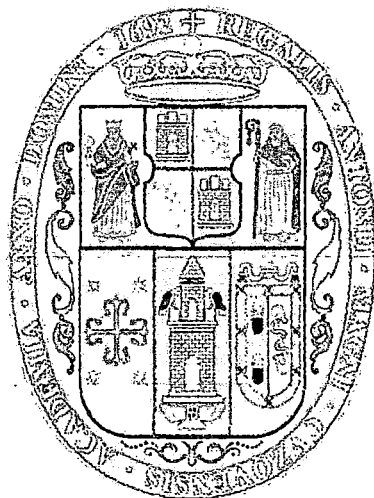


**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL  
CUSCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS, FÍSICAS, MATEMÁTICAS, FARMACIA  
E INFORMATICA**

**CARRERA PROFESIONAL DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**



**“EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA RESPUESTA  
ALÉRGICA Y DETERMINACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL  
EXTRACTO METANÓLICO DE *Cosmos peucedanifolius* (Panti)”**

**TESIS PRESENTADA POR:**

- Bach. CÉSAR TEÓFILO CHOQUE ESTRADA
- Bach. ERIKA LEONOR SALAS CÁRDENAS

**PARA OPTAR AL TITULO PROFESIONAL DE QUÍMICO  
FARMACÉUTICO**

**ASESORA: MCs. CARLA DEL CARPIO JIMENEZ**

**CUSCO - PERU**

**2011**

**TESIS AUSPICIADA POR EL CONSEJO DE INVESTIGACION**

## *AGRADECIMIENTOS*

*Queremos expresar nuestras más sinceras muestras de agradecimiento:*

- *A Dios, quien nos dio la vida, por ser quien ha estado a nuestro lado en todo momento dándonos las fuerzas necesarias para continuar luchando día tras día y seguir adelante rompiendo las barreras que se nos presenten.*
- *A nuestra Asesora MCs. Carla Del Carpio Jiménez, por su apoyo desinteresado, por brindarnos su amistad y principalmente por su comprensión al guiarnos en este camino para concretar este trabajo*
- *A nuestras queridas familias quienes han confiado en nosotros y nos han apoyado durante la realización de esta tesis.*
- *A nuestros amigos los que han pasado y los que han quedado, porque supieron entendernos, apoyarnos y alentarnos hasta la culminación de nuestra tesis.*

*César y Erika*

## DEDICATORIA

*A mis padres Teófilo y Graciela ya que por ellos soy quien soy hoy en día, por su apoyo incondicional por todo el amor que me brindan cada día de mi vida y por la confianza depositada en mi, solo me queda decir que no los defraudare.*

*A mis queridos hermanos Rubén, Marco que siempre están dispuestos a ayudarme y siempre están alerta ante cualquier problema que se me pueda presentar, decirles gracias por ser como son.*

*A mis entrañables amigos por su amistad brindada quienes siempre están dispuestos a dar un consejo cuando uno lo necesita, por siempre están en las buenas y en las malas, siempre podrán contar con mi amistad.*

*César Teófilo*

## DEDICATORIA

*A mi querida mamá Lilia Cárdenas por su constante apoyo durante toda mi vida, confianza en mí aun en los momentos más difíciles, por estar siempre a mi lado te amo.*

*A mi querido papá Oswaldo Salas por brindarme los recursos necesarios para cumplir mis objetivos como persona, y por el apoyo moral que siempre me da.*

*A mis queridos hermanos Lillian y Oswaldo por la constante guía en todos los aspectos de mi vida, por darme el apoyo necesario cuando lo necesite y la confianza que siempre tuvieron en mí.*

*A mi pequeño sobrino Diego quien con su sonrisa ilumina mis días.*

*A mis queridos amigos por la amistad, consejo, apoyo y comprensión que siempre me dan.*

*Erika*

## RESUMEN

El presente trabajo abordó la evaluación del efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)* y la determinación de la toxicidad aguda de esta especie. **Objetivo:** Evaluar el efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)* y determinar la toxicidad aguda. **Metodología:** Para evaluar el efecto sobre la respuesta alérgica se realizó un estudio cuasi experimental de series cronológicas con repetición del estímulo y diseño con un grupo control, realizando las siguientes pruebas: Edema plantar inducido por OVA (ovoalbúmina), Reacción cutánea inducida por Histamina en ratas albinas y Prueba de Anafilaxia Pasiva Cutánea para determinar IgE específica. Y con el objetivo de demostrar la probable toxicidad aguda se usó, un estudio cuasi experimental con pre prueba y post prueba teniendo en cuenta el Método de Lorke. **Resultados:** Se observó que a dosis de 800mg/Kg existió una inhibición muy buena sobre la inflamación alérgica inducida por Ovoalbúmina de 52 % similar al del fármaco patrón Indometacina. En el ensayo de la evaluación de la reacción cutánea inducida por histamina en ratas albinas se obtuvo buenos resultados a dosis de 400 y 800 mg/kg obteniéndose un buen porcentaje de Inhibición. Finalmente a dosis de 400 mg/Kg se observó una inhibición en la producción de IgE específica mostrándose de mejor manera a una dilución de e 1/256. En cuanto a la determinación de la toxicidad aguda mediante la prueba de Lorke se determinó que el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)*, es poco tóxica. **Conclusiones:** Los resultados de esta investigación constituyen parte de la base experimental pre clínica necesaria para la realización de ensayos clínicos controlados en inmunopatologías como la artritis reumatoide o el asma bronquial entre otras enfermedades relacionadas a la respuesta alérgica

**Palabras clave:** Respuesta alérgica, *Cosmos peucedanifolius (panti)*, inflamación, IgE.

## ABSTRACT

The present study addressed the evaluation of the inhibitory effect on the allergic response of methanolic extract *peucedanifolius* *Cosmos* (panty) and the determination of acute toxicity of this species. Objective: To evaluate the inhibitory effect on the allergic response of methanolic extract *peucedanifolius* *Cosmos* (panty) and to determine acute toxicity. Methods: To assess the effect on the allergic response was carried out a series quasi-experimental study with repeated stimulation timelines and design with a control group performing the following tests: plantar edema induced by OVA (ovalbumin), skin reaction induced by histamine in albino rats and passive cutaneous anaphylaxis test to determine specific IgE. And with the aim of demonstrating the acute toxicity likely use a quasi-experimental study with pretest and post-test taking into account the method of Lorke. Results: We observed that there was a dose 800mg/Kg very good inhibition of allergic inflammation induced by ovalbumin 52% similar to the standard drug indomethacin. In the trial of the assessment of skin reaction induced by histamine in albino rats obtained good results at doses of 400 and 800 mg / kg obtained a good percentage of inhibition. Finally, at doses of 400 mg / kg inhibition was observed in the production of IgE showing the best way to a dilution and 1 / 256. As for the determination of acute toxicity test by Lorke was determined that the methanol extract *peucedanifolius* *Cosmos* (panty), it is not toxic. Conclusions: The results of this research are part of the preclinical experimental base necessary for conducting controlled clinical trials in *rheumatoid arthritis immunopathology as bronchial asthma or other diseases related to allergic response*

**Keywords:** allergic response, *Cosmos peucedanifolius* (panty), inflammation, IgE.

## GLOSARIO DE TERMINOS

- **Alérgeno:** Sustancia capaz de producir una reacción de hipersensibilidad pero que no es intrínsecamente nociva. Algunos alérgenos comunes son los pólenes, la caspa de los animales, el polvo domestico, las plumas y diversos alimentos. Generalmente en el cuerpo se protege los alérgenos o antígenos mediante las compleja reacciones químicas de los sistemas inmunes humoral y celular (Villanueva, 2000)
- **Anafilaxia pasiva:** reacción exagerada de hipersensibilidad que se produce en una persona normal como consecuencia de la inyección de suero procedente de un sujeto sensibilizado (Villanueva, 2000)
- **Anafilaxia:** una reacción adversa de causa inmunológica desencadenada por el contacto del paciente, previamente sensibilizado, con diferentes agentes externos (medicamentos, alimentos, picaduras de insectos, agentes físicos, hidatidosis, etc.).” Autores: Francisco José López Sánchez: R-2 de Medicina de Familia y Comunitaria del Hospital Clínico Universitario de Málaga.
- **DL50 (Dosis Letal Media):** Estadísticamente derivada de una sola dosis de la sustancia que puede predecir la causa de muerte del 50 % de los animales cuando es administrado por vía oral. El valor sw la DL50 es expresado en términos del peso de la sustancia por unidad del numero de animales ensayados (mg/Kg) (OECD,2001)
- **Dosis:** Es la cantidad de sustancia administrada. Dosis es expresado como peso de la sustancia a ensayar por unidad de peso del animal a ensayar (OECD, 2001).
- **Patrón:** Medida reconocida de comparación de la superior eficacia o valor de una medicación concreta u otro tratamiento en comparación con el otro fármaco o tratamientos (Villanueva, 2000).
- **Toxicidad Aguda Oral:** Referido a que los efectos adversos ocurren después de una administración oral de la sustancia en una sola dosis o múltiples dosis dentro de las 24 horas (OECD, 2001).
- **Pletismómetro:** Este instrumento permite testar agentes antiinflamatorios o evaluar los efectos inflamatorios secundarios.

## **ABREVIATURAS**

- ERO Especies reactivas de oxígeno
- DL50 Dosis letal media
- IgE Inmunoglobulina E
- IgG Inmunoglobulina G
- DSTF Disolución Salina en Tampón Fosfato
- OVA ovoalbúmina
- mg miligramo
- ml mililitro
- rpm revoluciones por minuto
- ug microgramo
- APC anafilaxia pasiva cutánea
- nm nanómetros
- CPA células presentadoras de antígenos
- FDA Food And Drug Administration
- LES Lupus Eritematoso Sistémico
- Inmunocomplejos (IC)



## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	
DEDICATORIAS	
RESUMEN	
ABSTRACT	
GLOSARIO DE TERMINOS	
ABREVIATURAS	
INTRODUCCION	

### CAPITULO I

I. GENERALIDADES	1
1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:	1
1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA	3
1.3 OBJETIVOS:	3
1.3.1 OBJETIVOS GENERALES	3
1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	3
1.4 JUSTIFICACION	4
1.5 HIPOTESIS	5

### CAPITULO II

II. MARCO TEORICO	6
2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES	6
2.2 ANTECEDENTES DE <i>Cosmos peucedanifolius</i> (Pantl)	13
A. ANTECEDENTES ETNOFARMACOLOGICOS	13
B. FITOQUÍMICOS	15
C. BASES TEÓRICAS CIENTÍFICAS	16
D. DESCRIPCIÓN BOTANICA	17
E. ETNOFARMACOLOGIA - DOSIS Y USOS MEDICINALES	18
2.3 EL SISTEMA INMUNITARIO	20
2.3.1 INMUNIDAD	20
A. PRINCIPALES MEDIADORES CELULARES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE	22
A.1 LINFOCITOS	22
A.2 SISTEMA MONOCITO-MACRÓFAGO	23
A.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS	23
A.4 MASTOCITOS Y BASÓFILOS	24
A.5 EOSINÓFILOS	24
B. PRINCIPALES MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE	25
B.1 ANTICUERPOS	25
B.2 CITOCINAS	25
B.3 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	26
B.4 QUIMIOCIAS	26
B.5 HISTAMINA	27
B.6 OTROS MEDIADORES MOLECULARES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INMUNE	28

2.4 ENFERMEDADES POR HIPERSENSIBILIDAD	29
A. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I	29
B. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO II	30
C. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO III	32
D. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV	33
2.5 ALERGIA	34
2.6 PRODUCCION DE IGE	34
A. REGULACION DE LA SÍNTESIS DE IGE	36
B. FACTORES GENETICOS	36
C. NATURALEZA DEL ALÉRGENO Y LA HISTORIA NATURAL DE LA EXPOSICIÓN AL MISMO	37
D. CÉLULAS T HELPER Y CITOCINAS	37
2.7 TRATAMIENTO DE LA ALERGIA	38
A. INHIBIENDO LA PRODUCCION DE IGE O LAS VIAS EFECTORAS ACTIVADAS POR EL ENTRECruzAMIENTO DE LA IGE DE LA SUPERFICIE CELULAR	38
B. INMUNOTERAPIA PARA LA ALERGIA	38
2.8. FARMACOS PATRONES E INDUCTORES	40
2.8.1 CLORFENAMINA	40
2.8.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN:	41
2.8.1.2 FARMACOCINÉTICA:	41
2.8.2 INDOMETACINA	42
2.8.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN	42
2.8.2.2 FARMACOCINÉTICA	42
2.8.3 KETOTIFENO	43
2.8.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN	44
2.8.3.2 FARMACOCINETICA	44
2.9 EVALUACION DE LA TOXICIDAD AGUDA	46
A. LA DL50 COMO CONSTANTE BIOLOGICA	46
B. DESARROLLO HISTORICO DE LOS TEST DE DL50	47
C. EL METODO DE LORKE PARA LA DETERMINACION DE DL50	49

### CAPITULO III

3. MATERIALES Y METODOS	51
3.1 MATERIALES	51
A. MATERIAL BOTANICO	51
B. MATERIAL BIOLOGICO	51
C. MATERIALES DE VIDRIO	51
D. MATERIAL DE CAMPO	52
E. EQUIPOS	52
F. MATERIALES DE GABINETE	52
3.2. REACTIVOS	52
A. REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD	52
B. REACTIVOS PARA LA MARCHA FITOQUIMICA	53
C. REACTIVOS PARA LA METODOLOGÍA DE EVALUACION DE EFECTO	53
3.3. OTROS	54

3.4 METODOLOGIA	54
A. NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN	54
B. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	55
B.1 PARA LA EVALUACION DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA RESPUESTA ALERGICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE COSMOS PEUCEDANIFOLIUS (PANTI)	55
B.1 PARA EL MODELO IN VIVO DE INFLAMACION ALERGICA INMUNIZACION DE LOS ANIMALES	
B.2 PARA LA EVALUACION DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA (OVOALBÚMINA)	56
B.3 PARA LA EVALUACION DE LA REACCION CUTANEA INDUCIDA POR HISTAMINA EN RATAS ALBINAS	57
B.4 ENSAYO PARA DETERMINAR IGE ESPECÍFICA	58
B.4.1 OBTENCION DE ANTISUEROS DE LOS RATONES ALBINOS	58
B.4.2 PARA PRUEBA DE ANAFILAXIA PASIVA CUTANEA PARA DETERMINAR IGE ESPECÍFICA EN RATAS ALBINAS	59
C. PARA LA DETERMINACION DE LA DL50 POR EL METODO DE LORKE	60
3.5 VARIABLES	62
A. VARIABLES IMPLICADAS	62
A.1 VARIABLES INDEPENDIENTES	62
A.2 VARIABLES DEPENDIENTES	62
B. OPERACIONALIZACION DE VARIABLES	62
B.1 DOSIS DEL EXTRACTO METANÓLICO DE COSMOS	62
B.2 EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA RESPUESTA ALÉRGICA	63
B.2.1 EFECTO SOBRE EL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA	63
B.2.2 INCREMENTO DE PERMEABILIDAD CAPILAR INDUCIDO POR HISTAMINA EN RATAS	63
B.2.3 EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IGE EN RATONES	64
C. DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANOLICO DE Cosmos	64
D. VARIABLES NO IMPLICADAS:	65
D.1 VARIABLES INTERVINIENTES	65
E. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN	65
F. TECNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS	65
3.5.1 CUADRO DE RESUMEN DE VARIABLES	66
3.5.2 CUADRO DE RESUMEN DE VARIABLES NO IMPLICADAS	67
3.5.3 CUADRO RESUMEN DE CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION	67
3.6 ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO	68
3.7 PRUEBAS PRELIMINARES	69

A. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	69
A.1 RECOLECCION	69
A.2 SELECCIÓN	69
A.3 SECADO	69
B. DETERMINACION DE LA HUMEDAD	69
C. OBTENCION DEL EXTRACTO METANOLICO Y PORCENTAJE DE	70
D. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	70
E. ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO	71
3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA MEDIR EL EFECTO SOBRE LA RESPUESTA ALERGICA	72
A. EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL EXTRACTO DE EXTRACTO	72
A.1 MODELO IN VIVO DE INFLAMACIÓN ALÉRGICA	72
A.1.1 INMUNIZACIÓN DE LOS ANIMALES Y TRATAMIENTOS	72
A.1.2 EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA	73
A.1.3 REACCIÓN CUTÁNEA INDUCIDA POR HISTAMINA EN RATAS ALBINAS	73
A.1.4 ENSAYO PARA DETERMINAR IgE ESPECÍFICA	74
A.1.4.1 TRATAMIENTOS Y OBTENCIÓN DEL ANTISUERO DE LOS RATONES	74
A.1.4.2 PRUEBA DE ANAFILAXIA PASIVA CUTÁNEA PARA DETERMINAR IGE ESPECÍFICA	75

#### **CAPITULO IV**

4. RESULTADOS: ANALISIS Y DISCUSION	77
4.1. DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES	77
4.1.1. PORCENTAJE DE HUMEDAD	77
4.1.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO	77
4.1.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD	78
4.1.4. ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO	79
4.2 DE LA EVALUACION DEL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA	80
4.3 DE LA EVALUACION DE LA REACCION CUTANEA INDUCIDA POR HISTAMINA	83
4.4 DEL ENSAYO PARA LA DETERMINACION DE LA IgE ESPECIFICA	86
4.4.1 PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCION DE 1/64	86
4.4.2 PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCION DE 1/128	88
4.4.3 PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCION DE 1/256	90
4.4. PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCION DE 1/512	92
4.5 DE LA DETERMINACION TOXICIDAD AGUDA DL <sub>50</sub>	95
CONCLUSIONES	98
SUGERENCIAS	99
REFERENCIAS BIBLIOGRAFIAS	100
ANEXOS	106

## INTRODUCCION

El empleo de las plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales. Durante mucho tiempo los remedios naturales, y sobre todo las plantas medicinales, fueron el principal e incluso el único recurso de que disponía la humanidad. Esto hizo que se profundizara el conocimiento de las especies vegetales que poseen propiedades medicinales y ampliar sus experiencia en el empleo de los productos que de ella se extraen (Moscoso M. 1997)(2)

Los productos naturales han sido históricamente utilizados por el hombre para el tratamiento de diversas patologías, muchas veces sin conocer certeramente el mecanismo por el que logran ejercer determinado efecto terapéutico ni cuales son los componentes responsables de los mismos.

En nuestro país se ha fomentado y rescatado en los últimos años, por la población, el uso de las plantas medicinales con el objetivo de complementar los tratamientos convencionales de numerosas patologías. De igual forma se han estimulado las investigaciones científicas que caracterizan los mecanismos farmacológicos por los que los productos naturales contribuyen a la mejoría de diferentes enfermedades.

Algunos antecedentes para esta investigación rreportaron que la especie *Cosmos peucedanifolius* (panti) es usada en medicina Tradicional como sudorífico, expectorante y antitusígeno.

En el estudio se demuestra que el extracto metanólico de *cosmos peucedanifolius* (panti) posee propiedades inmunomoduladoras sobre la respuesta alérgica.

Con la realización del presente trabajo pretendemos revalorar el uso tradicional de la especie *Cosmos peucedanifolius* (panti) utilizada en el tratamiento de afecciones respiratorias como son la tos, la gripe etc.

# CAPITULO I

## GENERALIDADES

### 1.1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

En nuestra ciudad la población tiene como primera opción, el uso de plantas medicinales, muchas de estas no están lo suficientemente estudiadas como para indicar una terapia alternativa correcta.

La morbilidad en nuestra región por causas de influencias (gripes) viene aumentando en los últimos años.

El estudio de la inmunología es un campo amplio que abarca tanto la investigación básica como las aplicaciones clínicas, se refiere a los antígenos, anticuerpos y funciones de defensa del huésped mediadas por la inmunidad celular, en especial respecto de la inmunidad a la enfermedad, y reacciones biológica de hipersensibilidad, alergias y rechazos a tejidos extraños. (1)

El sistema inmunológico es la defensa natural del cuerpo contra las infecciones. Por medio de una serie de pasos, el cuerpo combate y destruye organismos infecciosos invasores antes de que causen daño. Cuando el sistema inmunológico está funcionando adecuadamente, otorga protección frente a infecciones que causan enfermedad.

Las alergias son una reacción anormal del sistema inmunitario a cosas que típicamente son inofensivas para la mayoría de la gente. Cuando uno es alérgico a algo, el sistema inmunitario percibe equivocadamente esa sustancia como nociva para el cuerpo. (Las sustancias que provocan reacciones alérgicas, como ciertos alimentos, el polvo, el polen de las plantas o algunos medicamentos, se denominan alérgenos.). El sistema inmunitario, en un intento de proteger al cuerpo contra algo que percibe como una amenaza, produce anticuerpos IgE contra el alérgeno. A su vez, estos anticuerpos hacen que determinadas células del cuerpo liberen ciertas sustancias químicas al torrente sanguíneo, una de las cuales es la histamina. La histamina actúa en los ojos, la nariz, la

garganta, los pulmones, la piel y/o el tubo digestivo, provocando los síntomas de la reacción alérgica. La posterior exposición a los mismos alérgenos volverá a desencadenar la misma respuesta, esto significa que, cada vez que se entre en contacto con esos alérgenos, se presentará la misma reacción alérgica.

Algunos tipos de alergias producen múltiples síntomas, y en casos raros, las reacciones alérgicas pueden ser muy graves; lo que se conoce como choque anafiláctico o reacción anafiláctica. Algunos de los síntomas de la reacción anafiláctica son dificultad para respirar y para tragar, inflamación de labios, lengua y garganta u otras partes del cuerpo, mareo y/o pérdida de la conciencia. La reacción anafiláctica suele ocurrir pocos minutos después de exponerse a una sustancia desencadenante, como el cacahuete, pero algunas reacciones pueden tardar hasta cuatro horas en aparecer. Afortunadamente, las reacciones anafilácticas no son frecuentes, y remiten si se siguen los procedimientos médicos adecuados.

