternes et al) 31-45. Raven Press. New York.

- JANEZIC, S.A. ET RAO, A.U. (1992). "Dose-dependent effects of dietary phytosterol on epithelial cell proliferation of the murine colon". *Food Chem. Toxicol.*, 30(7), 611-616.

- KABARITY, A. AND MALLALLAH, G. (1979). "Mitodepressive effect of khat extract in the meristematic region of *Allium cepa* root tips". *Citología*, 45, 230-231.

- KAMINAGA, T.; YASUKAWA, K.; KANNO, H.; TAI, T.; NUNOURA, Y. AND TAKIDO, M. (1996). "Inhibitory effects of lacnostane-type triterpene acids, the components of *Porias cocos*, on tumor promotion by 12-O-tetradecanoylforbol-13-acetate in two stage of calcinogenesis in mouse skin". *Oncology*, 53: 382-395.

- KANEDA, N.; PEZZUTO, I.M.; KINGHORN, A.P. ET FARNSWORTH, N.R. (1992). "Plant anticancer agents, L. citotoxic triterpenes from *sandoricum koetjapa* stems". *Journal of Natural Products*, 55(5), 654-659.

- KANTROWTRTZ, F. ROBINSON, D.R. McGUIRE, M.B. AND LEVINE, L. (1975). "Corticosteroids inhibit prostaglandin production by rheumatoid synovia". *Nature (Lond)*, 258, 735-739.

- KITAKAWA, I.; NISHINO, T. ET KYOGOKU, Y (1979). "Sulfonoglycolipid from the sea urchin *Anthociadairina crassispira* A.". *Tetrahedron Lett.*, 1419-1422.

- KOH, M.S.; PARENTE, L. ET WILLOGHBY, D.A. (1979). "Immunological and non-immunological pleural inflammation: the effects of antiinflammatory and antirheumatic drug". Eur. J. Rheum. Inflammation t., 286-290.

- KONOSHIMA, T.; TAKASAKI, M.; KOZUKA, M.; NAGAO, T.; OKATE, H.; IRINO, N.; NAKASUMI, T.; TOKUDA, H. AND NISHINO, H. (1995). "Inhibitory effects of curcubitane triterpenoids on Epstein-Barr virus activation and two stage carcinogenesis of sekin tumor. II. Biol. Pharma. Bull. 18, 284-287.

- KRAUTER, G.; VON DER LIETH, C-W.; SCHMIDT AND HECKER, E. (1996). "Estructure/activity relation ships of polifuncional diterpenes of the tiagliane type. A pharmacophore model for protein kinase-C activators based on structure/activity studies and molecular modeling of the tumor promoters 12-O-tetradecanoylphorbo 13-acetate and 3-O-tetradecanoylingenol". Eur. J. Biochem., 242, 417-427.

- KWEIFIOOKAI, G. DEMUNK, F. RUMBLE, R.A.; MACRIDES, J.A. ET CROPLEY, A. (1994). "Antiarthritic mechanism of amyrin triterpenes". Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology, 85(1), 45-55.

- LANHERS, M.C.; FLEURENTIN, J.; MORTIER, F.; VINCHE, A. AND YOUNOS, C.H. (1992). "Antiinflammatoiy and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagohytum procubens*". Palnta Med., 55, 117-123.

- LAZARO E IBIZA, B. (1906). Compendio de la Flora Española. 2ª Ed. Madrid.

- LENCE, P. (1962). "A new device for plethysmographic measuring of small object". Arch. Int. Pharmacodyn, 136, 241-273.

- MARTINEZ, S. (1995). Tesina de Licenciatura. Sevilla.

- McEVEN, B.S. (1991) "Non-genomic effects of steroid on neural activity". Trends. Pharmacol. Sci., 12: 141-147.

- MIYAQUE, A.; YAMAMOTO, H.; KUBOTA, E.; HMAGUCHI, K. ET KONDA, A. (1993) "Suppression of inflammatory responses to 12-O-Tetradecanoilforbol-13-acete and carrageenin by of extracellular group Iifosfolipase A₂". Br. J. Pharmacol., 110, 447-453.

- NAKAMURA, O.; MINAKI, Y.; NISHINO, H. ET SASHIDA, Y. (1994). "Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium speciosum* × *L. novilissimum* 'star gazer' and their antitumor-promoter activity". Phytochemistry, 36, 2, 463-467.