Uno de los principales problemas para combatir enfermedades como estas son el Uso de los fármacos como los Antihistamínicos los cuales en su mayoría tienen diversos efectos adversos y también La FDA ha estudiado 800 de estos medicamentos que algunos padres utilizan cuando sus hijos contraen simples resfriados, algo que se ha demostrado ineficaz y que puede llegar a ser peligroso en niños.

Una revisión de la FDA sobre los expedientes de efectos secundarios presentados entre 1969 y 2006, descubrió 54 reportes de muertes de niños asociadas con descongestionantes hechos con pseudoefedrina, fenilefrina o efedrina. También encontró 69 reportes de muertes asociadas con antihistamínicos que contenían difenhidramina, clorfeniramina. La mayoría de los muertos fueron niños menores de 2 años.

La presente investigación, tiene como objetivo evaluar el efecto sobre la respuesta alérgica y la determinación de la toxicidad aguda para fomentar el uso adecuado de la especie *Cosmos peucedanifolius* (panti) como una alternativa terapéutica al alcance de toda la población de la región.

## 1.2 FORMULACION DEL PROBLEMA

¿El extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) presentará efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica en ratas y ratones albinos?

¿El extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) presentará toxicidad aguda en ratones albinos?

## 1.3 OBJETIVOS:

### 1.3.1 OBJETIVOS GENERALES

- Determinar experimentalmente el efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti).
- Determinar experimentalmente la toxicidad aguda del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) en ratones albinos por el método de Lorke.

### 1.3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la composición fitoquímica cualitativa, el porcentaje de rendimiento, porcentaje de humedad y realizar pruebas de solubilidad del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti).
- Determinar el porcentaje de inhibición de la producción de IgE Específica en la piel de ratas albinas por medición indirecta de la extravasación del colorante de Azul de Evans.
- Determinar el porcentaje de inhibición sobre la inflamación mediante el método de edema plantar inducido por ovoalbúmina.
- Determinar el porcentaje la inhibición de la reacción cutánea inducida por histamina en ratas albinas mediante la extravasación del colorante de Azul de Evans.
- Determinar la toxicidad aguda del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti).



## 1.4 JUSTIFICACION

La importancia radica en el hecho de que durante los últimos años a pesar de la existencia de medicamentos de síntesis, la humanidad se ha mostrado interesada por las especies vegetales que presentan propiedades medicinales las cuales han sido utilizadas en forma empírica desde épocas remotas.

Los desordenes de la inmunodeficiencia o enfermedades del sistema inmunológico o enfermedades inmunes implican el mal funcionamiento del sistema inmunológico, ocasionando que las infecciones se conviertan en enfermedades, que se repiten con más frecuencia y que son más fuertes

Los desordenes de la inmunodeficiencia deterioran la capacidad del sistema inmune para defender el cuerpo contra las células extranjeras o anormales que lo invaden o atacan (tal como bacterias, virus, hongos y células cancerígenas). Consecuentemente las infecciones bacterianas, virales o fungicidas y los canceres raros pueden convertirse en enfermedades crónicas o mortales.

Así mismo el presente trabajo servirá de antecedente para posteriores trabajos de investigación en los cuales se pretenda aislar el compuesto, que posea la acción Inmunomoduladora y una vez valorado, aporte en el tratamiento de las diferentes enfermedades de tipo Inmunológico como un nuevo fármaco, en la forma y cantidad adecuada y para proporcionar a la población un tratamiento natural, seguro, accesible y de bajo costo.

## 1.5 HIPOTESIS

El extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) presenta efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica en ratones y ratas albinas

El extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) no es toxico en un ensayo de toxicidad aguda (método de Lorke) realizada experimentalmente en ratones albinos.

## CAPITULO II

### MARCO TEORICO

#### 2.1 ANTECEDENTES INTERNACIONALES

**Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. (M) sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica / Dagmar García Rivera; René Delgado Hernández; Tutor: José Manuel Leiro Vidal -- Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria, 2008. -- ISBN 978-959-16-0812-3. -- 136 pág. -- Centro de Química Farmacéutica. -- Tesis (Doctor en Ciencias Farmacéuticas). (3)**

En el presente estudio se demostró que el extracto acuoso de la corteza de *Mangifera indica* posee efecto inmunomodulador sobre importantes funciones de los macrófagos y la respuesta alérgica y que la mangiferina está implicada en los efectos del extracto.

El extracto de *Mangifera indica* inhibió in vivo la quimiotaxis e in vitro la fagocitosis, la producción de óxido nítrico, el proceso de transcripción de los genes que codifican para las citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  y GM-CSF, las enzimas COX-2 y NOS-2 y el factor de transcripción nuclear NF $\kappa$ B; y estimuló la transcripción de los genes de TGF $\beta$  en macrófagos peritoneales. Por otra parte, el extracto también posee propiedades inmunomoduladoras sobre la respuesta alérgica. El extracto mostró efecto inhibitorio in vivo en un modelo de alergia inflamatoria inducida por ovoalbúmina e inhibió la proliferación linfocitaria específica al antígeno OVA en ratones inmunizados. Además inhibió la reacción cutánea inducida por histamina en ratas, la liberación de histamina de mastocitos peritoneales, la producción de IgE en ratones y la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea en ratas.

La Mangiferina tuvo efectos farmacológicos de tipo inhibitorio igual que el extracto sobre la quimiotaxis, la fagocitosis, la expresión de la NOS-2 y la COX-2 en macrófagos peritoneales.

Igualmente inhibió la proliferación linfocitaria, la reacción cutánea a la histamina, la liberación de histamina, la producción de IgE y la anafilaxia cutánea, lo que sugiere que este polifenol está implicado en los efectos

inmunomoduladoras del extracto sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica.

Los resultados de esta investigación constituyen parte de la base experimental pre clínica necesaria para la realización de ensayos clínicos controlados en inmunopatologías como la artritis reumatoide o el asma bronquial. (3)

**Evidencias preliminares de la actividad inmunomoduladora de la fracción polisacárida de origen marino pc-1** - Morris Quevedo, Humberto J.; Martínez Manrique, Clara E.; Abdala Díaz, Roberto T.; Cobas Pupo, Guillermo (4)

Se presentan los resultados preliminares obtenidos en la evaluación de las propiedades inmunomoduladoras de la fracción polisacárida PC-I, aislada a partir de cultivos en la fase estacionaria de la microalga *Porphyridium cruentum*, y administrada intraperitonealmente de forma repetitiva en dosis de 5, 25 y 50 µg a ratones de la línea Balb/c. El polisacárido en la dosis de 50 µg/raton incrementó de forma significativa ( $p < 0,05$ ) el número de células del exudado peritoneal donde se observa, además, cambios en su morfología. Los niveles de actividad de la enzima fosfatasa ácida lisosomal resultaron superiores en las 3 dosis ensayadas respecto al control (solución salina fisiológica), sugiriendo una posible estimulación de la actividad metabólica y funcional de las células del sistema fagocitario. Por otra parte, no se detectaron granulomas ni otras alteraciones macroscópicas en los sitios de inoculación y en las dosis de 5 y 50 µg/ratón se observó un ligero incremento de la masa esplénica. (4)

**Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de caléndula: propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas** – Autor: Eva María Jimenez Medina - Editorial: Universidad de Granada Granada; Mayo 2006. (5)

En este estudio se ha mostrado in vitro una actividad citostática o de inhibición del crecimiento, Así se evaluó la actividad antitumoral en una amplia variedad de líneas tumorales tanto humanas como marinas derivadas de tumores sólidos de distinta estirpe celular o de leucemias.

Respuesta inmunitaria frente a glóbulos rojos de carnero en ratas infectadas con *tripanosoma cruzi*. (5)

**tH50: un parámetro indicador de la actividad global del complemento - A. Almara, J. Valverde, L. Morisoli y R. Rasia - Departamento de patología – Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas Rosario Argentina (6)**

La actividad hemolítica del complemento fue evaluada midiendo el tiempo requerido por una suspensión estándar de eritrocitos de carnero en proceso de lisis, para alcanzar una reducción del 50 % del valor de la densidad óptica inicial de la suspensión. El tiempo así medido es un valor paramétrico denominado tH50. (6)

**Actividad antiinflamatoria de compuestos liposolubles de Zingiber officinale Roscoe frente a diferentes agentes flogísticos - Juana Tillán Capó, Yanier Núñez Figueredo, Sara Agüero Fernández y Carmen Carrillo Domínguez - Rev. Cubana Plant Med v.12 n.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2007 - Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). (7)**

Existen antecedentes del uso de un extracto oleoso con mantequilla purificada del Zingiber officinale Roscoe en el tratamiento de enfermedades alérgicas y de las vías respiratorias por parte de la población mexicana; también trabajos realizados en nuestro laboratorio demostraron un efecto protector del mismo ante el bronco espasmo inducido por histamina y en la anafilaxia pasiva cutánea experimental. Dado estos resultados se realizó la evaluación antiinflamatoria de dicho extracto en los modelos de inducción del edema plantar en rata, utilizando diferentes agentes flogísticos como dextrán, histamina, serotonina y carragenina. Las ratas fueron administradas por vía oral con el extracto oleoso de Zingiber officinale Roscoe a la dosis 6,5 mL/kg de peso corporal, una hora antes de la inducción del edema plantar, también se evaluó la ciproheptadina, difenhidramina e indometacina como controles positivos. El análisis estadístico demostró que la administración del extracto oleoso de Zingiber officinale Roscoe produce una inhibición significativa ( $p < 0,05$ ) al desarrollo del edema inducido por dextrán, histamina, serotonina y carragenina.

Palabras clave: Zingiber officinale Roscoe, modelo antiinflamatorio, agentes flogísticos, ratas, extracto oleoso. (7)

**Efecto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Tabletas sobre la anafilaxia pasiva cutánea, transmisión histaminérgica y adrenérgica** - Yanier Nuñez Figueredo, Juana Tillán Capó, Carmen Carrillo Domínguez, Rosa Menéndez Castillo y Rafael Diego León - Centro de investigación y desarrollo de medicamentos (CIDEM). UCTB control biológico - Rev. Cubana Plant Med v.11 n.3-4 Ciudad de la Habana jul.-dic. 2006 (8)

*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., más conocido en nuestro país como orégano francés, es una planta a la que se le confieren una gran cantidad de propiedades terapéuticas para el tratamiento de diferentes enfermedades dentro de las que se encuentra el asma bronquial. En el presente trabajo se realizó la evaluación de las tabletas 100 mg de *Plectranthus amboinicus* sobre la anafilaxia pasiva cutánea y la transmisión adrenérgica e histaminérgica. Como resultado final de este trabajo pudimos comprobar que *Plectranthus amboinicus* tabletas de 100 mg inhibe la anafilaxia pasiva cutánea, potencia la transmisión adrenérgica e inhibe los efectos de la histamina cuando esta interactúa con los receptores H<sub>1</sub> presentes a nivel intestinal. Podemos concluir que las tabletas de 100 mg de *Plectranthus amboinicus* podrían emplearse en el tratamiento de enfermedades alérgicas tipo I y con esto justificar el uso popular de la planta en el asma bronquial.

Palabras clave: *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., anafilaxia pasiva cutánea, transmisión adrenérgica, transmisión histaminérgica, reacciones de hipersensibilidad tipo I, asma bronquial. (8)

**Efecto de un extracto oleoso de rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (MVZ) sobre la anafilaxia pasiva cutánea y el espasmo bronquial inducido por histamina** - Lic. Yanier Núñez Figueredo, Dra. Juana Tillán Capó, Téc. Carmen Carrillo Domínguez, Dra. Odila A. Olivares Guerra y Téc. Ramona Núñez Gomero - Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) - REV CUBANA PLANT MED 2005 (9)

Para demostrar las propiedades antialérgicas conferidas al MVZ, se estudió su posible influencia sobre los mediadores anafilácticos y el espasmo bronquial inducido por histamina. En la prueba de anafilaxia pasiva cutánea se emplearon ratas Wistar machos a las cuales se les administró el MVZ a la dosis

de 6,5 mL/kg (4,8 g de ácidos grasos/kg) por vía oral durante 10 días, se empleó como control positivo ketotifeno 3 mg/kg, la intensidad de la anafilaxia se determinó cuantificando la cantidad de azul de Evans extravasado. El efecto protector del espasmo bronquial se determinó en cobayos Hartley machos, induciendo bronco constricción por administración intravenosa de histamina y determinando la presión bronquial; la dosis del producto empleada fue la misma que para el ensayo anterior. Como resultado de este trabajo se encontró que el MVZ inhibió la anafilaxia pasiva cutánea en ratas y la bronco constricción inducida por 15 µg/kg de histamina por vía endovenosa. Los resultados obtenidos sugieren que el MVZ pudiera ser efectivo en el tratamiento profiláctico de enfermedades alérgicas tipo I como el asma bronquial, lo cual justificaría su uso popular en pacientes asmáticos.

**Palabras clave:** Zingiber officinale Roscoe, MVZ, anafilaxia pasiva cutánea, espasmo bronquial, histamina. (9)

**Efecto del Extracto Acuoso Liofilizado de Boerhavia erecta L. sobre la Anafilaxia Pasiva Cutánea, Espasmo y Tonicidad Bronquial y la Musculatura Lisa Intestinal** - Yanier Nuñez Figueredo, Juana Tillán CAPÓ, Carmen Carrillo DOMÍNGUEZ, Yamilet Vega HURTADO, Marta GUERRA, Reinaldo RIVERO & Eilyn Garrigó GARCÍA - 19 de julio de 2004 - Departamento de Farmacología Experimental y Departamento de Productos Naturales. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM), Departamento de Investigaciones Biológicas. 17 N° 6208 e/ 62 y 64 Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. (10)

Con el objetivo de demostrar las propiedades antialérgicas conferidas a Boerhavia erecta L., se estudió la posible influencia de la misma sobre los mediadores anafilácticos, espasmo y tonicidad bronquial inducido por histamina y sobre la musculatura lisa intestinal en cobayos. Como resultado final de este trabajo podemos concluir que el extracto acuoso liofilizado de Boerhavia erecta L. inhibe la anafilaxia

Pasiva cutánea y el espasmo bronquial inducido por histamina. También pudimos apreciar que la dosis de 100 mg/Kg por vía intravenosa aumenta en un 46% la contracción provocada por histamina 15 µg/Kg y a concentraciones superiores a 1 mg/mL provoca contracción de la musculatura lisa intestinal. (10)

**Efecto del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo y tonicidad bronquial** - Lic. Yanier Núñez Figueredo, Lic. Pedro Barzaga Fernández, Téc. Carmen Carrillo Domínguez, Lic. Humberto Lastra Valdés, Lic. Ismael Chávez Hernández, Lic. Dianelis Fernández Mena y Téc. María Lidia González Sanabria - REV CUBANA PLANT MED 2004 - Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) (11)

Para demostrar las propiedades antialérgicas conferidas a *Ocimum tenuiflorum* L., se estudió su posible influencia sobre los mediadores anafilácticos y el espasmo bronquial inducido por histamina, así como su posible efecto bronco dilatador. En la prueba de anafilaxia pasiva cutánea se emplearon ratas Wistar machos a las cuales se les administró el extracto en dosis de 250, 500 y 1000 mg/kg por vía oral durante 10 días. Se empleó como control positivo ketotifeno 3 mg/kg, la intensidad de la anafilaxia se determinó cuantificando la cantidad de azul de Evans extravasado. El efecto bronco dilatador y protector del espasmo bronquial se determinó en cobayos Hartley machos, induciendo bronco constricción por administración intravenosa de histamina y determinando la presión bronquial. Como resultado de este trabajo se encontró que el extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. inhibió la anafilaxia pasiva cutánea y no presentó efecto protector del espasmo bronquial inducido por histamina, tampoco demostró propiedades bronco dilatadoras en el modelo farmacológico empleado.

Palabras clave: *Ocimum tenuiflorum* L., anafilaxia pasiva cutánea, actividad bronco dilatadora, espasmo bronquial. (11)

**Passive Cutaneous Anaphylaxis in the Guinea-Pig with Rabbit Antibodies against Synthetic Polypeptides (Anafilaxia Pasiva Cutánea en cuyes con anticuerpos de conejo contra polipéptidos sintéticos)** - Ben-efraim S., Fuchs S. and Sela M. Israel Institute for Biological Research, Nes Ziona, and The Weizmann Institute of Science, Rehovoth, , Israel - (Received 20th June 1963) (12)



Resumen. Las reacciones de los polipéptidos sintéticos de los anticuerpos pueden ser seguido de anafilaxia pasiva cutánea, pero no por la técnica inversa. Las reacciones fueron óptimas después de 18 horas transcurridas entre la inyección del suero y la del antígeno. Los materiales que eran no-inmunogénica en seguida la prueba de precipitación, se demostró que al ser no-inmunogénica también por la técnica de PCA. Los antisueros de polipéptido sintético diversos antígenos reacción cruzada con muchos químicamente polipéptidos relacionados. Tan poco como 0-12 ug. de anticuerpos pueden ser detectados en 1 ml. de antisueros diluidos por la técnica de PCA.(12)

**Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de la cabeza floral de *Sphaeranthus indicus* Linn** - Bafna Ar, Mishra Sh - Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering, India - 2004(13)

RESUMEN: El extracto de metanol y sus fracciones de éter de petróleo, cloroformo y metanol sobrante de las cabezas florales de *Sphaeranthus indicus* Linn demostraron su eficacia al aumentar la actividad fagocítica, el título de anticuerpos de la hemaglutinación y la hipersensibilidad de tipo retardado, mientras que sólo la fracción de metanol restante resultó activa en la normalización de los niveles de leucocitos totales en el caso de la mielosupresión inducida por ciclofosfamida en ratones. Por tanto, el presente estudio revela que el fármaco augura buenos resultados como agente inmunomodulador, al actuar como estimulante de la inmunidad celular y humoral y de la función fagocítica.

PALABRAS CLAVE: *Sphaeranthus indicus*. Actividad inmunomoduladora. Hemaglutinación. Mielosupresión. (13)

## **2.2 ANTECEDENTES DE *Cosmos peucedanifolius* (Panti)**

### **A. ANTECEDENTES ETNOFARMACOLOGICOS**

**Roersch Carlos y Van der Hoogte Liesbeth, (1988)** En su libro **“Plantas Medicinales del Sur Andino del Perú”** Reportan a la especie *Cosmos peucedanifolius*, donde indican que no hay datos farmacológicos ni toxicológicos de esta especie. Además se indica que en diferentes sitios del Perú y Bolivia la usan en medicina Tradicional como sudorífico, contra la tos y la pleuritis. (14)

**Brack Egg Antonio, (1999)** en su obra **“Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles Del Perú”**, describe el uso de las flores de la especie *Cosmos peucedanifolius* como antitusígeno, expectorante y sudorífico. (15)

**Olabazal Castillo Oscar y Mantilla Holguin Justo, (2001)** en su obra **“Pachamama Hampa Qhoranchiskuna Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra”** reportan el uso de las flores de la especie *Cosmos peucedanifolius* como expectorante y antitusígeno. (16)

**En un Libro editado por la Facultad de Ingeniería Industrial de la Universidad de Lima titulado “Industria Farmacéutica – Catalogo de Plantas Medicinales” (1994)** reporta el uso de la infusión de las flores de la especie *Cosmos peucedanifolius (Panti)* como antitusígeno, expectorante, antipirético y como agente antituberculoso. (17)

**En la redacción del Informe Nacional Para La Conferencia Técnica Internacional De La FAO Sobre Los Recursos Filogenéticos (1996)** elaborado por; **Santiago Pastor Soplín**, y su grupo de trabajo reportan el uso de las flores de la especie *Cosmos peucedanifolius* como sudorífico, y en el tratamiento del resfrío y la neumonía. (18)

**Susana Arrázola Rivero, Margoth Atahuachi, Edwin Saravia y Alvaro Lopez en su trabajo “Diversidad Florística Medicinal Y Potencial Etnofarmacológico De Las Plantas De Los Valles Secos De Cochabamba” (2002), reportan a *Cosmos peucedanifolius* como una planta utilizada para el tratamiento de enfermedades asociadas a rituales: como la maldición, espantar el rayo, susto, ritos-ceremonias, arrebató.(19)**

**Camacho Cáceres E., Soncco Acurio V. en su tesis de grado “Estudio etnobotánico, etnofarmacológico y determinación de la bioactividad de plantas medicinales más representativas de las comunidades de Ampay y Huandar del distrito de Pisac – Cusco” (2005) reportan el uso tradicional de la infusión de las flores de *cosmos peucedanifolius* como antitusígeno. Además indican que los extractos hidroalcohólicos al 40%, 60%, 70% y 90% de las flores de *Cosmos peucedanifolius*, todos presentan actividad biológica por tener valores de CL<sub>50</sub> menores de 1000 µg/ml en el ensayo de *Artemia salina*. El extracto hidroalcohólico al 70% fue el más activo con una CL<sub>50</sub> de 0.0348 µg/ml. (20)**

**Nicholas Hind, presenta la taxonomía, historia y requerimientos de cultivo para *Cosmos peucedanifolius* Wedd. Con discusiones, sinónimos, y gráficos de la presente especie. Lo presenta en el “The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew 2005” (2005) Adicionalmente reporta del uso de la infusión de esta especie en el tratamiento de la neumonía, también como antipirético y sudorífico. (21)**

## **B.ANTECEDENTES FITOQUÍMICOS**

No se encontraron reportes fitoquímicos de la especie *Cosmos peucedanifolius*. Pero se encontraron reportes de otras especies pertenecientes al mismo género, así tenemos:

**Nicola Fuzzati, Sutarjadi, Wahjo Dyatmiko, Abdul Rahman y Kurt Hostettmann en su trabajo “Phenylpropane Derivatives from roots of *Cosmos caudatus*” (1995)** reportan el aislamiento de un hidroxieugenol y cinco derivados coniferil alcohólicos de las raíces de *Cosmos caudatus*, las estructuras de los compuestos aislados fueron establecidos en base a información espectral. (22)

**Guanghou Shui, Lai Peng Leong y Shih Peng Wong en su trabajo “Rapid screening and characterisation of antioxidants of *Cosmos caudatus* using liquid chromatography coupled with mass spectrometry” (Detección rápida y caracterización de antioxidantes de *Cosmos caudatus* utilizando cromatografía líquida junto con espectrometría de masas) (2003)** reportan que *Cosmos caudatus*, tradicionalmente usada en el mejoramiento de la circulación sanguínea, presenta una capacidad antioxidante muy elevada, se identificaron mas de veinte antioxidantes y se propuso sus estructuras químicas en base a la información obtenida a partir de los ensayos a través de HPLC/MS.(23)

**Faridah Abas, Nordin H. Lajis, D.A. Israf, S. Khozirah, y. Umi Kalsom. En su trabajo “Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables” (Inhición de actividades de los Antioxidantes y óxido nítrico del seleccionado Malayo tradicional de hortalizas)(2006)** en su trabajo describen a *Cosmos caudatus* como una especie de la cual se cree promueve la formación saludable de huesos, adicionalmente se reporta que los extractos metanólicos de esta especie han sido reportadas por demostrar actividad antioxidante moderada en el ensayo enzimático de Xantina oxidasa. Finalmente concluyen que *Cosmos caudatus* es una buena fuente de compuestos con propiedades antioxidantes. (24)

Toshihiro Akihisa, Ken Yasukawa, Hirotohi Oinuma, Yoshimasa Kasahara, Sakae Yamanouchi, Michio Takido, Kunio Kumaki y Toshitake Tamur. En su trabajo "Triterpene Alcohols From The Flowers Of Compositae And Their Anti-Inflammatory Effects" (Alcoholes Triterpénicos De Las Flores de Compositae y sus efectos anti-inflamatorios) (1996) analizan quince especies de la familia compositae donde se encuentra la especie *Cosmos bipinnatus*. Los cuales fueron investigados por sus constituyentes alcohólicos triterpenicos. Se mostro un aspecto característico en las flores de estas especies por contener Helianol como el componente mayoritario predominante en las fracciones alcohólicas triterpenicas. (25)

### **C. BASES TEÓRICO CIENTÍFICA**

#### **ASPECTOS BOTÁNICOS DE LA ESPECIE EN ESTUDIO**

#### **CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA**

<b>Reyno:</b>	Vegetal
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Orden:</b>	Asterales
<b>Familia:</b>	Asteraceae
<b>Genero:</b>	Cosmos
<b>Especie:</b>	<i>Cosmos peucedanifolius</i>

#### **Sinonimias de Nombres Comunes de la Planta**

Panty, Panty-panty, para-para, O'rko.

## **D. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

### **CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y MORFOLÓGICAS DE LA FAMILIA**

Asteraceae o Asteráceas, antes llamadas Compositae o Compuestas, es una familia de plantas herbáceas anuales o perennes, que se caracterizan por agrupar las flores en una inflorescencia compuesta o capítulo, rodeadas de una o varias filas de brácteas (involucro), con receptáculo plano o convexo, rara vez cilíndrico, frecuentemente provisto de brácteas, escamas o pelos en su interior.

Las flores son pequeñas, hermafroditas o, en ocasiones, funcionalmente unisexuales o estériles; de simetría actinomorfa o zigomorfa, pentámeras; gamopétalas; cáliz nulo o formado por pelos simples, plumosos o setiformes, por escamas o por una pequeña corona membranácea; la corola puede ser tubular con 4 ó 5 lóbulos (flósculo), tubular bilabiada, o ligulada, con el tubo corto y el limbo prolongado lateralmente en una lígula con 3 o 5 dientes; androceo de 5 estambres, normalmente sinantéreo (con las anteras concrecentes); gineceo ínfero, bicarpelar, con el ovario unilocular, con 1 primordio seminal, con un estilo y con 2 estigmas. Inflorescencias en capítulo, rodeado por un involucro de brácteas; en ocasiones existen en el receptáculo escamas de naturaleza bracteal. Los capítulos a su vez pueden agruparse en inflorescencias compuestas diversas. Fruto en aquenio, a menudo coronado por el cáliz acrescente (denominado vilano, que actúa como órgano de diseminación anemocora).

Se caracterizan por tener hojas alternas, opuestas o arrosetadas, de formas muy diversas, sin estípulas. Se distinguen dos subfamilias que, a veces, son tratadas como familias independientes. La subfamilia de las asteroideas (Asteroideae), (= compuestas tubulifloras), se caracteriza por la ausencia de látex y porque, al menos unas cuantas flores, no son liguladas. La subfamilia de las cicorioideas (Cichorioideae), (= compuestas ligulifloras), se caracteriza por la presencia de látex y porque todas las flores son liguladas. Es la mayor familia de las Magnoliofitas, con unos 1.100 géneros y cerca de 20.000 especies reconocidas.

## **CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS Y MORFOLÓGICAS DEL GÉNERO.**

El Cosmos es un género de cerca de veinte especies de plantas anuales y perennes de la familia de Asterácea, incluye especies como bipinnatus (también conocido como "áster mexicano"), atrosanguineus ("cosmos del chocolate") y sulphureus del cosmos ("cosmos amarillo"). Son nativas de las Áreas del prado de los Estados Unidos y de Centroamérica meridionales.

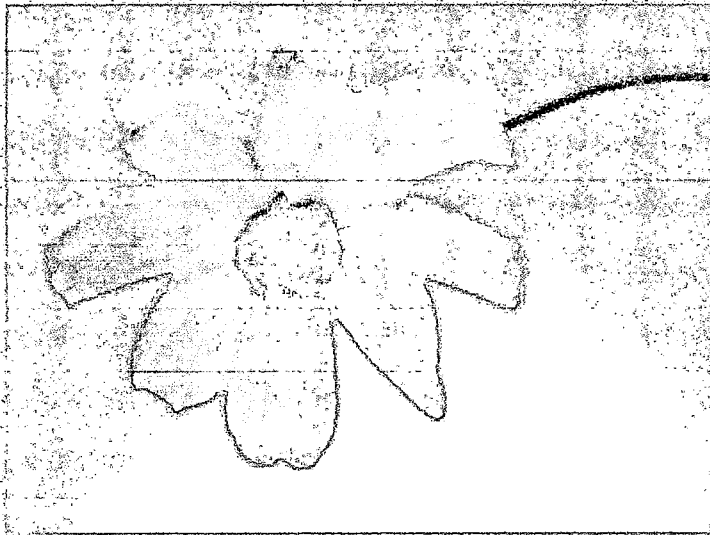
Especies más comunes:

- Cosmos atrosanguineus
- Cosmos bipinnatus
- Cosmos caudatus
- Cosmos diversifolius
- Cosmos herzogii
- Cosmos parviflorus
- Cosmos peucedanifolius
- Cosmos scabiosoides
- Cosmos sulphureus

## **E. ETNOFARMACOLOGIA - DOSIS Y USOS MEDICINALES**

El Panti es muy eficaz en el tratamiento de muchas enfermedades inmunodepresoras como por ejemplo:

- ✓ **Gripe;** para el tratamiento de esta se usan las flores estas se reposan y se toma el mate tres veces al día.
- ✓ **Tos;** para el tratamiento de esta conjuntamente con "nigro uma" se reposan las flores y se toma el mate hasta sentir mejoría en los síntomas.
- ✓ **Neumonía;** se toma el mate de planta reposada.
- ✓ **Cólicos por frío;** las flores son reposadas y se toma el mate.
- ✓ **Tos Convulsiva;** se hierven con las siguientes hiervas: "negro negro" , flor de "llaulli" e "ichu ichu" (26)



**FOTOGRAFIA Nº 2.1** Especie *Cosmos peucedanifolius* (Panti)

**FUENTE:** Fuente propia



**FOTOGRAFIA Nº 2.2** Muestra seca del material vegetal

*Cosmos peucedanifolius* (Panti)

**FUENTE:** Fuente propia



## **2.3 EL SISTEMA INMUNITARIO**

El sistema inmunitario es una red de componentes celulares y solubles que interaccionan entre sí. Su función es distinguir entidades dentro del cuerpo como "propias" o "extrañas" y eliminar las extrañas. Los microorganismos son las principales entidades extrañas, pero también son importantes las neoplasias, los trasplantes y ciertas sustancias extrañas por ejemplo: algunas toxinas. (27)

### **2.3.1 INMUNIDAD**

El concepto de inmunidad clásicamente se ha entendido como defensa contra las enfermedades infecciosas. Hoy por inmunidad entendemos el reconocimiento de lo propio y, la defensa contra lo no propio y contra aquello que siendo propio está alterada.

Los individuos se defienden de los microorganismos y sustancias extrañas mediante determinados factores como son las barreras físico-químicas, células fagocíticas, eosinófilos, células líticas naturales (NK), y una amplia serie de factores solubles, que en parte depende del propio huésped. A estas defensas, que no son específicas para cada uno de los microorganismos o sustancias extrañas (llamados antígenos), se les denomina Inmunidad Natural o Innata. Otras formas de defensa están constituidas por células especiales, llamadas linfocitos T y B, y factores solubles (en especial las inmunoglobulinas/anticuerpos) que aumentan con cada una de las exposiciones a cada uno de los antígenos. Estas respuestas son específicas para cada antígeno y a estos mecanismos de defensa se les denomina Inmunidad Adquirida o Específica.

La respuesta inmune innata amplifica la respuesta inmune adquirida, una vez que se ha entrado en contacto con el antígeno.

Si bien en la respuesta inmune que se produce en un organismo, actúan todos los mecanismos de defensa de forma coordinada, académicamente se pueden distinguir dos tipos de respuesta específica:

a) La Inmunidad humoral mediada por los anticuerpos. Estos son producidos por clones de linfocitos B específicos para cada antígeno.

b) La Inmunidad Celular mediada por linfocitos T. Cada clon de linfocitos es también específico de antígeno.

La respuesta inmune tiene varias características importantes, como son especificidad, diversidad, memoria y tolerancia.

#### - **ESPECIFICIDAD**

Cada clon de linfocitos B es capaz de responder y producir anticuerpos contra un antígeno determinado, pero no frente a otros no relacionados. Por esta razón se dice que el sistema inmune es específico.

La parte más pequeña de un antígeno a la que se une un anticuerpo se denomina determinante antigénico. Un anticuerpo producido en respuesta a un estímulo en particular, por ejemplo un virus, no reconoce toda la partícula viral, sino un determinante antigénico, por ejemplo una parte de una de sus proteínas.

#### - **DIVERSIDAD**

Se calcula que el sistema inmune es capaz de producir más de 10<sup>9</sup> tipos distintos de anticuerpos. Cada tipo es producido por un clon de linfocitos B. Este "repertorio" de anticuerpos, que se genera por un mecanismo genético complejo, servirá para reconocer y responder a la mayoría de los determinantes antigénicos a los que un individuo puede exponerse.

#### - **MEMORIA**

La primera vez que el sistema inmune específico responde contra un antígeno lo hace lentamente y con poca intensidad, quedando el Sistema Inmune preparado para exposiciones posteriores del mismo antígeno y entonces la respuesta inmune es más rápida, más intensa y más duradera, es decir es más eficiente.

La memoria inmunológica explica porqué un individuo queda protegido frente a una enfermedad, por ejemplo el sarampión, después de haber superado una primera infección o haber sido vacunado.

#### - **TOLERANCIA**

Por el mismo mecanismo por el que el sistema inmune se hace capaz de responder frente a una gran variedad de antígenos, se generan algunos linfocitos B y T que pueden reconocer componentes del propio organismo. Durante su maduración en la médula ósea o en el timo, sin embargo, estas células son eliminadas o inactivadas. Éste proceso se denomina Tolerancia: el

Sistema Inmune "aprende" a reconocer lo que es propio y a no responder agresivamente contra ello. Como consecuencia, todo lo que no sea propio lo considerará, por definición, extraño.

El mecanismo natural de la tolerancia tiene una contrapartida: los trasplantes de órganos pueden ser rechazados por el sistema inmune actuando de manera similar a como actuaría frente a agentes patógenos. (28)

## **A. PRINCIPALES MEDIADORES CELULARES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE**

### **A.1 LINFOCITOS**

Los linfocitos son importantes células sanguíneas del sistema inmune que se originan en la médula ósea. Existen distintos tipos de estas células que difieren en sus funciones y productos proteicos: linfocitos B, T y células asesinas naturales.

Los linfocitos B son las únicas células del organismo capaces de producir anticuerpos. La interacción de los antígenos con sus receptores de membrana y otras señales coestimuladoras inician la secuencia de activación, proliferación y diferenciación que culmina en el desarrollo de células plasmáticas que secretan activamente anticuerpos y de células memorias capaces de perdurar largos períodos de tiempo para enfrentar exposiciones sucesivas al mismo antígeno. (29)

Los linfocitos T terminan de madurar en el timo y se subdividen además en poblaciones funcionalmente distintas; las más estudiadas son las células T cooperadoras y las T cito tóxicas.

Las principales funciones de las células T cooperadoras son la producción de citocinas y la cooperación celular, mientras que las células T citotóxicas inducen la lisis de células infectadas y también producen citocinas. (29)

La tercera clase importante de linfocitos no expresa marcadores de células T ni B. Estos son linfocitos grandes con numerosos gránulos citoplasmáticos capaces de lisar células tumorales e infectadas por virus, conocidas como células asesinas naturales (30).

## **A.2 SISTEMA MONOCITO-MACRÓFAGO**

El sistema mononuclear fagocítico ha sido definido como un linaje de células Hematopoyéticas derivadas de progenitores en la médula ósea. El primer tipo de células que entra a la circulación sanguínea es el monocito que no está completamente diferenciado y una vez que colonizan los tejidos y maduran se convierten en macrófagos. Sus principales funciones en la inmunidad innata son la fagocitosis de partículas extrañas, la producción de citocinas necesarias para la activación de la respuesta inmune y la coestimulación a las células T para su activación. (29)

Los macrófagos son células denominadas inflamatorias pues participan en las diferentes etapas de este proceso mediante la producción de citocinas, quimiocinas, ERO y ERN, activación de enzimas y factores transcripcionales. Son células que representan el ejemplo más claro de población celular de vital importancia para la inmunidad innata que cumple funciones en la inmunidad adquirida, pues constituyen células presentadoras de antígenos (CPA) capaces de inducir coestimulación a las células T como resultados del reconocimiento antigénico a través de sus TLR (del inglés Toll like receptor). Además, las citocinas que producen contribuyen al control de la diferenciación de las células T. El desbalance en el control de las funciones de este sistema mononuclear fagocítico se relaciona con la fisiopatología de diferentes enfermedades.

## **A.3 CÉLULAS DENDRÍTICAS**

Las células dendríticas son un complejo y heterogéneo grupo multifuncional de leucocitos que se originan en la médula ósea y que constituyen en la actualidad el eje central de la respuesta inmune porque integran la información de la inmunidad innata y la expresan a las células de la inmunidad adquirida. Éstas pueden activarse por medio del reconocimiento de patrones moleculares de virus, bacterias, hongos y parásitos a través de sus TLR. Su activación es un Proceso flexible, que puede originar dos tipos de células dendríticas que secretan patrones de citocinas diferentes y activan respuestas inmunes adaptativas tipo Th1 o Th2. (31)

#### **A.4 MASTOCITOS Y BASÓFILOS**

Los mastocitos y basófilos son células originadas en la médula ósea a partir de progenitoras hematopoyéticas. Los basófilos maduran en la médula ósea y luego circulan en la sangre periférica de donde pueden ser atraídos hacia los tejidos, mientras que los mastocitos no circulan en la sangre y terminan su maduración en los tejidos vascularizados. Bajo condiciones fisiológicas, los basófilos tienen una corta vida media, apenas varios días, mientras que los mastocitos tienen una larga vida y una vez maduros, pueden proliferar bajo determinadas condiciones. Ambas son células que desempeñan un papel patológico fundamental en los procesos inflamatorios relacionados con la alergia e incluso se plantea además la contribución de los mastocitos a la autoinmunidad. (32)

Una vez inducida su desgranulación, son capaces de liberar importantes mediadores como histamina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, ERO y ERN. (33).

#### **A.5 EOSINÓFILOS**

Los eosinófilos son leucocitos granulares originados en la médula ósea que desempeñan un papel fundamental en la fase tardía de la inflamación alérgica, así como en la defensa contra parásitos. Sus membranas expresan receptores para inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas y otros factores quimiotácticos, haciéndolas sensibles a una amplia variedad de moléculas que las estimulan a secretar mediadores inflamatorios como proteínas catiónicas, leucotrienos y Citocinas. (34)

## **B. PRINCIPALES MEDIADORES MOLECULARES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA INMUNE**

### **B.1 ANTICUERPOS**

Los anticuerpos son proteínas sintetizadas exclusivamente por las células B y su capacidad de reconocimiento específico constituye una poderosa herramienta del sistema inmune. Existen cinco tipos de anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig) humanas, diferenciados por el tipo de cadena pesada en su estructura: IgM, IgD, IgA, IgG e IgE, con diversidad en sus funciones efectoras, excepto la IgD que solo participa en el reconocimiento antigénico. Las Ig participan en importantes funciones de la respuesta inmune como la activación del complemento por la vía clásica, opsonización, inducción de mecanismos de citotoxicidad, neutralización de antígenos y respuestas de hipersensibilidad (35)

La IgE es el principal anticuerpo involucrado en las respuestas alérgicas o de hipersensibilidad tipo I, tiene un peso molecular aproximado de 190 kD y a diferencia de otras Ig, no activa el complemento por la vía clásica. La IgE es termolábil, su tiempo de vida medio es de uno a cinco días en sangre periférica y su concentración en el suero es la menor de los cinco isotipos de Ig humanas. Es capaz de unirse por su porción Fc a receptores de alta afinidad denominados FcεRI, ubicados en la superficie de los mastocitos y basófilos, desencadenando la desgranulación de estas células y la liberación de importantes mediadores que activan la respuesta alérgica. (36)

### **B.2 CITOCINAS**

La comunicación entre las células del sistema inmune es fundamentalmente dependiente de proteínas de bajo peso molecular denominadas citocinas, las cuales regulan importantes procesos biológicos como el crecimiento y activación celular, la inflamación, la inmunidad, la reparación de tejidos y la fibrosis. Estas proteínas son secretadas por una gran variedad de células, incluyendo monocitos, macrófagos, granulocitos, células endoteliales, fibroblastos, células dendríticas, keratinocitos, linfocitos B y T, mastocitos, basófilos, líneas de células tumorales, entre otras .

En condiciones normales y libres de estrés, las concentraciones de citocinas son muy bajas, pero se incrementan notablemente bajo cambios

fisiopatológicos y ante el daño tisular. La secreción de citocinas por los linfocitos T y los macrófagos desempeñan un papel muy importante en la patogénesis de algunas enfermedades, por lo que la expresión y las funciones de las citocinas constituyen importantes dianas para el tratamiento de enfermedades inmunopatológicas. (37)

### **B.3 MOLÉCULAS DE ADHESIÓN**

Las moléculas de adhesión son un grupo de proteínas cuyas funciones están relacionadas con el tráfico linfocitario y agrupa a las selectinas, los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las integrinas.

Las selectinas están especializadas para interacciones de alta afinidad con sus ligandos, lo que termina con la captura y el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio vascular. En este grupo se incluyen las selectinas E, P y L, las cuales unen ligandos glicanos multivalentes expresados en numerosas proteínas de superficie y están involucradas en los eventos iniciales de la adhesión. (38)

Las integrinas son por defecto no adhesivo y solo cuando son estimuladas por sus ligandos, miembros de la familia de las Ig, se activan y participan en el rodamiento de los leucocitos sobre el endotelio. Las moléculas LFA-1 (del inglés, leukocyte function-associated antigen-1) y VLA-4 (del inglés, very late antigen) son ejemplos de integrinas, mientras que a la superfamilia de las Ig pertenecen las moléculas de adhesión intercelular uno y dos (ICAM-1 e ICAM-2, del inglés intercellular adhesion molecule) y la molécula de adhesión vascular (VCAM, del inglés vascular cellular adhesion molecule). Las interacciones entre los miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas y las integrinas son cruciales para la diapédesis de los leucocitos y su paso a través del endotelio. (39)

### **B.4 QUIMIOCINAS**

Las quimiocinas son pequeñas proteínas secretadas que regulan el tráfico leucocitario y se originan en diversos tipos celulares como macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células T, células epiteliales, keratinocitos, mastocitos entre otros, en respuesta a estímulos como citocinas y LPS. (40)

Dentro de las quimiocinas se encuentran:

RANTES recluta células T y eosinófilos, la IL-8 atrae macrófagos y neutrófilos, la eotaxina influye en el reclutamiento de eosinófilos, la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1, del inglés monocyte chemoattractant protein-1) es quimioatrayente selectiva de monocitos y la proteína inflamatoria del macrófago (MIP-1 $\beta$ , del inglés macrophage inflammatory protein) incrementa la adhesión de las células T citotóxicas a las células endoteliales.

## **B.5 HISTAMINA**

La histamina es una amina biógena con importantes efectos en la respuesta inmune, aunque participa en otras funciones no relacionadas con la inmunidad. Sus acciones biológicas están mediadas por su interacción con receptores histaminérgicos tipo uno, dos, tres, y cuatro y sus efectos en la respuesta alérgica están relacionados con su interacción con los receptores tipo uno fundamentalmente. En el sistema cardiovascular provoca dilatación de los vasos sanguíneos por interacción con sus receptores tipo uno y dos, causando disminución de la resistencia periférica total, incremento de la permeabilidad vascular y fallo en la presión sanguínea sistémica. La histamina estimula varias terminaciones nerviosas, por tanto, cuando se libera en la epidermis produce prurito y en la dermis induce dolor. (41)

La histamina modula la actividad de células inmunocompetentes como los mastocitos, basófilos y células T, contribuyendo así a la patogénesis de las enfermedades alérgicas. En mastocitos y basófilos induce la desgranulación y liberación de los mediadores preformados en los gránulos citoplasmáticos, así como la síntesis de novo mediadores que contribuyen a la respuesta alérgica. Asimismo, mejora la secreción de citocinas tipo Th2 e inhibe las de tipo Th1.