- NES, W.R.; KRAVITZ, K.; BEHZADAN, S.; PATTERSON, G.W.; LANDREY, J.R. ET CONNER, R.L. (1975). "Dealkylation of 24-ethylsterols by *Tetrahymena pyriformis*". Biochem. Biophys. Res. Commun., 66, 1462-1466.

- NISHIZUKA, Y. (1988). "The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation". *Nature*, 334, 25, 661-665.

- NIHINDAWI, M.K.; AL DEEN, I.H.; NABI, M.H. ET ISMAIL, M.A. (1989). "Antiinflammatory of some Iraqi plants using intact rats". *J. Ethnopharmacol.*, 26, 163-168.

- O'FLAHERTY, J.T.; ROSI, A.G.; JACOBSON, D.P. ET REDMAN, J.F. (1991). "Roles of Ca²⁺ in human neutrophil responses to receptor agonists". *Biochem. J.*, 277, 705-711.

- OTTERNESS, I.G. ET GANS, D.I. (1988). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs an analysis of relationship between laboratory animal and clinical doses, including species scaling". *J. Pharm. Sci.*, 77, 790-795.

- PANT, P. ET RASTOGI, R.P. (1979). "Variation in the mayor lipids during embryonic development of *Antheraca mylitta* (Lepidoptera)". *Phytochemistry*, 18, 1095-1108.

- PATTERSON, G.W. (1984). "Isoprenoids in Plants, Biochemistry and funtion", 307-312. Dekker, New York.

- PAYA, M.; HALLIWELL, B. ET HOULT, J.R. (1992). "Interaction of a series of coumarins with reactive oxygen species: scavenging of superoxide hypochlorous acid and hydroxyl radicals. *Biochem. Pharmacol.*, 44, 205-214.

- SUGISHITA, E.; AMAGAYA, S. ET OGIHARA, Y. (1981). "Antiinflammatory testing methods: comparative evaluation of mice and rats". J. Pharm. Dyn, 4, 565-575.

- SUZUKI, K.; OTA, H.; SASAGAWA, S. SAKATANI, T. ET FUJIKURA, T.(1983). "Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leucocytes". Analytical Biochemistry, 132, 245-352 (1983).

- TALAVERA, S. (1987). "Achillea L. en valdes, B.; Talavera, S. and Fernandez Galiano, E. (des.). Flora vascular de Andalucia Occidental", Vol III, Ed Ketres editora, S.A. Barcelona.

- TAM, S.; HONG, S.L. ET LEVINE L. (1977). "Relationship, among the steroids of antiinflammatory properties and inhibition of prostaglandin production and arachidonic acid release by transformed mouse fibroblasts". J. Pharmacol. Exp. Ther. 203, 162-168.

- TANAKA, O., ET KASAI, R. (1984). "Highly efficient and versatile synthesis of isotopically labeled 1-Deoxy-D-xylulose". Prog. Chem. Org. Nat. Prod., 46, 1-76.

- TASHIJIAN, A.H.; VOELKEL, E.F.; McDONOGH, J. ET LEVINE, L. (1975). "Hydrocortisone inhibits prostaglandin production by mouse fibrosarcoma cells. Nature (Lond.), 258, 739-741.

- WILKINS, A.L. (1977). "The structure of triterpenoid ketol from *Cetraria mivalis*".
Phytochemistry, 16, 2031-2032.

- WITHER, N.W. (1983). "In Marine Natural Products". Vol 4 , 87-130. Academic Press,
New York.

- YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; KASAHARA, Y.; UKIYA, M.; KUMAKI, K.;
TAMURA, T.; YAMANOUCHI, S. AND TAKIDO. (1998). "Inhibitory effects of
heliantriol C; a component of edible *Chrysanthemum*, on tumor promotion by 12-O-
tretadecanoyl phorbol -13-acetate in two stage of carcinogenesis in mouse skin.
Phytomedicine, 5(3), 215-218.

Mercedes Alina Gomez Lopez
"Estudio fitofarmacológico de la Especie
Achillea ageratium L."

Sobresaliente cum laude

11 Marzo 1999

~~Dr. Ana Rincón de Alvarado~~

~~M^{ra} Lorei Harter~~

~~Dr. Carmen López-Pérez~~

~~Dr. C. Amador~~

~~Dr. Hill~~

~~Dr. Hill~~