## B.6 OTROS MEDIADORES MOLECULARES RELACIONADOS CON LA RESPUESTA INMUNE

Existe otro grupo importante de ellos involucrados en la respuesta inmune, cuyas funciones principales se resumen brevemente en el siguiente cuadro.

CUADRO: 2.1

<b>Funciones de otros mediadores moleculares relacionados con la Respuesta Inmune</b>	
<b>Mediador Molecular</b>	<b>Funciones en la respuesta inmune</b>
Especies reactivas de oxígeno (ERO)	Las ERO son producidas por macrófagos, neutrofilos y otras células fagocíticas, y su función principal en la respuesta inmune es la acción microbicida contra agentes infecciosos. No obstante, ejercen funciones inmunoregulatoras como la inhibición de la proliferación de linfocitos que contribuye al estado de inmunodeficiencia que acompaña algunos procesos infecciosos y la inducción o supresión de la apoptosis en varias células del sistema inmune. Estas especies interfieren en vías de señalización intracelular pues facilitan la fosforilación de tirosinas de Stat 3 y Jak 2, activan el factor NFκB por inhibición de la degradación de IκBα e impiden por tanto la actividad transcripcional de NFκB en células T. Estimulan la síntesis de eicosanoides, fosfolipasas, factores de crecimiento y citocinas.
Prostaglandinas (PG)	Las PG inhiben la proliferación de linfocitos T y de células asesinas naturales y modulan selectivamente la síntesis de citocinas. Inhiben además la liberación de histamina mediada por IgE en mastocitos
Ciclooxigenasas (COX)	Las Cox son enzimas que participan en la respuesta inflamatoria por catalizar el primer paso en la conversión del ácido araquidónico a PG. Se han caracterizado dos isoformas de la enzima COX: una constitutiva denominada COX-1 y otra inducible conocida como COX-2. La COX-1 tiene funciones biológicas bien determinadas su activación conduce a la producción de prostaciclina I que liberada por el endotelio es antitrombogénica y cuando la secreta la mucosa gástrica tiene efecto citoprotector, mientras que la COX-2 es inducida por varios estímulos pro inflamatorios, particularmente citocinas y factores de crecimiento en el lugar de la inflamación, y produce PG relacionadas con la respuesta inflamatoria. recientemente se ha descrito una COX-3 presente en la corteza cerebral y corazón fundamentalmente, y sus actividades biológicas están relacionadas con la inducción del dolor y la fiebre

## **2.4 ENFERMEDADES POR HIPERSENSIBILIDAD**

La hipersensibilidad se refiere a los procesos patológicos que se deben a interacciones inmunitarias específicas entre los antígenos (exógenos o endógenos) y los anticuerpos humorales o los linfocitos sensibilizados. Esta definición excluye a aquellos trastornos en los que los anticuerpos que se detectan no tienen ningún significado fisiopatológico conocido (p. ej., el anticuerpo frente al tejido cardíaco que sigue a una cirugía cardíaca), incluso aunque su presencia pueda tener un valor diagnóstico.

Cualquier clasificación de hipersensibilidad estará demasiado simplificada. Algunas se basan en el tiempo necesario para que aparezcan los síntomas o las reacciones a las pruebas cutáneas tras la exposición a un antígeno (p. ej., hipersensibilidad inmediata y retardada), en el tipo de antígeno (p. ej., reacciones a fármacos) o en la naturaleza del órgano afectado. Además, las clasificaciones no tienen en cuenta que puede estar produciéndose más de un tipo de respuesta inmunitaria o que pueda ser necesario más de un tipo para producir una lesión inmunitaria.

### **A. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO I**

La hipersensibilidad inmediata comprende varios mecanismos efectores mediados por anticuerpos que corresponden a reacciones dependientes principalmente de IgE, una clase de inmunoglobulinas con propiedades biológicas exclusivas. Aunque Prausnitz y Küstner demostraron en 1921 la presencia de una "reagina", en las personas alérgicas, capaz de transferir la reacción jabonosa alérgica, transcurrieron 45 años hasta que Isiaca y Col, demostraron la identidad de la reagina como una nueva clase de inmunoglobulina, que recibió el nombre de IgE. Posteriormente se investigó intensamente la función de la IgE en aquellas enfermedades por hipersensibilidad inmediata.

La expresión final de la hipersensibilidad inmediata se deriva de la culminación de la siguiente secuencia de reacciones: a) exposición al antígeno(alérgeno); b) desarrollo de una respuesta de anticuerpos IgE frente al antígeno; c) unión de la IgE a los mastocitos; d) reexposición al antígeno; e) interacción del antígeno con la IgE específica unida a la membrana superficial de los mastocitos; f) liberación de potentes mediadores químicos de los

mastocitos sensibilizados; y g) acción de dichos mediadores sobre diversos órganos (40).

Los trastornos incluidos dentro de las reacciones de hipersensibilidad tipo I son las enfermedades atópicas (rinitis alérgica, conjuntivitis alérgica, dermatitis atópica y asma alérgica y algunos casos de urticaria y reacciones alimentarias GI y anafilaxia sistémica. La incidencia de asma ha aumentado de forma marcada, aunque se desconoce la causa. Recientemente, se ha observado un marcado aumento de las reacciones de tipo I relacionado con la exposición a proteínas hidrosolubles en productos que tienen látex (p. ej., guantes de goma, prótesis dentales, preservativos, tubos para catéteres de equipos respiratorios y puntas de enema con manguitos de látex hinchables), sobre todo entre el personal médico y los pacientes expuestos al látex y los niños con espina bífida y defectos congénitos urogenitales. Reacciones frecuentes al látex son la urticaria, el angioedema, la conjuntivitis, la rinitis, el broncoespasmo y la anafilaxia.

Como regla, los pacientes con enfermedades atópicas (incluida la dermatitis atópica) tienen una predisposición heredada a desarrollar hipersensibilidad mediada por IgE a sustancias inhaladas e ingeridas (alérgenos) que no son perjudiciales para las personas no atópicas. Excepto en la dermatitis atópica, los anticuerpos IgE suelen mediar la hipersensibilidad. Aunque la alergia alimentaria mediada por IgE puede contribuir a los síntomas de la dermatitis atópica en los lactantes y niños pequeños, ésta es en gran medida independiente de factores alérgicos en los niños mayores y los adultos, incluso aunque la mayoría de los pacientes continúen teniendo alergias específicas.

## **B. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO II**

Ejemplos clínicos de lesión celular en los que el anticuerpo reacciona con componentes antigénicos de una célula son las anemias hemolíticas con prueba de Coombs positiva, la púrpura trombocitopénica inducida por anticuerpos, la leucopenia, el pénfigo, el penfigoide, el síndrome de Goodpasture y la anemia perniciosa. Estas reacciones se producen en pacientes que reciben transfusiones incompatibles, en la enfermedad hemolítica del recién nacido y en la trombocitopenia neonatal, y también

pueden formar parte de enfermedades por hipersensibilidad multisistémica (LES). Para una exposición de los efectos renales.

El mecanismo de la lesión se ve mejor por el efecto sobre los hematíes. En las anemias hemolíticas, los hematíes son destruidos por la hemólisis intravascular o por la fagocitosis por los macrófagos, sobre todo en el bazo. Los estudios in vitro han demostrado que en presencia de complemento, algunos anticuerpos fijadores del complemento (los anticuerpos de los grupos sanguíneos anti-A y anti-B) causan hemólisis rápida; otros (los anti-LE) causan una lisis lenta de las células; todavía otros no lesionan las células directamente, sino que hacen que se adhieran a los fagocitos y éstos las destruyen. Por el contrario, los anticuerpos Rh sobre los hematíes no activan el complemento y destruyen las células sobre todo por fagocitosis extravascular.

Ejemplos en los que el antígeno es un componente del tejido son el rechazo del injerto agudo precoz (hiperagudo) de un riñón trasplantado que se debe a la presencia de anticuerpos frente al endotelio vascular y el síndrome de Goodpasture, debido a la reacción del anticuerpo con el endotelio de la membrana basal glomerular y alveolar. En el síndrome de Goodpasture experimental, el complemento es un mediador importante de la lesión, pero en el rechazo del injerto agudo precoz no se ha determinado claramente el papel del complemento.

Ejemplos de reacciones debidas a una conjugación hapténica con células o tejido son muchas reacciones de hipersensibilidad a fármacos (la anemia hemolítica inducida por la penicilina, Hipersensibilidad a fármacos, más adelante).

Las reacciones de hipersensibilidad antirreceptor alteran la función celular como resultado de la unión del anticuerpo a los receptores de membranas. En muchas enfermedades (miastenia grave, enfermedad de Graves, diabetes resistente a la insulina) se han descrito anticuerpos frente a los receptores de la membrana celular. En modelos animales de miastenia grave, la producción de anticuerpos por inmunización frente al receptor de la acetilcolina dio lugar a la fatiga muscular y la debilidad típicas observadas en los seres humanos. En estos últimos, este anticuerpo también se demuestra en el suero y sobre las membranas musculares. Además, cuando se transfunde suero o la fracción IgG de pacientes con miastenia grave a primates no humanos, se produce un

síndrome miasténico autolimitado. Este anticuerpo impide la unión de la acetilcolina endógena con su receptor, inhibiendo de esta manera la activación muscular. En algunos pacientes diabéticos con resistencia extrema a la insulina se han demostrado anticuerpos contra los receptores de la insulina que impiden la unión de la insulina con su receptor. En los pacientes con enfermedad de Graves se ha identificado un anticuerpo contra el receptor de la hormona estimulante del tiroides (TSH) que simula el efecto de la TSH sobre su receptor y ocasiona hipertiroidismo.

Las reacciones de citotoxicidad mediadas por anticuerpos se producen cuando las células agresoras lesionan una célula cubierta de anticuerpos. Se dispone de técnicas para determinar los subgrupos de células B y T dentro de los linfocitos circulantes. Otros subgrupos no tienen marcadores de células B o T; son las denominadas células nulas e incluyen las células agresoras y las agresoras naturales. Las células agresoras se unen a células cubiertas con IgG a través de sus receptores para el Fc y son capaces de destruir la célula diana. Las células agresoras naturales no requieren el revestimiento de la célula con anticuerpos para el reconocimiento y son capaces de lisar células tumorales, células infectadas por virus y células fetales. Estos mecanismos se han demostrado en modelos animales y en estudios in vitro de hipersensibilidad, pero su papel en la enfermedad humana no se ha establecido.

### **C. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO III**

Ejemplos de estados clínicos en los que los inmunocomplejos (IC) parecen desempeñar algún papel son la enfermedad del suero debida al suero, fármacos o al antígeno de la hepatitis viral; el LES; la poliarteritis; la crioglobulinemia; la neumonitis por hipersensibilidad; la aspergilosis broncopulmonar; la glomerulonefritis aguda; la glomerulonefritis membranoproliferativa crónica, y la enfermedad renal asociada. En la aspergilosis broncopulmonar, en la enfermedad del suero inducida por fármacos o suero y en algunas formas de enfermedad renal se cree que una reacción mediada por IgE precede a la reacción del tipo III.

Los modelos de laboratorio clásicos de reacciones del tipo III son la reacción de Arthus local y la enfermedad del suero experimental. En la reacción de Arthus (de forma típica una reacción cutánea local), los animales son en principio

hiperinmunizados para inducir grandes cantidades de anticuerpos IgG circulantes y, a continuación, se les administra una pequeña cantidad de antígeno por vía intradérmica. El antígeno precipita con la IgG en exceso y activa el complemento, con lo que aparece rápidamente una reacción local dolorosa, edematosa y muy inflamatoria (durante 4-6 h), que puede progresar hacia un absceso estéril que contiene muchas células polinucleares y después hacia necrosis tisular. Puede verse una vasculitis necrosante con oclusión de la luz arteriolar. No hay ningún período de latencia previo a la reacción ya que el anticuerpo está siempre presente.

En la enfermedad del suero experimental se inyecta una gran cantidad de antígeno a un animal no inmunizado. Después de un período de latencia se producen anticuerpos; cuando el anticuerpo alcanza un nivel crítico se forman complejos antígeno-anticuerpo que se depositan en los vasos endoteliales, donde producen una lesión vascular generalizada caracterizada por la presencia de leucocitos polimorfonucleares. Cuando se produce la vasculitis, puede detectarse una reducción del complemento sérico y hallar antígeno, anticuerpo y complemento en las áreas de vasculitis. Sin embargo, los complejos antígeno-anticuerpo no son capaces de inducir la lesión por sí mismos, sino que requieren un aumento de la permeabilidad vascular, como sucede en las reacciones mediadas por IgE (tipo I) y cuando el complemento se activa para intensificar la deposición vascular del IC.

#### **D. ENFERMEDADES CON REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD TIPO IV**

Algunos trastornos clínicos en los que se consideran importantes las reacciones del tipo IV son la dermatitis por contacto, la neumonitis por hipersensibilidad, el rechazo de un alimento, los granulomas debidos a microorganismos intracelulares, algunas formas de sensibilidad a fármacos, la tiroiditis y la encefalomielititis que sigue a la vacuna de la rabia. Las pruebas en los dos últimos casos se basan en modelos experimentales y, en la enfermedad humana, en la aparición de linfocitos en el exudado inflamatorio del tiroides y del cerebro. (27)

## **2.5 ALERGIA**

El término alergia fue definido por Clemes Von Pirquet como “una capacidad alterada del cuerpo para reaccionar frente a una sustancia extraña”, definición extremadamente amplia que incluía todas las reacciones inmunológicas. La alergia se define ahora de forma mucho más restringida como “enfermedad que sigue a una respuesta del sistema inmunitario a un antígeno normalmente inocuo”. La Alergia pertenece a las llamadas reacciones de hipersensibilidad; estas son respuestas inmunitarias dañinas que producen lesiones en los tejidos y pueden provocar enfermedades graves. La Alergia se considera a menudo equivalente a la hipersensibilidad de tipo I (reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato mediadas por IgE) (42)

## **2.6 PRODUCCION DE IgE**

La IgE difiere de otros isotipos de anticuerpo en que esta localizada de forma predominante en los tejidos, donde se halla unida a los mastocitos por receptores, lo cual provoca la liberación de mediadores por parte de los mastocitos, que podrían conducir al desarrollo de una reacción de hipersensibilidad tipo I. Los basófilos y eosinófilos activados también expresan FcεRI, y por tanto pueden desplegar IgE unida a su superficie y participar también en la producción de reacciones de hipersensibilidad de tipo I. Los factores que conducen a la respuesta de anticuerpos dominada por IgE están siendo todavía estudiados (42)

En condiciones normales, constituye menos del 0.001% de todas las inmunoglobulinas circulantes, siendo sus síntesis diarias aproximadas de 0.002 mg/Kg de peso. Tiene una concentración media en suero entre 0.1 y 0.4 ug/ml, aunque en condiciones patológicas pueden llegar a alcanzar niveles superiores a 1.000 ug/ml. Posee una vida media en el suero de dos días, pero una vez que se une a sus receptores en mastocitos y basófilos es estable y mantiene sensibilizadas a las células hasta doce semanas (43)

El IgE es el isotipo de inmunoglobulina que contiene la cadena pesada, En el hombre, existe un solo gen funcional localizado en el segundo grupo de genes de cadena pesada de las inmunoglobulinas en el cromosoma 14, aunque existe

un seudogen en el primer grupo. Sin embargo, actualmente se considera que al IgE esta compuesta por una familia de proteínas generadas por procesamiento (mas conocido por el termino anglosajón "splicing"), La IgE es de hecho una familia de proteínas relacionadas, algunos de cuyos proteínas circulantes e inmunoglobulinas citofilicas. No se conoce si las isoformas circulantes difieren en su capacidad de llevar a cabo su función IgE a través de la unión a sus receptores, pero es probable que tengan distintas características, al menos en lo que se refiere a su interacción con los receptores (43)

**CUADRO: 2.2**

<b>REACCIONES ALERGICAS MEDIADAS POR IgE</b>			
<b>SINDROME</b>	<b>ALERGENOS COMUNES</b>	<b>VIA DE ENTRADA</b>	<b>RESPUESTA</b>
<b>Anafilaxia sistémica</b>	Fármacos Suero Venenos	Intravenosa (directamente tras absorción) o rápida	Edema Permeabilidad vascular aumentada Oclusión traqueal Colapso circulatorio Muerte
<b>Urticaria aguda (roncha y enrojecimiento)</b>	Picaduras de insectos , Pruebas de alergia	Subcutánea	Aumento local del flujo sanguíneo y permeabilidad vascular
<b>Rinitis alérgica (fiebre del heno)</b>	Pólenes (malas hierbas, alfalfa, abedul), Heces del ácaro del polvo	Inhalado	Edema de la mucosa nasal Irritación de la mucosa nasal
<b>Asma</b>	Pólenes , Heces del ácaro del polvo	Por inhalación	Constricción bronquial Producción de moco aumentada Inflamación de las vías aéreas
<b>Alergia alimentaria</b>	Marisco Leche Huevos Pescado Trigo	Oral	Vómitos Diarrea Prurito (picor) Urticaria (ronchas) Anafilaxia (raramente)

**FUENTE: (42)**



## **A. REGULACION DE LA SÍNTESIS DE IgE**

Hay una diferencia crítica entre los individuos atópicos y los normales. Los primeros producen niveles de IgE en respuesta de alérgenos, mientras que los últimos sintetizan otros isotopos de Ig como IgM e IgG, y en cantidades muy pequeñas de IgE. Hay tres factores interactuantes que contribuyen a regular la síntesis de IgE: factores Genéticos, La Naturaleza del alérgeno y la historia natural de exposición al mismo, y las células T cooperadoras (helper) y sus citocinas.

**B. FACTORES GENETICOS.-** A menudo en determinadas familias pueden correlacionarse niveles anormalmente altos de síntesis de IgE y atipia asociada. Aunque el patrón completo de herencia es probablemente multigenico, los estudios familiares muestran que hay una clara transmisión autosómica de la atipia. Así, cuando ambos padres son alérgicos, hay un 50% de probabilidad de que un hijo sea también alérgico; cuando solo uno de los progenitores es alérgico, la probabilidad que uno de los hijos muestre alguna clase de reacción de tipo I es del 30 %. Sin embargo, el órgano diana de las enfermedades atópicas es variable. Así la fiebre del Heno, el Asma, eccema y alergia alimentaria pueden estar presentes en varios grados en diferentes miembros de la misma familia, pero todos mostraran niveles séricos de IgE más altos que la media.

## **C. NATURALEZA DEL ALÉRGENO Y LA HISTORIA NATURAL DE LA EXPOSICIÓN AL MISMO.-**

El término alérgeno se refiere específicamente a aquellos antígenos que son capaces de estimular respuestas de hipersensibilidad inmediata en individuos alérgicos. Por lo general con proteínas o productos químicos unidos a proteínas, con un peso molecular entre 15 y 40 KDa. No se sabe porque algunos antígenos provocan fuertes respuestas alérgicas mientras que otros son raramente alergénicos. Parece que la "alergenicidad" es consecuencia de una serie compleja de interacciones que implican no solo al alérgeno, sino también la dosis, la ruta de sensibilización, y, muy importante, la constitución genética del receptor.

En general, es necesaria una exposición repetida a un antígeno particular para desarrollar una reacción atópica frente a ese antígeno. Según las distintas vías de penetración, los alérgenos pueden clasificarse en inhalantes, alimentarios, contactantes, medicamentosos, etc. Dentro de cada grupo hay algunos que son

más agresivos que otros. Entre los inhalantes, los más agresivos son los pólenes, los Hongos los ácaros, etc. De entre los alimentos, los más alergénicos son determinadas proteínas de la leche, huevos y pescados. Algunos medicamentos, como penicilina y salicilatos, provocan también respuestas alérgicas, ya sea por vía oral, parenteral o por contacto.

**D. CÉLULAS T HELPER Y CITOCINAS.-** Parece estar regulada por niveles relativos de las subclases de células helper TH1 y TH2. Las citocinas secretadas por las células TH2- IL-3, IL-4, IL-5 e IL-10 – estimulan la respuesta tipo I por diferentes vías. La IL-4 es la responsable del cambio de isotipo de las células B para producir IgE y regula la expansión clonal de los linfocitos B comprometidos; Las IL-3, IL-4 e IL-10 aumentan la producción de los mastocitos y la IL-3 e IL-5 aumentan la maduración, activación y acumulación de eosinófilos.

Además, los individuos atópicos pueden contener mayor número de células TH2 alérgeno- específicas que los individuos no atópicos, y, además, secretan más IL-4 por célula. En contraste, las células TH1 pueden inhibir el cambio de isotipo y, por tanto, la respuesta tipo I a través de los efectos del interferon  $\gamma$ , que antagoniza la acción de la IL-4.

En definitiva, el balance entre IL-4 e interferon  $\gamma$  determina la cantidad de IgE producida. Dado que el interferon  $\gamma$  es secretado por las células TH1 y la IL-4 por las TH2, la actividad relativa de estas subclases de células puede repercutir en la respuesta de un individuo a un alérgeno. De acuerdo con esto, los individuos atópicos y no tópicos exhibirán respuestas tipo I cualitativamente diferentes: la respuesta en individuos atópicos implicaría a las células TH2 y resultaría en producción de IgE; en los individuos no atópicos, estarían implicadas las TH1, lo que resultaría en la producción de IgM o IgG. (43)

## **2.7 TRATAMIENTO DE LA ALERGIA**

### **A. INHIBIENDO LA PRODUCCIÓN DE IgE O LAS VÍAS EFECTORAS ACTIVADAS POR EL ENTRECRUZAMIENTO DE LA IgE DE LA SUPERFICIE CELULAR**

En la práctica clínica, se emplean por lo común dos tratamientos: la desensibilización y el bloqueo de las vías efectoras. Existen también diversas aproximaciones todavía en estado experimental. En la desensibilización, el objetivo es cambiar la respuesta de anticuerpos, pasando de una respuesta dominada por IgE a una respuesta dominada a IgG, lo cual puede evitar que el alérgeno active las vías efectoras mediadas por IgE. A los pacientes se les inyecta dosis creciente de antígeno, comenzando con cantidades pequeñas. La programación de las inyecciones parece desviar gradualmente las respuestas dominadas por IgE dirigidas por células TH2 a otra dirigida por células TH1, con la siguiente disminución de la producción de IgE. Indicios recientes muestran que la desensibilización también está asociada a una reducción en el número de mastocitos en el punto de reacción alérgica. Este procedimiento presenta el riesgo de inducir respuestas alérgicas mediadas por IgE como complicación del tratamiento. (42)

### **B. INMUNOTERAPIA PARA LA ALERGIA**

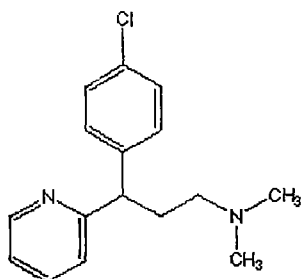
El principal tratamiento para las enfermedades atópicas como la rinitis alérgica (fiebre del heno) es bloquear la producción o liberación de mediadores (por ejemplo los corticoides o con cromoglicato) o antagonizar las acciones de los mediadores en las células diana (por ejemplo con antagonistas de los receptores de histamina o con agonistas beta adrenérgicos). Además del tratamiento dirigido a las consecuencias de la hipersensibilidad inmediata los inmunólogos clínicos a menudo tratan de limitar el comienzo de las reacciones alérgicas mediante tratamientos dirigidos a reducir la cantidad de IgE presente en el individuo. A pesar del hecho de que la regulación de la síntesis de IgE y el desarrollo de la célula T no están completamente estudiados, se han desarrollado varios tratamientos empíricos para disminuir la síntesis de IgE específica.

En uno de los abordajes llamado desensibilización se administra por vía subcutánea cantidades pequeñas, pero progresivamente crecientes, del

antígeno en un periodo de horas o más gradualmente a lo largo de semanas o meses. Como resultado de este tratamiento, disminuye los niveles de IgE específica y habitualmente se eleva los títulos de IgG, quizás inhibiendo la producción de IgE a través de la neutralización del antígeno y por retroalimentación por anticuerpos. También es posible que la desensibilización actúe induciendo a la tolerancia específica de células T, o mediante el cambio del fenotipo predominante de las células T específicas de antígeno desde el Th2 al Th1; sin embargo, existen pocos datos directos que apoyen estas hipótesis. Los efectos beneficiosos de la desensibilización pueden producirse en cuestión de horas, mucho antes que los cambios en niveles de IgE aunque se desconoce el mecanismo exacto, este método ha sido muy eficaz para prevenir respuestas anafilácticas agudas frente a antígenos proteicos (por ejm venenos de insectos) o fármacos vitales (por ejm La penicilina). Su eficacia en las enfermedades atópicas crónicas como la fiebre del heno es más variable (44).

## 2.8 FARMACOS PATRONES E INDUCTORES

### 2.8.1 CLORFENAMINA



**FIGURA Nº 2.1: ESTRUCTURA QUIMICA - CLORFENAMINA**

**FUENTE: (45)**

La clorfenamina o clorfeniramina (maleato de clorfenamina) es un compuesto químico utilizado en medicina como fármaco antihistamínico.

En cuadros alérgicos sirve para aliviar la rinitis, la rinorrea; la urticaria; el estornudo; la picazón de ojos, nariz y garganta; la comezón por picaduras de insectos, hiedra venenosa y ronchas causadas por alimentos o cosméticos.

Es un antihistamínico de primera generación, generalmente produce sueño. No debe administrarse en el embarazo ni durante la lactancia, ni a menores de seis años.

Es un derivado de la propilamina, que compite con la histamina por los receptores H<sub>1</sub>, presentes en las células efectoras; por consiguiente evitan, pero no revierten las respuestas mediadas sólo por la histamina. Las acciones antimuscarínicas producen efecto secante en la mucosa oral; atraviesa la barrera hematoencefálica y produce sedación debida a la ocupación de receptores H<sub>1</sub> cerebrales, que están implicados en el control de los estados de vigilia. Impide las respuestas a la acetilcolina mediadas por receptores muscarínicos.

Se absorbe bien tras la administración oral o parenteral. Su unión a las proteínas es de 72 por ciento. Se metaboliza en el hígado. Su vida media es de 12 a 15 horas. La duración de la acción es de 4 a 25 horas. Se elimina por vía renal.

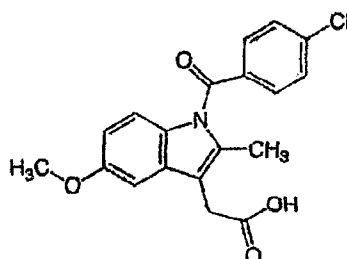
**2.8.1.1 MECANISMO DE ACCIÓN:** los antagonistas de la histamina no inhiben la secreción de histamina por los mastocitos como hacen el cromoglicato o el nedocromil, sino que compiten con la histamina en los receptores H1 del tracto digestivo, útero, grandes vasos y músculos lisos de los bronquios. El bloqueo de estos receptores suprime la formación de edema, constricción y prurito que resultan de la acción de la histamina. Un gran número de bloqueantes H1 de histamina también tienen efectos anticolinérgicos debidos a una acción antimuscarínica central. Sin embargo, los efectos anticolinérgicos de la clorfeniramina son moderados.

Los efectos sedantes de la clorfeniramina se deben a una acción sobre los receptores histamínicos del sistema nervioso central. La administración crónica de la clorfeniramina puede ocasionar una cierta tolerancia.

**2.8.1.2 FARMACOCINÉTICA:** la clorfeniramina se puede administrar oralmente, por vía subcutánea, intramuscular o intravenosamente. Por vía oral, este fármaco se absorbe bastante bien. Los alimentos retrasan su absorción, pero sin afectar la biodisponibilidad. El comienzo de la acción antialérgica de la clorfeniramina se observa a los 30-60 minutos y es máxima a las 6 horas, mientras que las concentraciones plasmáticas máximas se detectan a las 2 horas de la administración. La duración de los efectos terapéuticos oscila entre las 4 y 8 horas. La clorfeniramina se une a las proteínas del plasma en un 72%, se distribuye bien por los tejidos y fluidos del organismo, cruza la barrera placentaria y se excreta en la leche.

El fármaco se metaboliza extensa y rápidamente, primero en la misma mucosa gástrica y luego en su primer paso por el hígado: se producen varios metabolitos N-desalquilados que se eliminan en la orina conjuntamente con el fármaco sin alterar. La semi-vida plasmática es de 2 a 4 horas, si bien la semi-vida de eliminación varía según la edad de los pacientes: en los adultos sanos es de 20 a 24 horas, mientras que en los niños, se reduce a la mitad. En los pacientes con insuficiencia renal, la semi-vida de eliminación depende del grado de la insuficiencia pudiendo llegar a las 300 horas o más en los pacientes bajo hemodiálisis. La velocidad de la eliminación depende del pH y de la cantidad de orina excreta, disminuyendo cuando el pH aumenta. (45)

## 2.8.2 INDOMETACINA



**FIGURA 2.2: ESTRUCTURA QUIMICA - INDOMETACINA**

**FUENTE:** (46)

La indometacina es un medicamento del tipo antiinflamatorio no esteroideo derivado indol metilado relacionado con el diclofenaco, que inhibe la producción de prostaglandina, por lo que se indica para el alivio del dolor, fiebre y la inflamación en pacientes con osteoartritis, artritis reumatoide, dolor muscular, espondiloartropatías, osteítis deformante, dismenorrea, bursitis, tendinitis, dolor de cabeza, neuralgia y, por sus efectos antipiréticos, para el alivio de la fiebre en pacientes con cáncer maligno.

### 2.8.2.1 MECANISMO DE ACCIÓN

Indometacina unida a las dos subunidades de una molécula de ciclooxigenasa bloqueando su sitio activo.

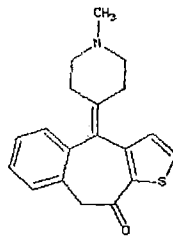
La actividad de la indometacina se logra por su capacidad para inhibir la enzima ciclooxigenasa (COX), responsable de la síntesis de prostaglandinas. EL efecto es más intenso sobre la COX-1 que sobre la COX-2, lo que explica sus efectos secundarios

### 2.8.2.2 FARMACOCINÉTICA

La indometacina se absorbe de manera rápida ( $t_{m\acute{a}x} = 2$  horas) y casi completa (90% en 4 horas) por vía oral, y se une en un 90% a las proteínas del plasma sanguíneo. Presenta un importante fenómeno de recirculación enterohepática, lo que explica la variabilidad de su vida media plasmática (1-6 horas). Por vía rectal la absorción es igualmente rápida, pero se evita el primer paso hepático y la concentración máxima alcanzada es inferior, por lo que algunas de sus reacciones adversas(dolor de cabeza, mareo, vómitos o

diarrea) pueden desaparecer al emplear esta vía. El metabolismo hepático incluye O-desmetilación (50%), N-desacilación y conjugación con ácido glucurónico (10%). El 10-20% se elimina sin metabolizar por secreción tubular activa, secreción que puede ser inhibida por probenecid. Se distribuye por todo el organismo y en el líquido sinovial alcanza concentraciones similares a las del plasma sanguíneo en 5 horas.(46)

### 2.8.3 KETOTIFENO



**FIGURA 2.3 ESTRUCTURA QUIMICA – KETOTIFENO**

**FUENTE: (47)**

El ketotifeno es un medicamento antiasmático no broncodilatador con marcadas propiedades antianafilácticas y un efecto antihistamínico específico:

- Inhibición de la respuesta broncoconstrictora aguda a PAF (factor activador de las plaquetas) y de la hiperrespuesta de la vías aéreas inducidas por PAF.
- Inhibición de la acumulación de los eosinófilos, inducida por PAF, de las vías aéreas.
- Inhibición de la liberación de mediadores químicos, tales como la histamina y la SRS-A.
- Antagonismo de la broncoconstricción aguda debida a la SRS-A.
- Reversión y prevención de la taquifilaxis a la isoprenalina inducida experimentalmente.

Por otra parte, el ketotifeno ejerce una actividad bloqueadora potente y sostenida de los receptores H<sub>1</sub>, actividad que puede ser claramente diferenciada de sus propiedades antianafilácticas.



Los experimentos de laboratorio han demostrado las propiedades del ketotifeno, tanto *in vivo* como *in vitro*, con las que contribuye a su actividad antiasmática. La frecuencia, duración e intensidad de las crisis asmáticas se reducen e incluso algunas veces las crisis desaparecen completamente. La posología de los medicamentos antiasmáticos sintomáticos puede reducirse gradualmente durante el tratamiento con ketotifeno. En los casos favorables, puede incluso renunciarse al tratamiento de apoyo.

### **2.8.3.1 MECANISMO DE ACCIÓN**

El antígeno se conjuga al anticuerpo que se fija principalmente a los mastocitos. Esta unión provoca la liberación de sustancias mediadoras, como las aminas biógenas (por ejemplo, las histaminas) y otras, de origen mastocitario. Este proceso es activado por un incremento de la penetración de calcio en las células. Por otro lado, el 3,5-AMP contenido en éstas se transforma en 5-AMP inactivo mediante la enzima fosfodiesterasa. Las sustancias mediadoras activan los receptores situados en los órganos, lo que desencadena los 3 mecanismos patológicos del sistema bronquial:

- Contracción de las fibras de la musculatura lisa, lo que conduce al broncoespasmo.
- Aumento de la permeabilidad capilar, lo que lleva a una extravasación del suero sanguíneo con formación de edema.
- Hipersecreción de las glándulas exocrinas, con discrinia.

El ketotifeno antagoniza dichos procesos de la siguiente forma: Mediante inhibición de la fosfodiesterasa y en consecuencia de un incremento en el contenido mastocitario de AMP cíclico. Por inhibición de la liberación de sustancias mediadoras. Por bloqueo de los receptores histaminérgicos.

### **2.8.3.2 FARMACOCINETICA**

**Absorción.** Tras la administración por vía oral, la absorción del ketotifeno es casi completa.

**Excreción.** Fundamentalmente es renal, alrededor del 1 % de la sustancia se excreta inalterada dentro de las 48 horas y el 60-70 % en forma de metabolitos. El metabolito principal en la orina es el ketotifeno-N-glucoronido prácticamente

inactivo. Después de la administración disminuye la radiactividad en el plasma que se efectúa en 2 fases, en la cual la más lenta tiene una vida media de 20 horas. Un porcentaje bajo (0,8 %) se elimina por la orina de forma inalterada. Del 22-27 % se elimina en forma de N-glucuroconjugado o derivado OH-N glucuroconjugado. El fenómeno inusual de acumulación o inducción enzimática se detecta en un tiempo largo.

Biodisponibilidad. Esta asciende al 50 % aproximadamente debido a un efecto de primer pasaje de alrededor del 50 % en el hígado.

Vida media plasmática. Las concentraciones plasmáticas máximas se obtienen al cabo de 2 a 4 horas. El ketotifeno se elimina bifásicamente con una corta vida media de 3 a 5 horas y una más larga de 21 horas.

Unión a proteínas plasmáticas. Se unen a las proteínas plasmáticas alrededor del 75 %. Las principales vías de biotransformación son:

- La N glucuroconjugación al grupo piperidilo.
- La reducción del grupo C=O en posición 10.
- La N demetilación.

(47)

## **2.9 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA**

Es muy necesaria que la toxicidad de un producto químico industrial, pesticida, aditivo alimenticio y producto farmacéutico sea evaluada adecuadamente para que estos sean adecuadamente manejados, transportados y usados. En particular, la información de la toxicidad aguda de un compuesto químico es requerida como uno de los criterios básicos para evaluar su seguridad. Los valores de DL50 son generalmente usados como índices de toxicidad aguda. Por ejemplo, los datos de toxicidad aguda, incluyendo los valores de DL50 en ratones, son solicitados por las autoridades regulatorias de muchos países, en lo que concierne a la registraci3n de fármacos, aditivo a alimenticios, pesticidas y sustancias químicas nuevas (48).

Sin embargo, a sido recientemente reportado que los valores de DL50 no son necesariamente requeridos para la evaluaci3n de la toxicidad aguda de las sustancias químicas por las siguientes razones. Primero, aun los valores de DL50 obtenidos sacrificando un gran número de animales varían entre laboratorios distintos. Se obtuvieron diferencias inter- laboratorios para valores de DL50 de cuatro o cinco productos químicos que variaban desde 2 veces hasta más de once veces. Por lo tanto no es necesario sacrificar tantos animales para la determinaci3n de valores de DL 50, si es imposible determinar un valor valido y reproducible de DL50. La segunda raz3n esta basada en la seguridad animal, para reducir el uso de los animales. Muchas técnicas usando otros materiales como pequeños vertebrados, invertebrados, cultivos tisulares han sido propuestos para reemplazar los test de toxicidad aguda con mamíferos, pero en la actualidad estas técnicas no son satisfactorias (48).

### **A. LA DL50 COMO CONSTANTE BIOLÓGICA**

La investigaci3n de la toxicidad aguda es el primer paso en la investigaci3n toxicológica de una sustancia desconocida. El índice de la toxicidad aguda es la DL50. Sin embargo, la DL50 no debe ser considerada como una constante biológica, debido a que se obtienen resultados distintos al realizar repeticiones o cuando las determinaciones son llevadas a cabo en diferentes laboratorios. Este hecho ya a sido muy claramente mostrado en un estudio multi- centro y llevado a cabo en la comunidad europea con cinco sustancias por Hunter y

Lingk en 1978 (49). En ese estudio los valores de DL50 variaron como se muestra en la siguiente tabla

**CUADRO: 2.3**

<b>Compuesto</b>	<b>DL50 mg/Kg</b>	<b>Radio del valor mas alto al mas pequeño</b>
<b>I</b>	46 - 522	11.3
<b>II</b>	800 - 4,150	5.2
<b>III</b>	350 - 1,280	3.7
<b>IV</b>	805 - 5,420	6.7
<b>V</b>	70 - 513	7.3

**FUENTE:** (49). Valores de DL50 de cinco compuestos estudiados por Hunter y Lingk

Otros ejemplos, que muestran que los valores de DL50 no pueden ser considerados como constantes biológicas, han sido investigados por Zbinden y Fluri-Roversi en 1981. La conclusión que debemos mencionar de estos resultados es que imposible en principio mencionar un valor de DL50 para una sustancia en cual al mismo tiempo sea valido y exacto (49). De lo anterior, es que se desprende la siguiente pregunta:

¿Por qué son tantos animales sacrificados por el único propósito de determinar el valor de DL50 con alta precisión, si es imposible en principio de determinar una DL50 valida y reproducible?

## **B. DESARROLLO HISTORICO DE LOS TEST DE DL50**

En un esfuerzo de determinar la toxicidad aguda de una sustancia, se busco un medio simple de graduar los efectos tóxicos agudos. Es así que se deseaba tener un test con cual fuera posible determinar si una sustancia química era muy toxica, toxica, poco toxica, o si los efectos tóxicos no eran significantes como para preocuparse de la sustancia en la practica. Con este objetivo es que se avizoró una figura que expresara los efectos dañinos de cualquier sustancia. Se intento con esta figura indicar la cantidad de sustancia que es injuriosa después de un modo de administración específico. Debido a que el término injuria o daño siempre envuelve un alto grado de subjetividad, se selecciono un criterio objetivo, llamado muerte. Así, se busco una manera de determinar la

probabilidad de muerte lo mas exacta posible. Es así que la DL50 fue reconocida y justificada como el mejor parámetro por Trevan (1927). Desafortunadamente esto ha conducido a describir como similares la determinación de la DL50 con la investigación de la toxicidad aguda (49).

La investigación valida científicamente la toxicidad es necesaria y de muchos puntos de vista de gran valor. Sin embargo es engañoso igualar la determinación de la toxicidad aguda con el de la DL50 a pesar de que esto generalmente ocurre. Debido a estos desacuerdos es que varios métodos estadísticos y matemáticos han sido desarrollados para estimar la DL50 y sus rangos de variación con el fin de reportar la toxicidad aguda con la mayor precisión posible justificada por métodos matemático-estadísticos. Los más empleados son el método grafico de Litchfield y Wilcoxon (1949), el método de papel cuadriculado logarítmico Probit de Millery Trainter (1934), y el procedimiento de hallazgo del intervalo o rango de Weil (1952). Todos estos métodos requieren un considerable número de animales con la finalidad de calcular una DL50, y, implícito en sus diseños matemáticos es, que usando más animales se incrementa la recisión de los datos reportados (Lorke 1983). Mas, aun si la DL50 pudiera ser medida exactamente y con reproductibilidad, el conocimiento de su valor numérico preciso seria difícilmente de importancia practica, porque la interpolación desde el animal de experimentación hacia el humano es difícilmente posible. Por otro lado, el conocimiento de los signos de intoxicación, órganos diana de toxicidad aguda, reversibilidad de las lesiones, etc., son de gran interés y esta información puede obtenida de estudios cuidadosos con un número pequeño de animales (49).

### C. EL METODO DE LORKE PARA LA DETERMINACION DE DL50

El método de Lorke describe un método para la investigación de la toxicidad aguda de una sustancia desconocida, con la determinación de la DL50. Usando este método, es posible obtener con tres animales de experimentación información adecuada de la toxicidad aguda y de la DL50. Este método no presenta limitaciones y es aplicable a fármacos y sustancias de la agricultura e industria. Este método también puede usarse por todas las vías de administración (49).

Este método propone la determinación de toxicidad aguda en dos pasos. Además esta basada en la suposición de que la sustancia química a ser investigada es completamente desconocida y que la investigación será llevada con número mínimo de animales experimentales (49).

Inicialmente es necesario determinar el rango aproximado de toxicidad aguda. Esto se logra administrando dosis diferentes al animal, por ejemplo 10, 100 y 1000 mg/Kg por vía oral. Los resultados muestran si una sustancia es muy toxica, toxica, poco toxica, o débilmente toxica. Para esta primera fase se deben utilizar tres animales por cada nivel de dosis. El resultado de esta primera etapa es utilizado para determinar las dosis subsecuentes experimentales (49).

Los siguientes postulados son hechos con respecto a los programas de administración subsecuentes:

1. Las sustancias más tóxicas que 1 mg/Kg son altamente tóxicas de tal modo que no es importante determinar la DL50 exactamente
2. Los valores de DL50 mayores a 5000 mg/Kg no son de interés práctico
3. Un valor aproximado de DL50 es usualmente adecuado para estimar el riesgo de intoxicación aguda

**CUADRO: 2.4**

<b>TOXICIDAD</b>	<b>DL50</b>
Muy toxica	Inferior o igual a 25mg/Kg
Toxica	Inferior o igual a 250mg/Kg
Poco toxica	Inferior o igual a 2000mg/Kg
Débilmente toxica	Igual o superior a 5000mg/Kg

FUENTE:(49) RANGOS DE TOXICIDAD

Basado en estas consideraciones y en experiencias prácticas se tiene la siguiente tabla, utilizada para determinar las nuevas dosis en el segundo test en el cada grupo esta formado por un único ratón

CUADRO: 2.5

TABLA PARA DETERMINAR LAS NUEVAS DOSIS EN EL SEGUNDO TEST DE LORKE							
Dosis en mg/Kg			Dosis escogidas para el segundo test				
Resultados de I investigación inicial							
10	100	1000					
0/3*	0/3	0/3		1,600	2,900	5,000	
0/3	0/3	1/3	600	1,000**	1,600	2,900	
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1,600	
0/3	0/3	3/3	140	225	370	600	
0/3	1/3	3/3	50	100**	200	400	
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160	
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60	
1/3	3/3	3/3	5	10**	20	40	
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16	
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8	

\* Numero de animales que mueren / numero de animales usados, \*\* Los resultados del primer test son considerados para estas dosis. Fuente: (49)

La DL50 se determina de la siguiente manera: se obtiene el promedio geométrico de las dosis para las cuales se encuentren 0/1 y 1/1 muertes de manera subsecuentes en la segunda prueba. Ejemplo:

CUADRO: 2.6

Determinación de la DL50 del KCN en ratas según el método de Lorke				
Sustancia	Primera Fase		Segunda Fase	
	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad	Dosis (mg/Kg)	Mortalidad
KCN	10	3/3	1	0/1
	100	3/3	2	0/1
	1000	3/3	4	0/1
			8	1/1

DL50 para el KCN =  $(4+8)/2 = 6\text{mg/Kg}$

FUENTE: (49)

## CAPITULO III

### MATERIALES Y METODOS

#### 3.1 MATERIALES

##### A. MATERIAL BOTANICO

- ✓ *Cosmos peucedanifolius* (partii)(flores) recolectada en las Alturas distrito de Písaq, provincia de Calca, Departamento del Cusco

##### B. MATERIAL BIOLÓGICO

- ✓ Ratas albinas machos especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman
- ✓ Ratones albinos machos especie *Mus musculus* Balb/c/CNPB
- Procedentes del bioterio del Instituto Nacional de Salud

##### C. MATERIALES DE VIDRIO

- ✓ Vaso de precipitado de 50,100 ml
- ✓ Probeta de 50 ml
- ✓ Probeta de 100 ml
- ✓ Tubos de ensayo de 5 ml
- ✓ Tubos de ensayo de 10 ml
- ✓ Pipeta de 1ml
- ✓ Pipeta de 5 ml
- ✓ Matraz Erlenmeyer 100 ml
- ✓ Embudo
- ✓ Baguetas
- ✓ Frascos ámbar de 100ml
- ✓ Termómetro digital (-25 a 250°C)
- ✓ Fiolas de 10, 20, 50, 100 y 200 ml
- ✓ Goteros
- ✓ Gradillas
- ✓ Soporte Universal
- ✓ Algodón



#### **D. MATERIAL DE CAMPO**

- ✓ Bolsas transparentes de polietileno
- ✓ Pico
- ✓ Cinta Masking
- ✓ Tijeras
- ✓ Plumón indeleble
- ✓ Cámara fotográfica Sony DSC-s40
- ✓ Cartón prensado
- ✓ Cuaderno de campo

#### **E. EQUIPOS**

- ✓ Balanza Mettler Toledo, Modelo:XP -105Cronometro sensible a 0.0001g.
- ✓ Baño Maria Menment (0-70°C)
- ✓ Espectrofotómetro Evolution 300 UV-Visible Spectrophotometer
- ✓ Molino de granos
- ✓ Horno esterilizador Binder APT line
- ✓ Cocinilla eléctrica
- ✓ Refrigeradora (-4°C)
- ✓ Micropipeta (10 ul – 100 ul)
- ✓ Centrifuga Modelo: eba20 Hettich con rotor de 8 plazas x15 ml.
- ✓ pHmetro: Inolab, Modelo 740
- ✓ Equipo de disección

#### **F.MATERIALES DE GABINETE**

- ✓ Papel Bond A4 marca Report de 80 g
- ✓ Impresora HP Deskjet D1360
- ✓ Computadora Pentium® 4 CPU 3.06 GHz
- ✓ Mini Usb HP 4Gb

### **3.2. REACTIVOS**

#### **A. REACTIVOS PARA LA PRUEBA DE SOLUBILIDAD**

- ✓ Metanol (QP)
- ✓ Etanol a diferentes concentraciones(QP)

- ✓ Agua destilada
- ✓ Cloroformo(QP)
- ✓ Benceno (QP)
- ✓ Acetato de etilo (QP)
- ✓ Acetona (QP)
- ✓ Hexano (QP)
- ✓ Éter etílico (QP)

## **B. REACTIVOS PARA LA MARCHA FITOQUIMICA**

- ✓ Reactivo de Dragendorff
- ✓ Reactivo de Mayer
- ✓ Amoniaco
- ✓ Acetato de plomo
- ✓ Hidroxido de sodio 1%, 5%
- ✓ Limaduras de magnesio
- ✓ Acido clorhídrico 1%, 5%, 0.5N
- ✓ Reactivo de Benedict
- ✓ Reactivo de Liebermann y Burchard
- ✓ Ninhidrina 1%
- ✓ Cloruro férrico
- ✓ Etanol 96%
- ✓ Hidróxido de potasio 2 N
- ✓ Acetato de cobre

## **C. REACTIVOS PARA LA METODOLOGÍA DE EVALUACIÓN DE EFECTO INHIBITORIO SOBRE INFLAMACION ALERGICA.**

- ✓ Histamina Difosfato x 5 g. ( Sigma)
- ✓ Albumina de Huevo Gallina Grado V x 1 g. (Sigma)
- ✓ Azul de Evans x10 g. (Sigma)
- ✓ Formamida 99% x500 ml. (Sigma)
- ✓ Disolución salina fisiológica
- ✓ Indometacina (25mg. IQ-farma)
- ✓ Ketotifeno (1mg. Farmaindustria)
- ✓ Clorfenamina (4mg.Laboratorios Naturales y Genericos-Naturgen)

- ✓ Cloroformo (QP)

### 3.3. OTROS

- ✓ Papel aluminio
- ✓ Jaulas para animales de experimentación
- ✓ Jeringas
- ✓ Sonda orogástrica
- ✓ Alimentación balanceada
- ✓ Crema Depiladora Touch me (Genoma Lab)
- ✓ Agua Destilada

### 3.4 METODOLOGÍA

#### A. NIVEL Y TIPO DE INVESTIGACIÓN

Con el objetivo de evaluar el efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (Panti) se realizó un estudio cuasi experimental de series cronológicas con repetición del estímulo y diseño con un grupo control y sin pre prueba.

Con el objetivo de demostrar la probable toxicidad aguda se usó un estudio cuasi experimental con pre – prueba y post prueba teniendo en cuenta el método de Lorke.

La investigación se realizó en los laboratorios de: Farmacodinamia, Farmacobotánica y Análisis Bioquímico Clínico de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica , el Laboratorio de Química Orgánica y el Laboratorio de Fisicoquímica de la Carrera Profesional de Química de la Universidad Nacional de San Antonio Abad del Cusco.

## B. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

### B.1 PARA LA EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA RESPUESTA ALÉRGICA DEL EXTRACTO METANOLICO DE *Cosmos peucedanifolius* (panti)

#### PARA EL MODELO IN VIVO DE INFLAMACIÓN ALÉRGICA INMUNIZACIÓN DE LOS ANIMALES

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	W
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	W
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	W
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	W
G <sub>6</sub>	---	---	---	---	---	W

#### Donde:

G<sub>1</sub>: grupo de ratones a los que se administró extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti), 1º dosis 200 mg/Kg

G<sub>2</sub>: grupo de ratones a los que se administró extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti), 2º dosis 400 mg/Kg

G<sub>3</sub>: grupo de ratones a los que se administró extracto metanólico de *Cosmos Peucedanifolius* (panti), 3º dosis 800 mg/Kg

G<sub>4</sub>: grupo de ratones a los que se administró indometacina 5mg/Kg

G<sub>5</sub>: grupo de ratones a los que se administró agua destilada

X<sub>1</sub>: 1º dosis de extracto metanólico 200 mg/Kg

X<sub>2</sub>: 2º dosis de extracto metanólico 400 mg/Kg

X<sub>3</sub>: 3º dosis de extracto metanólico 800 mg/Kg

X<sub>4</sub>: Dosis indometacina 5mg/Kg

X<sub>5</sub>: Administró Agua Destilada

W: Inmunización con ovoalbúmina 10 ug en 0.5 mL de disolución fisiológica

## B.2 PARA LA EVALUACIÓN DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA (Ovoalbúmina)

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	Z	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	Z	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	Z	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	Z	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>5</sub>	Z	O <sub>5</sub>

### Donde:

G<sub>1</sub>: grupo de ratones inmunizados con OVA y 1º extracto 200 mg/Kg

G<sub>2</sub>: grupo de ratones inmunizados con OVA y 2º extracto 400 mg/Kg

G<sub>3</sub>: grupo de ratones inmunizados con OVA y 3º extracto 800 mg/Kg

G<sub>4</sub>: grupo de ratones inmunizados con OVA y indometacina 5mg/Kg

G<sub>5</sub>: grupo de ratones inmunizados con OVA

X<sub>1</sub>: 1º dosis de extracto metanólico 200 mg/Kg

X<sub>2</sub>: 2º dosis de extracto metanólico 400 mg/Kg

X<sub>3</sub>: 3º dosis de extracto metanólico 800 mg/Kg

X<sub>4</sub>: Dosis indometacina 5mg/Kg

X<sub>5</sub>: Administro Agua destilada

Z: Administración en la Aponeurosis Plantar Derecha de cada animal 100uL de una disolución de Ova (ovoalbúmina)

O<sub>n</sub>: Observación de porcentaje de inhibición de la respuesta alérgica inflamatoria

(Comparación de volumen de las patas de los ratones albinos)

### B.3 PARA LA EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN CUTÁNEA INDUCIDA POR HISTAMINA EN RATAS ALBINAS

G <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>1</sub>	Y <sub>5</sub>	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>2</sub>	Y <sub>5</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>3</sub>	Y <sub>5</sub>	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>	O <sub>4</sub>
G <sub>5</sub>	---	---	---	---	---	Y <sub>5</sub>	O <sub>5</sub>

**Donde:**

G<sub>1</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) 200 mg/kg y disolución salina con 50 ug de histamina

G<sub>2</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) 400 mg/kg y disolución salina con 50 ug de histamina

G<sub>3</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) 800 mg/kg y disolución salina con 50 ug de histamina

G<sub>4</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró clorfenamina 3 mg/Kg y Disolución salina con 50 ug de histamina

G<sub>5</sub>: grupo de ratas albinas a las que no se les administró extracto sino solo disolución Salina con 50 ug de histamina

X<sub>1</sub>: administración del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) 200 mg/kg

X<sub>2</sub>: administración del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) 400 mg/kg

X<sub>3</sub>: administración del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) 800 mg/kg

X<sub>4</sub>: administración de clorfenamina 3 mg/kg

Y<sub>5</sub>: administración de disolución salina con 50 ug de histamina

O<sub>n</sub>: Cantidad de colorante extravasado por incremento de permeabilidad capilar

## B.4 ENSAYO PARA DETERMINAR IgE ESPECÍFICA

### B.4.1 OBTENCIÓN DE ANTISUEROS DE LOS RATONES ALBINOS

<b>G<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>Z</b>
<b>G<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>Z</b>
<b>G<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>Z</b>
<b>G<sub>4</sub></b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>Z</b>

#### Donde:

G<sub>1</sub>: grupo de ratones a los que se administró extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti), 200 mg/ kg

G<sub>2</sub>: grupo de ratones a los que se administró extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti), 400 mg/kg

G<sub>3</sub>: grupo de ratones a los que se administró Ketotifeno (3mg/Kg)

G<sub>4</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró agua

X<sub>1</sub>: dosis 200 mg/kg

X<sub>2</sub>: dosis 400 mg/kg

X<sub>3</sub>: dosis de Ketotifeno (3mg/Kg)

Z: Inmunización con ovoalbúmina

**B.4.2 PARA LA PRUEBA DE ANAFILAXIA PASIVA CUTÁNEA,  
DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA EN RATAS ALBINAS**

<b>G<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>W</b>	<b>O<sub>1</sub></b>
<b>G<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>W</b>	<b>O<sub>2</sub></b>
<b>G<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>W</b>	<b>O<sub>3</sub></b>
<b>G<sub>4</sub></b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>---</b>	<b>W</b>	<b>O<sub>4</sub></b>

**Donde:**

G<sub>1</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró diluciones seriadas de la dosis de 200 mg/kg (en volúmenes de: 1/64,1/128,1/256,1/512).

G<sub>2</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró Diluciones seriadas de la dosis de 400 mg/kg (en volúmenes de: 1/64,1/128,1/256,1/512).

G<sub>3</sub>: grupo de ratas albinas a las que se administró dilución seriada de grupo de ratones a los que se administró Ketotifeno (3mg/Kg) (en volúmenes de: 1/64,1/128,1/256,1/512).

G<sub>4</sub>: grupo de ratas albinas a las que se les administró diluciones seriadas de la administración de agua (en volúmenes de: 1/64,1/128,1/256,1/512).

X<sub>1</sub>: administración Dilución seriada del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) en dosis de 200 mg/kg

X<sub>2</sub>: administración Dilución seriada del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) en dosis de 400 mg/kg

X<sub>3</sub>: administración Dilución seriada de grupo de ratones a los que se administrará Ketotifeno (3mg/Kg)

W: Administración intravenosa de disolución de OVA al 0.1 % en colorante de azul de Evans

On: Observación de de cantidad de colorante extravasado (medida indirecta de la Cantidad de IgE presente en el antisuero evaluado)



## D. PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DL50 POR EL METODO DE LORKE

**FASE I:** los tres grupos de la pre prueba estarán formados por 3 animales de experimentación según la tabla del método de Lorke.

<b>G<sub>1</sub></b>	<b>X<sub>1</sub></b>	<b>O<sub>1</sub> O<sub>4</sub> O<sub>7</sub> O<sub>10</sub> O<sub>13</sub> O<sub>16</sub> O<sub>19</sub> O<sub>22</sub> O<sub>25</sub> O<sub>28</sub> O<sub>31</sub> O<sub>34</sub> O<sub>37</sub></b>
<b>G<sub>2</sub></b>	<b>X<sub>2</sub></b>	<b>O<sub>2</sub> O<sub>5</sub> O<sub>8</sub> O<sub>11</sub> O<sub>14</sub> O<sub>17</sub> O<sub>20</sub> O<sub>23</sub> O<sub>26</sub> O<sub>29</sub> O<sub>32</sub> O<sub>35</sub> O<sub>38</sub></b>
<b>G<sub>3</sub></b>	<b>X<sub>3</sub></b>	<b>O<sub>3</sub> O<sub>6</sub> O<sub>9</sub> O<sub>12</sub> O<sub>15</sub> O<sub>18</sub> O<sub>21</sub> O<sub>24</sub> O<sub>27</sub> O<sub>30</sub> O<sub>33</sub> O<sub>36</sub> O<sub>39</sub></b>

Donde:

**G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>:** Grupos experimentales formados por 3 ratas albinas

**X<sub>1</sub>:** Dosis de 10 mg /Kg del extracto seco

**X<sub>2</sub>:** Dosis de 100 mg /Kg del extracto seco

**X<sub>3</sub>:** Dosis de 1000 mg /Kg del extracto seco

**G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, G<sub>3</sub>:** observación de los efectos tóxicos agudos o muerte a los 5 minutos

**O<sub>4</sub>, O<sub>5</sub>, O<sub>6</sub>:** observación de los efectos tóxicos agudos o muerte a los 10 minutos

**O<sub>7</sub>, O<sub>8</sub>, O<sub>9</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a los 15 minutos

**O<sub>10</sub>, O<sub>11</sub>, O<sub>12</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a los 30 minutos

**O<sub>13</sub>, O<sub>14</sub>, O<sub>15</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a los 60 minutos

**O<sub>16</sub>, O<sub>17</sub>, O<sub>18</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a 1 hora y 30 min

**O<sub>19</sub>, O<sub>20</sub>, O<sub>21</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a las 2 horas

**O<sub>22</sub>, O<sub>23</sub>, O<sub>24</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a las 6 horas

**O<sub>25</sub>, O<sub>26</sub>, O<sub>27</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a las 24 horas

**O<sub>28</sub>, O<sub>29</sub>, O<sub>30</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a los 2 días

**O<sub>31</sub>, O<sub>32</sub>, O<sub>33</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a los 4 días

**O<sub>34</sub>, O<sub>35</sub>, O<sub>36</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a los 7 días

**O<sub>37</sub>, O<sub>38</sub>, O<sub>39</sub>:** observación de efecto toxico agudos o muerte a los 14 días

**FASE II:** Los grupos de la segunda prueba estarán formados por un único animal de experimentación. Las dosis, el número de grupos y de observaciones se determinarán con ayuda de la tabla de la FASE II y estarán en función a los resultados de la 1º FASE

### 3.5 VARIABLES

#### A. VARIABLES IMPLICADAS

##### A.1 VARIABLES INDEPENDIENTES

- Extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti)

##### A.2 VARIABLES DEPENDIENTES

- Efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica en ratones y ratas albinos
- Toxicidad aguda producida por el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti)

#### B. OPERACIONALIZACIÓN DE VARIABLES

##### B.1 Extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti)

**Definición conceptual:** Es el resultado final del proceso de extracción con metanol

**Definición operacional:**

**Indicador:** Dosis administrada.

**Naturaleza:** cuantitativa

**Medida:** Directa

**Escala:** Razón

**Expresión de variable:** Se da en mg/ kg de peso corporal

**Procedimiento de medición:** Se pesa la cantidad del extracto metanólico en mg/kg de peso de los animales de experimentación.

## **B.2 EFECTO INHIBITORIO SOBRE LA RESPUESTA ALÉRGICA DEL EXTRACTO METANÓLICO EN RATONES Y RATAS ALBINOS**

### **B.2.1 EFECTO SOBRE EL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA**

**Definición conceptual:** Inhibición de la inflamación alérgica.

**Definición operacional:**

**Indicador:** Diferencia de volumen de las patas de los ratones.

**Naturaleza:** cuantitativa

**Medida:** Directa

**Escala:** Razón

**Expresión de variable:** Se da en mililitros (ml).

**Procedimiento de medición:** Se evalúa por diferencia de volumen con ayuda de un Pletismómetro

### **B.2.2 INCREMENTO DE PERMEABILIDAD CAPILAR INDUCIDO POR HISTAMINA EN RATAS**

**Definición conceptual:** Cantidad del colorante extravasado por el incremento de la permeabilidad capilar.

**Definición operacional:**

**Indicador:** Determinación de la densidad Óptica

**Naturaleza:** cuantitativa

**Medida:** Indirecta

**Escala:** Razón

**Expresión de variable:** Densidad óptica

**Procedimiento de medición:** Se determinó la cantidad de colorante extravasado producto del incremento de permeabilidad inducido por la histamina, como la diferencia de Absorbancias entre los cuadrantes con histamina y con disolución salina en cada animal. Se calculó para cada Tratamiento el % de inhibición de la reacción cutánea inducida por histamina

### **B.2.3 EFECTO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IgE EN RATONES**

**Definición conceptual:** Producción de IgE específica en ratones

**Definición operacional:**

**Indicador:** Determinación de la densidad Óptica

**Naturaleza:** cuantitativa

**Medida:** Indirecta

**Escala:** Razón

**Expresión de variable:** Densidad óptica

**Procedimiento de medición:** La cantidad de colorante extravasado se consideró una medida indirecta de la cantidad de IgE presente en el antisuero evaluado. Se cuantifica la cantidad de colorante extravasado por extrapolación en una curva de calibración de azul de Evans (0,05-10 µg/sitio).

### **C. DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANOLICO DE *Cosmos peucedanifolius (panti)*.**

**Definición Conceptual:** Capacidad que tiene el extracto de la especie vegetal de producir efecto dañino, luego de ser administrado a los ratones albinos ocasionándoles la muerte.

**Definición operacional:**

**Indicador:** Normal, estimulación, depresión, muerte

**Naturaleza:** Cualitativa

**Medida:** Directa

**Escala:** Razón

**Expresión de variable:** Numero de ratones muertos.

**Procedimiento de medición:** Se administra la muestra problema vía Oral en los animales de experimentación y luego se realiza un proceso de observación durante 2 días describiendo cualquier signo de toxicidad en que tiempo y con que intensidad.

## **D. VARIABLES NO IMPLICADAS:**

### **D.1 VARIABLES INTERVINIENTES:**

#### **DEL ANIMAL:**

**Especie:** Ratones y Ratas albinos

**Edad del animal:** variable sujeto entre 90-120 días

**Sexo:** variable de sujeto con escala nominal: macho

**Peso:** Variable de sujeto con escala de medición ordinal

#### **DE LA PLANTA:**

**Estadio de crecimiento:** Se determinó el estado de maduración de la especie *Cosmos peucedanifolius* (Panti) mediante una inspección visual.

**Temperatura de secado:** se realizó a temperatura ambiente

## **E. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN:**

### **DE LOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Se incluyeron ratones y ratas albinas machos entre 90- 120 días de edad. Completamente sanos.

Se excluyeron ratones y ratas albinas hembras u aquellos machos que presenten alguna enfermedad de bajo peso o sobre peso.

### **DE LA ESPECIE VEGETAL**

Se incluyeron todos aquellos ejemplares con la partes florares sanas, libres de contaminación (hongos, microorganismos e insecticidas)

Se excluyeron las muestras de la especie vegetal que presentan las partes florales dañadas o contaminadas con polvo, hongos, bacterias, manchas, etc.

## **F. TECNICAS PARA EL PROCESAMIENTO Y ANÁLISIS DE DATOS**

Los resultados obtenidos, en los diferentes ensayos, se expresaron como media  $\pm$  desviación estándar. Los mismos se procesaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) y posteriormente se realizó un test de *Dunnet*.

### 3.5.1 CUADRO RESUMEN DE VARIABLES

		Indicador	Naturaleza de la Variable	Escala	Medición	Instrumento	Expresión final
<b>Variable Independiente</b>	Extracto metanólico de <i>Cosmos peucedanifolius (panti)</i>	Dosis administrada	Cuantitativa	Razón	Directa	Balanza analítica	mg/kg
<b>Variable dependiente</b>	Efecto inhibitorio sobre la repuesta alérgica del extracto metanólico de <i>Cosmos peucedanifolius (panti)</i>	Porcentaje de inhibición de la inflamación alérgica	Cuantitativa	Razón	Directa	Pletismómetro	Porcentaje de inhibición de la inflamación
		Porcentaje de inhibición de la permeabilidad capilar inducido por histamina	Cuantitativa	Razón	Indirecta	Espectrofotómetro	ug/sitio
		Porcentaje de inhibición de la producción de IgE específica	Cuantitativa	Razón	Indirecta	Espectrofotómetro	ug/sitio
	Toxicidad Aguda del Extracto metanólico de <i>Cosmos peucedanifolius (panti)</i>	Normal, Estimulación, depresión, muerte	Cuantitativa	Razón	Directa	Observación	Número de animales muertos

### 3.5.2 CUADRO RESUMEN DE VARIABLES NO IMPLICADAS

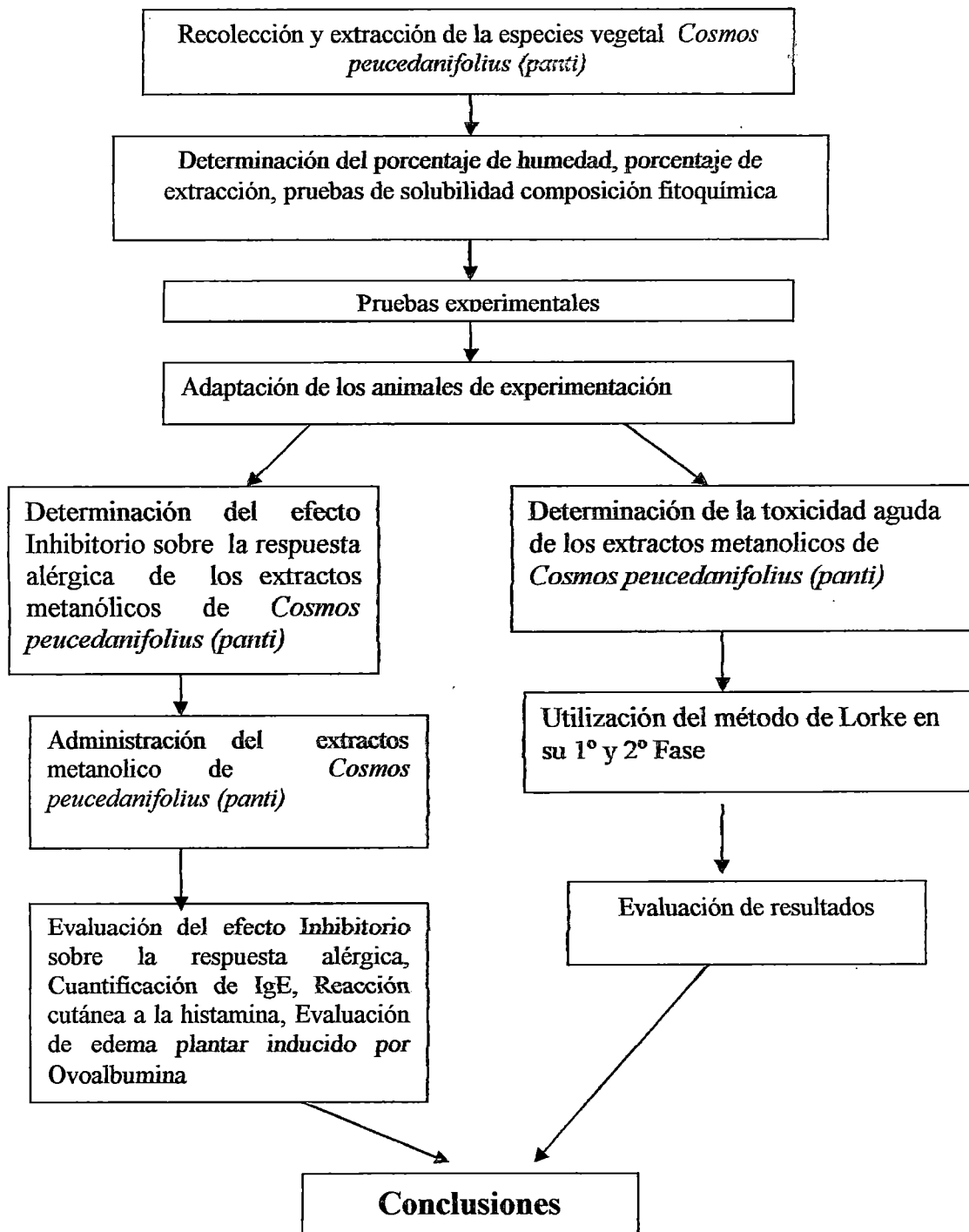
Variable no implicada	Variable interviniente	De los animales de experimentación	Especie: Ratas albinas Holtzman
			Edad el animal: 120 días
			Sexo: macho
			Peso: 230 +/- 20 g
			Especie: Ratones albinos Mus musculus Balb/c/CNPB
			Edad el animal: 120 días
			Sexo: macho
		Peso: 30 +/- 2 g	
		De la planta en Estudio	Estadio de Crecimiento
			Altitud de recolección: 3500 m.s.n.m
Temperatura de Secado: Ambiente			

### 3.5.3 CUADRO RESUMEN DE CRITERIOS DE INCLUSION Y EXCLUSION

	Criterio de Inclusión	Criterio de Exclusión
De la Planta	Se incluyeron todos aquellos ejemplares con las partes florares sanas, libres de contaminación ( hongos, microorganismos e insecticidas)	Se excluyeron las muestras de la especie vegetal que presentan las partes florales dañadas o contaminadas con polvo, hongos, bacterias, manchas, etc.
De los animales	Ratas: Se incluyeron ratas albinas macho de la raza Holtzman con una edad de 120 días con peso de 230 +/- 20g completamente sanos	Ratas: Se excluyeron a ratas albinas hembras o a aquellos machos que presentan alguna enfermedad, bajo de peso o sobrepeso
	Ratones: Se incluyeron ratones albinos machos de la raza Mus musculus con una edad de 120 días con peso de 30 +/- 2g completamente sanos	Ratones: Se excluyeron a ratones albinos hembras o aquellos machos que presentan alguna enfermedad, bajo de peso o sobrepeso



### 3.6 ESQUEMA DE PROCEDIMIENTO



### 3.7 PRUEBAS PRELIMINARES

#### A. MUESTREO Y PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

- **A.1 RECOLECCIÓN**

La especie vegetal *Cosmos peucedanifolius (panti)* se recolecto en las alturas del distrito de Písaq, provincia de Calca Departamento del Cusco en el mes de abril del 2010, en bolsas de polietileno durante las primeras horas de la mañana, agregándoles etanol para estabilizar los metabolitos secundarios.

- **A.2 SELECCIÓN**

El material de estas especies fueron cuidadosamente seleccionadas, tomando en cuenta que la planta de *Cosmos peucedanifolius (panti)* hojas, flores a utilizar se encuentren enteras y sin manchas, insectos u hongos.

- **A.3 SECADO**

Las muestras fueron sometidas a un proceso de secado sobre mallas de alambre en un área ventilada y sombreada a temperatura ambiente por un periodo de 30 días. Obtenidas las muestras secas se realizó la molienda.

#### B. DETERMINACION DE LA HUMEDAD

La determinación de la humedad se realizo por triplicado, en placas petri con muestra fresca trozada, las cuales fueron introducidas a la estufa a una temperatura de 40°C hasta conseguir un peso constante para luego determinar el porcentaje de humedad mediante la siguiente formula:

$$\%H = \frac{M1 - M2}{M1} * 100$$

Donde: %H= Porcentaje de Humedad.

M1= Peso de la muestra fresca

M2= Peso de la muestra seca

**FUENTE:**

*Cátedra de Farmacobotánica de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica UNSAAC*

*Docente: Q.F. Magaly Villena Tejada*

### C. OBTENCION DEL EXTRACTO METANOLICO Y PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

Para el proceso de extracción metanólica se utilizo las muestras secas y molidas de la especie vegetal a estudiar, las cuales se sometieron a maceración con metanol con agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se filtro hasta agotamiento, y los filtrados obtenidos fueron concentrados hasta obtener el extracto metanólico. El porcentaje de rendimiento de la especie se calculo mediante la siguiente fórmula:

$$\%E = \frac{Pf}{Pi} * 100$$

Donde: %E= Porcentaje de Extracción

Pf= Peso final (extracto metanólico)

Pi= Peso inicial (muestra molida)

#### FUENTE:

*Cátedra de Farmacobotánica de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica UNSAAC*

*Docente: Q.F. Magaly Villena Tejada*

### D. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

Para la realización de las pruebas de solubilidad, los extractos secos de la especie vegetal a estudiar se colocaron en diferentes tubos de ensayo y luego se les añadió solvente de diferente polaridad, ordenados en forma descendente, para así determinar la naturaleza disolutiva de los extractos.

**CUADRO: 3.2 Solventes para las pruebas de solubilidad**

Agua destilada	Acetona
Metanol	Cloroformo
Etanol al 40%	Éter etílico
Etanol al 50%	Benceno
Etanol al 70%	Hexano
Etanol al 90%	Éter de petróleo
Acetato de etilo	Bencina

#### FUENTE:

*Cátedra de Farmacobotanica de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica UNSAAC*

*Docente: Q.F. Magaly Villena Tejada*

## E. ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO

Para la realización de la marcha fotoquímica se utilizaron reacciones de coloración que determinaron la presencia de metabolitos secundarios en los extractos metanólicos de la especie *Cosmos peucedanifolius (panti)* como se muestra a continuación:

**CUADRO: 3.1 Pruebas de Análisis fitoquímico cualitativo**

<b>METABOLITO SECUNDARIO</b>	<b>REACTIVO</b>
Azucares reductores	Benedict
Glucosidos	Benedit
Aminoácidos	Ninhidrina
Flavonoides	Shinoda, amoniaco
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico
Alcaloides	Dragendorf, Mayer, Wagner
Saponinas	Índice Afrosimetrico
Triterpenoides	Liebermann- Buchardar
Resinas	Acetato de cobre

**FUENTE:**

*Cátedra de Farmacobotánica de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica UNSAAC*

*Docente: Q.F. Magaly Villena Tejada*

## **PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA MEDIR EL EFECTO SOBRE LA RESPUESTA ALÉRGICA**

### **A. EVALUACIÓN DEL EFECTO INHIBITORIO DEL EXTRACTO DE EXTRACTO METANÓLICO DE *Cosmos peucedanifolius* (Panti) SOBRE LA RESPUESTA ALÉRGICA**

Para estos experimentos, se utilizó ratas albinas machos especie *Rattus norvegicus* cepa Holtzman y ratones albinos machos especie *Mus musculus* Balb/c/CNPB. Los animales se colocaron en grupos de 5 en jaulas apropiadas en un local apropiado con ciclos de luz de 12 horas y temperatura de 22-24 °C, tuvieron libre acceso al agua y comida; se mantuvieron en estas condiciones una semana antes de los experimentos.

#### **A.1 MODELO IN VIVO DE INFLAMACIÓN ALÉRGICA**

##### **A.1.1 INMUNIZACIÓN DE LOS ANIMALES Y TRATAMIENTOS**

Para el desarrollo de este modelo experimental se conformaron cinco grupos experimentales de cinco ratones. Cuatro grupos se inmunizaron vía intraperitoneal siete veces en días alternos con 10 µg de OVA en 0,5 mL de disolución salina fisiológica. El grupo no inmunizado recibió inyecciones con disolución salina fisiológica. Tres semanas después de la última inmunización, comenzaron a recibir durante siete días en una administración diaria, tratamiento vía oral con el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (*panti*) (la dosis la obtuvimos después del proceso de determinación de toxicidad aguda mg/kg), Indometacina 5 mg/kg según correspondía a cada grupo. La administración oral se realizó siguiendo una relación peso volumen de 10 mL/kg de peso. El grupo control recibió agua destilada. Al término del tratamiento (cuatro semanas después de la última inmunización), se procedió a la inducción de la respuesta alérgica inflamatoria mediante el modelo de edema plantar inducido por OVA.

### A.1.2 EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA

Inicialmente comprobamos si las dosis únicas por vía oral del extracto y la Indometacina en el mismo rango de dosis y en este mismo modelo presentan o no un efecto inhibitorio significativo (datos analizados al final de la experimentación).

Por tanto, una hora después de la última administración de los productos (séptimo día de tratamiento), se administró en la aponeurosis plantar derecha de cada animal, 100  $\mu$ L de una disolución de OVA de 100  $\mu$ g/mL, lo que significó administrar 10  $\mu$ g/animal. En la aponeurosis plantar izquierda de cada animal, se administraron 100  $\mu$ L de disolución salina fisiológica. Se evaluó por diferencia de volumen con ayuda de un pletismometro (37).

**CUADRO: 3.3 GRADO DE INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN**

BAJA	15-30 %
MODERADA	31-45 %
BUENA	46-60 %
MUY BUENA	61% -MAS

FUENTE: (54)

### A.1.3 REACCIÓN CUTÁNEA INDUCIDA POR HISTAMINA EN RATAS ALBINAS

Para la evaluación del efecto sobre el incremento de permeabilidad capilar inducido en la reacción cutánea a la histamina, se conformaron cinco grupos experimentales de cinco ratas que recibieron tratamiento vía oral durante siete días en una administración diaria con el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (panti) (la dosis la obtendremos después del proceso de determinación de toxicidad aguda mg/kg), Clorfenamina (3 mg/kg) según correspondía. La administración oral se realizó siguiendo una relación peso volumen de 10 ml/kg de peso.

Transcurridas diez horas de la última administración, las ratas se depilaron en la región dorsal donde se dibujaron seis cuadrantes de 1 x 1 cm. Seguidamente se administró vía endovenosa un mL de Azul de Evans (20 mg/kg) e inmediatamente después se inyectaron intradérmica 100  $\mu$ L de disolución

salina con 50 µg de difosfato de histamina (Sigma) en cuatro de los cuadrantes. En los dos cuadrantes restantes se inyectaron 100 µL de disolución salina fisiológica. Después de treinta minutos de la administración de la histamina se sacrificaron los animales, se recortaron las porciones de piel y se colocaron en tubos de ensayo con dos mL de formamida, los cuales se incubaron a 37°C durante 48 horas y se determinó la densidad óptica del colorante extravasado en un espectrofotómetro a 623 nm (38).

Se determino la cantidad de colorante extravasado producto del incremento de permeabilidad inducido por la histamina, como la diferencia de absorbancia entre los cuadrantes con histamina y con disolución salina en cada animal. Se calculó para cada tratamiento el % de inhibición de la reacción cutánea inducida por histamina.

**CUADRO: 3.4 GRADO DE INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN CUTANEA INDUCIDA POR HISTAMINA**

BAJA	15-35 %
MODERADA	35-59 %
BUENA	60-79 %
MUY BUENA	80% -MAS

**FUENTE: (3)**

#### **A.1.4 ENSAYO PARA DETERMINAR IgE ESPECÍFICA**

##### **A.1.4.1 TRATAMIENTOS Y OBTENCIÓN DEL ANTISUERO DE LOS RATONES**

Para esta evaluación se conformaron cuatro grupos experimentales de cuatro ratones albinos, los cuales se inmunizaron por vía intraperitoneal con ovoalbúmina (OVA, Sigma) preparada en una disolución inmunizante reportada por Ovary en 1986. Después de la inmunización y diariamente durante 21 días, los ratones recibieron tratamiento vía oral una vez al día con el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)* (la dosis la obtendremos después del proceso de determinación de toxicidad aguda mg/kg), Ketotifeno (3 mg/kg) según corresponda.

El grupo control recibió agua destilada. La administración oral se realiza siguiendo una relación peso volumen de 10 mL/kg de peso. A los siete días se re inmunizaron los animales de forma similar a la primera inmunización. Transcurridos 21 días de la primera inmunización, se realizó una extracción de sangre mediante punción cardiaca de los ratones. La sangre se depositó en tubos de ensayo, la cual se centrifugó a 2500 rpm por 10 min para la obtención del antisuero.

#### **A.1.4.2 PRUEBA DE ANAFILAXIA PASIVA CUTÁNEA PARA DETERMINAR IgE ESPECÍFICA**

Para estimar los niveles de IgE específica en el suero de los ratones inmunizados con OVA, se realizaron pruebas de anafilaxia pasiva cutánea en ratas albinas con el antisuero obtenido en ratones inmunizados con OVA y tratados con el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)* y Ketotifeno.

En la prueba de APC se evaluaron cuatro diluciones seriadas (1/64, 1/128, 1/256 y 1/512) de los antisueros de ratón obtenidos como se describió en el anterior paso. Las ratas se depilaron en la región dorsal 24 horas antes de comenzar el experimento y se sensibilizaron por administración intradérmica de 100 µL de las diferentes diluciones del antisuero de ratón correspondiente en Disolución Salina en Tampón Fosfato (DSTF). En cada rata, se inyectan dos réplicas a ambos lados de la línea media del lomo de cada dilución del antisuero del grupo control y dos réplicas de cada dilución del antisuero de un grupo con tratamiento. Para la evaluación del antisuero de cada grupo se utilizaron cinco ratas.

Transcurridas 48 horas de la sensibilización se provocó la reacción anafiláctica por administración intravenosa de un mL de una disolución de OVA al 0,1 % en colorante azul de Evans 1 % en disolución salina fisiológica. Treinta minutos después, los animales se sacrificaron en atmósfera de cloroformo y se recortó la zona dorsal de la piel. Posteriormente, se cortó en círculo la porción de la piel correspondiente a cada mancha y se colocó en un tubo de ensayo con dos mL de formamida. Los tubos se incubaron a 37°C durante 48 horas y se determinó la densidad óptica del colorante extravasado en un



espectrofotómetro a 623 nm. La cantidad de colorante extravasado se consideró una medida indirecta de la cantidad de IgE presente en el antisuero evaluado. Se cuantifica la cantidad de colorante extravasado por extrapolación en una curva de calibración de azul de Evans (0,05-10 µg/mL).

**CUADRO: 3.5 GRADO DE INHIBICION DE LA ANAFILAXIA PASIVA CUTANEA**

BAJA	15-25 %
MODERADA	25-39 %
BUENA	40-65 %
MUY BUENA	65% -MAS

**FUENTE: (3)**

## CAPITULO IV

### RESULTADOS: ANALISIS Y DISCUSION

#### 4.1. DE LAS PRUEBAS PRELIMINARES

##### 4.1.1. PORCENTAJE DE HUMEDAD

CUADRO N° 4.1

	1º MUESTRA	2º MUESTRA	3º MUESTRA
Peso Muestra Fresca (g)	10.00 g	10.00 g	10.00 g
Peso Muestra seca (g)	4.15 g	4.17 g	4.18 g
Porcentaje de Humedad (%)	5.85 %	5.83 %	5.82 %
Promedio % de humedad	58.33 %		

FUENTE: Datos Experimentales

#### ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

El porcentaje de humedad de *Cosmos peucedanifolius* (panti) fue en promedio 58.33% de acuerdo al método gravimétrico, las pruebas se realizaron por triplicado. Este porcentaje tiene una gran importancia ya que nos indica una humedad intermedia en comparación con otros estudios y es importante el secado porque se interrumpen los procesos de degradación de metabolitos causados por enzimas, bacterias, hongos o reacciones de oxidación e hidrólisis.

##### 4.1.2. PORCENTAJE DE RENDIMIENTO

CUADRO N° 4.2

Peso inicial muestra molida (g)	150 g
Peso final extracto metanolito al dia15 (g)	25 g
Porcentaje de extracción (%)	16.67 %

FUENTE: Datos Experimentales

#### ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN:

El cuadro 4.2 muestra el porcentaje de rendimiento de *Cosmos peucedanifolius* (panti)" observándose que este presenta un porcentaje de rendimiento de 16.67% siendo un porcentaje bueno.

### 4.1.3. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD

CUADRO Nº 4.3

Solvente	TEMPERATURA (T°) AMBIENTE	TEMPERATURA (T°) 37 °C
Agua destilada	++++	++++
Metanol	++++	++++
Etanol 40%	+++-	+++-
Etanol 50%	+++-	+++-
Etanol 70%	+++-	++++
Etanol 90%	+++-	+++-
Acetato de etilo	++--	++--
Acetona	++++	++++
Cloroformo	++--	+++-
Hexano	+---	+---

FUENTE: *datos experimentales*

Leyenda: +++++ : Totalmente soluble  
+++ - : parcialmente soluble  
++ - : poco soluble  
+ - - : muy poco soluble  
- - - : insoluble

### ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

Para la determinación de la solubilidad del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius*, se utilizaron solventes de polaridad decreciente que permitieron deducir la presencia de los grupos de metabolitos secundarios en el extracto. El extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* es totalmente soluble en agua, metanol, etanol 70% y acetona, parcialmente soluble en etanol 40%, 50% y 90% y cloroformo poco soluble en acetato de etilo y muy poco soluble en hexano.

#### 4.1.4. ANALISIS FITOQUIMICO CUALITATIVO

CUADRO N° 4.4

Metabolito secundario	Reactivo	Muestra
Azucares reductores y glucósidos	Benedict	+++
Aminoácidos	Ninhidrina	+++
Compuestos fenólicos	Cloruro férrico	---
Flavonoides	Shinoda	++-
Alcaloides	Dragendorff	++-
Saponinas	Afrosimetrico	---
Triterpenoides y esteroides	Lieberman-Burchard	+--

FUENTE: datos experimentales

Leyenda:       +++ : abundante cantidad  
                  ++- : moderada cantidad  
                  +-- : escasa cantidad  
                  --- : ausencia

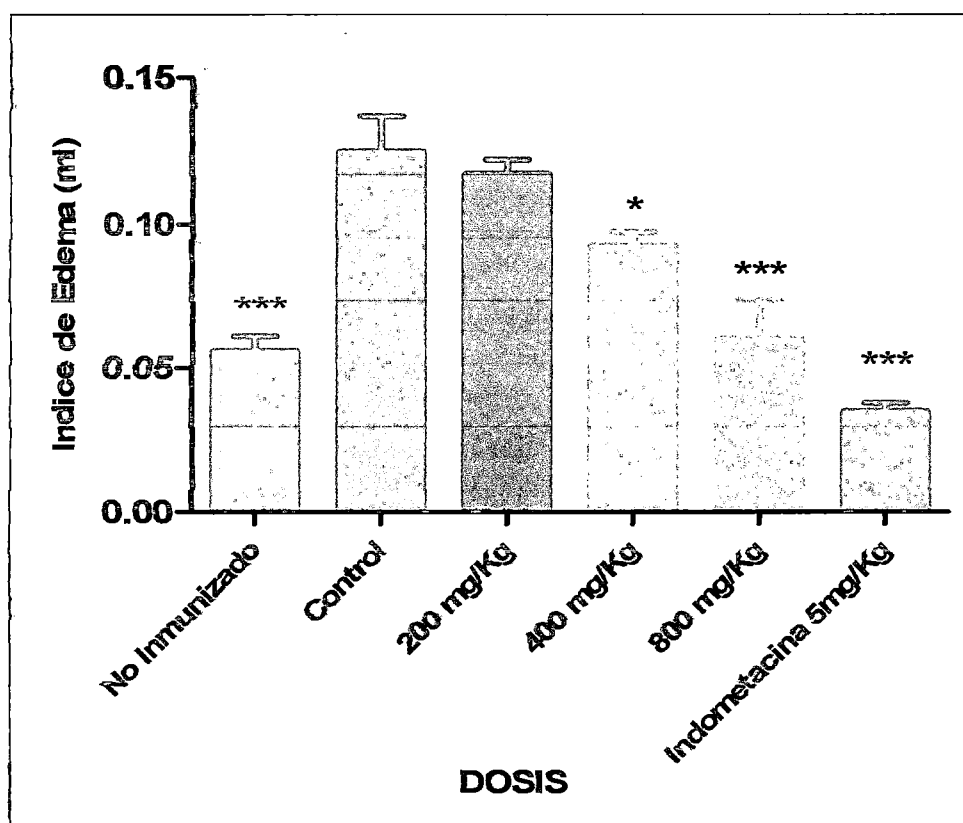
#### ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

El análisis fitoquímico del extracto metanólico de *Cosmos Peucedanifolius* determino la presencia abundante de azucares reductores y glicosidos, de aminoácidos encontrándose en moderada cantidad flavonoides y alcaloides y en escasa cantidad triterpenoides y esteroides, y en ausencia compuestos fenólicos y saponinas.

Al observar estos resultados podemos poner énfasis en la presencia moderada de **flavonoides** ya que las **catequinas** que son flavonoides reducen la inflamación aérea en un modelo de asma bronquial mediante la inhibición de la producción de metaloproteinasas y ERO. (50)

## 4.2 DE LA EVALUACIÓN DEL EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA

Fig. 4.1



FUENTE: Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

**Cuadro 4.5** Efecto del tratamiento durante siete días vía oral con el extracto de *C. peucedanifolius*, e Indometacina en el edema plantar inducido por OVA en ratones inmunizados.

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Índice de edema (ml)(Media ± E.E.M)	% inhibición de la Inflamación
No inmunizados	-	0,0560 ± 0,0051***	-
Control	-	0,1250 ± 0,0119	-
<i>C. peucedanifolius</i>	200	0,1175 ± 0,0047	6
	400	0,0925 ± 0,0047*	26
	800	0,0600 ± 0,0135***	52
Indometacina	5	0,0350 ± 0,0028***	72

\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

#### CUADRO: 4.6 ANOVA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	0,02693	5	0,005386	20,18	0.000
Dentro de grupos	0,005070	19	0,0002668		
Total	0,0320	24			

**FUENTE:** Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Si  $p > 0.05$  se acepta que no existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

Si  $p < 0.05$  se acepta que si existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

#### ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN

El edema plantar inducido por OVA en animales previamente inmunizados con el mismo antígeno desarrolla una reacción alérgica inflamatoria que constituye un adecuado modelo in vivo para evaluar las propiedades antialérgicas de un producto. Los ratones sensibilizados por vía intraperitoneal de forma repetida con OVA y tratados durante siete días por vía oral con el extracto de *Cosmos peucedanifolius* (Panti) e Indometacina evidenciaron una significativa reducción obtenida con el extracto de 400 mg/kg en un 26% del edema plantar inducido por OVA comparado con el grupo control. El efecto del extracto fue dependiente de la dosis. La máxima inhibición obtenida con el extracto fue de 52 % con la dosis de 800 mg/kg.

Para valorar la capacidad de inhibición inflamatoria se seleccionó el modelo inicialmente descrito por Winter y col. (1962), posteriormente modificado para ratón por Sugishita (1981). (51,52)

En el estudio Doctoral denominado "Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica" realizado por Dagmar García en el año 2008, tuvo como resultados en la evaluación del ensayo de Inhibición de la inflamación un porcentaje de inhibición de 59% a Dosis de 500 mg/kg de su planta en estudio (Mangiferina) siendo los resultados similares con nuestro estudio que dio como resultado un porcentaje de inhibición de 52% a Dosis de 800 mg/kg.

Basándonos en los resultados experimentales obtenidos de porcentaje de inhibición correlacionados con el patrón empleados se estableció una escala

para clasificar el grado de actividad antiinflamatoria en: baja (15- 30%), moderada (31-45%), buena (46-60%) y muy buena (61% o más). (53)

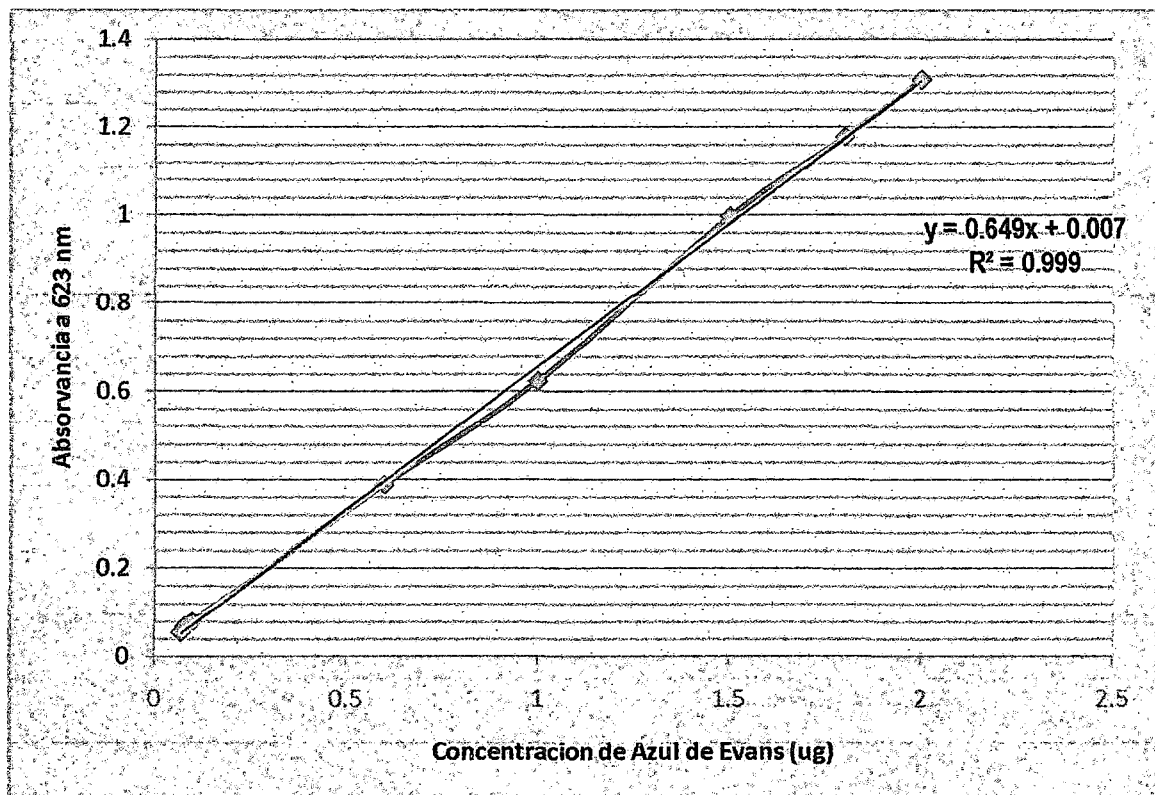
Basándonos en esta tabla podemos decir que la dosis de 800 mg/kg es la que tiene mayor porcentaje de inhibición siendo de 52% se ubica como **buena**.

Los resultados pueden ser correlacionados de acuerdo al tiempo de medición y la participación de los componentes del proceso inflamatorio en: a) fase primaria, inflamación debida al efecto traumático de la inyección y liberación de histamina y serotonina comprendida hasta la primera hora.

En el **cuadro 4.6** muestra el análisis de varianza del cual se puede afirmar que existe una diferencia altamente significativa ( $\text{Sig} < 0.05$ ) en la inhibición de la inflamación de los grupos debido a los tratamientos empleados, esto quiere decir q a diferentes dosis del extracto se obtiene valores de inhibición diferentes, y que a mayor dosis existe mayor inhibición de la inflamación.

#### CURVA DE CALIBRACION DEL COLORNATE AZUL DE EVANS

Fig. 4.2

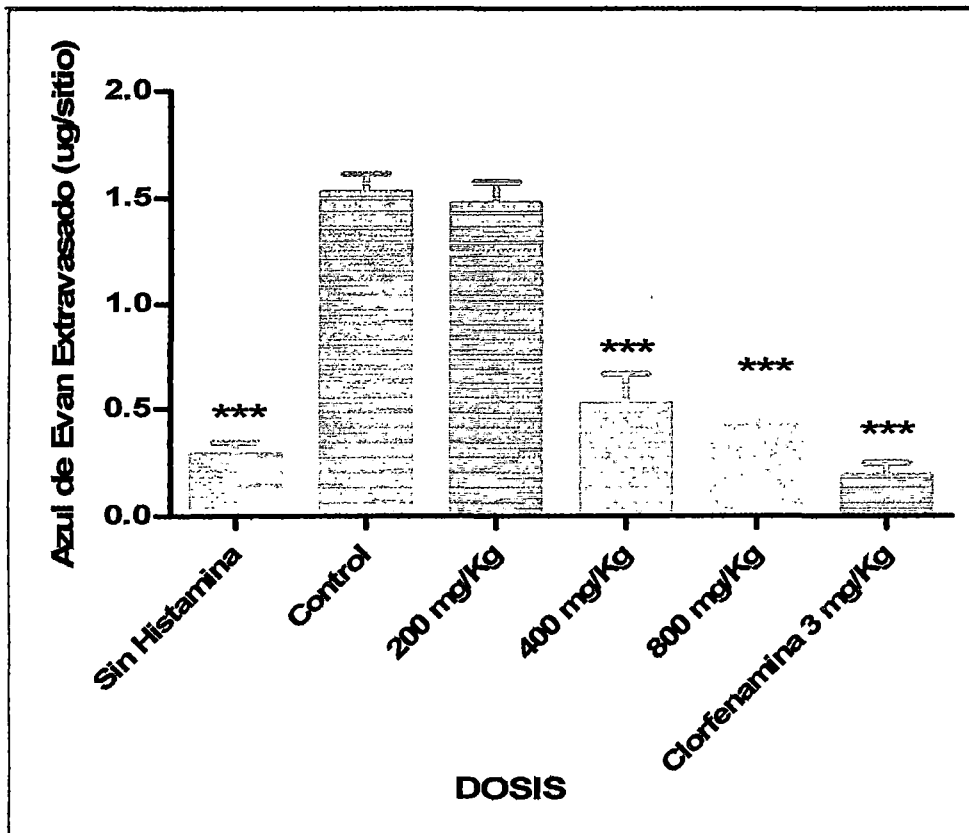


**FIGURA:** Curva estandar de concentracionnde Azul de Evans (ug/ml) en Formarnida, las concentraciones que se utilizaron debieron estar entre. El rango de (0,05-10 µg/mL).

**FUENTE:** Tratamiento estadístico de datos experimentales

### 4.3 DE LA EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN CUTÁNEA INDUCIDA POR HISTAMINA EN RATAS ALBINAS

Fig. 4.3



FUENTE: Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Cuadro: 4.7 Efecto del pre tratamiento durante siete días vía oral con el extracto de *C. peucedanifolius* e Indometacina en la reacción cutánea inducida por histamina en ratas.

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Concentración de azul de Evans ( $\mu\text{g/ml}$ )(Media $\pm$ E.E.M)	% inhibición de la Reacción Cutánea
Sin histamina (SH)	-	0,2874 $\pm$ 0,0568***	-
Control (C)	-	1,5280 $\pm$ 0,0883	-
<i>C. peucedanifolius</i>	200	1,4760 $\pm$ 0,1004	3,40
	400	0,5217 $\pm$ 0,1460***	65,85
	800	0,4162 $\pm$ 0,1260***	72,76
Clorfenamina (Cl)	3	0,1835 $\pm$ 0,0634***	87,99

\*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).



**CUADRO: 4.8 ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	38.36	5	7.672	37,36	0.000
Dentro de grupos	28.34	138	0.2053		
Total	66.70	143			

**FUENTE:** Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Si  $p > 0.05$  se acepta que no existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

Si  $p < 0.05$  se acepta que si existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

En el **cuadro 4.8** muestra el análisis de varianza del cual se puede afirmar que existe una diferencia altamente significativa ( $\text{Sig} < 0.05$ ) en la inhibición de la reacción cutánea inducida por Histamina de los grupos debido a los tratamientos empleados, esto quiere decir q a diferentes dosis del extracto se obtiene valores de inhibición diferentes, y que a mayor dosis existe mayor inhibición de la inflamación.

### **ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN**

En el presente estudio se evaluó el efecto del tratamiento durante siete días con el extracto de *Cosmos peucedanifolius* en el incremento de permeabilidad capilar inducido por histamina durante una reacción cutánea en ratas. Se utilizó como control positivo la Clorfenamina, un conocido inhibidor de los receptores histaminérgicos tipo uno.

En el estudio Doctoral denominado “Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica” realizado por Dagmar García en el año 2008, tuvo como resultados para la prueba de la Evaluación de la Reacción Cutánea inducida por Histamina en ratas albinas un porcentaje de inhibición de 73 % a Dosis de 500 mg/kg de su planta en estudio (Mangiferina) siendo los resultados similares con nuestro estudio que dio como resultado un porcentaje de inhibición de 72.76 % a Dosis de 800 mg/kg. (3)

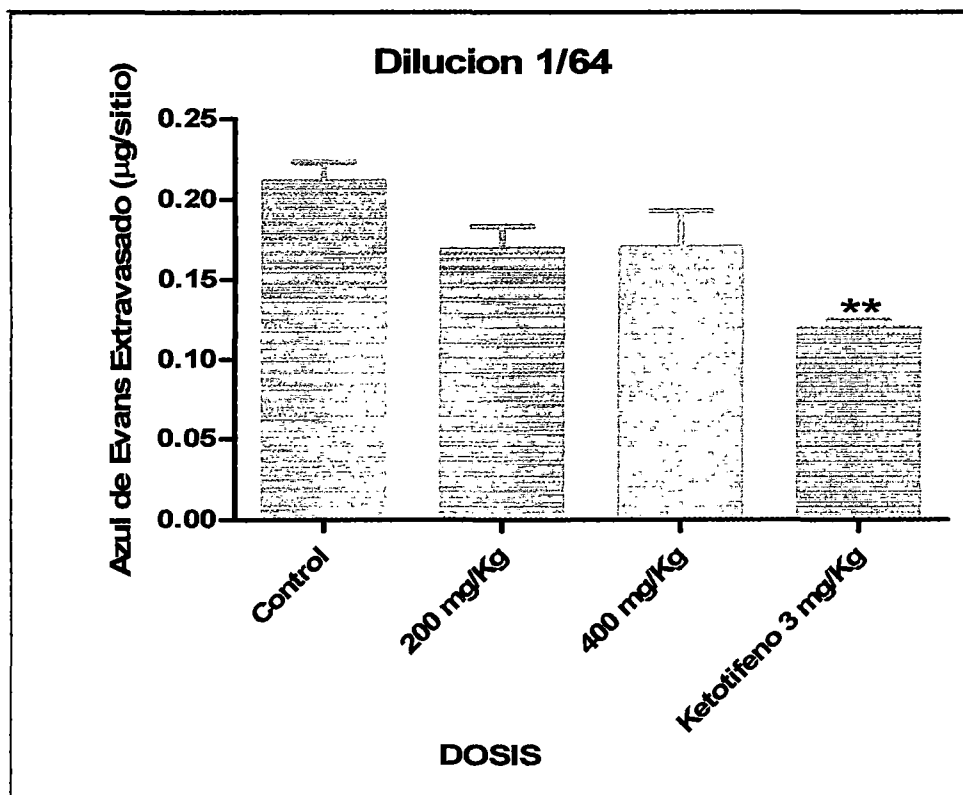
El extracto impidió la extravasación del colorante y la visualización de la reacción cutánea porque inhibió el incremento de permeabilidad capilar

inducido por la histamina. Este resultado induce a pensar en un posible efecto inhibitorio del extracto sobre los receptores histaminérgicos tipo 1, lo que evitará la interacción de la histamina con sus receptores y por tanto, el incremento de la permeabilidad capilar. Los resultados obtenidos en la evaluación del extracto metanólico de *cosmos peucedanifolius* (panti) permiten sugerir que este componente está involucrado en los efectos del extracto. (89)

## 4.4 DEL ENSAYO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA IgE ESPECÍFICA

### 4.4.1 PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCIÓN DE 1/64 DE SUERO

Fig. 4.4



FUENTE: Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

**Cuadro: 4.9** Efecto del tratamiento vía oral durante 21 días con el extracto de y Ketotifeno en la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Concentración de azul de Evans (µg/sitio)(Media ± E.E.M)	% inhibición de la extravasación
Control	(C) -	0,2111 ± 0,0122	-
<i>C. peucedanifolius</i>	200	0,1691 ± 0,0140	19,89 %
	400	0,1696 ± 0,0233	19,65 %
Ketotifeno (K)	3	0,1194 ± 0,0050**	43,43 %

\*\* $p < 0.01$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

Al realizar el análisis estadístico nos da como resultados que solo el grupo patrón es estadísticamente diferente que el grupo control es decir que existe diferencia significativa **\*\*p<0.01**.

Se observa una diferencia grande entre los % de inhibición de extravasación teniendo como resultado final que el grupo Patrón tuvo un buen porcentaje de inhibición mas no así los grupos de 400 mg/kg y 200 mg/kg de extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (Panti) los cuales no se diferencian significativamente del grupo control.

**CUADRO: 4.10 ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	0,01691	3	0,005635	6.142	<b>0.000</b>
Dentro de grupos	0,01101	12	0,0009175		
Total	0,02792	15			

**FUENTE:** Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Si  $p > 0.05$  se acepta que no existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

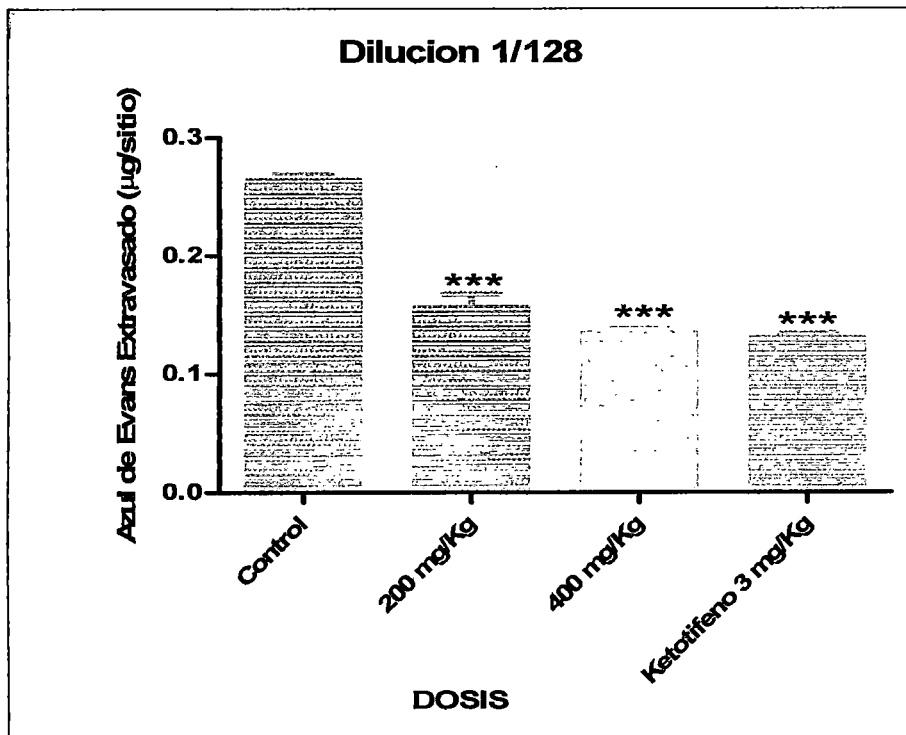
Si  $p < 0.05$  se acepta que si existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

El cuadro muestra el análisis de varianza del cual se puede afirmar que existe una diferencia altamente significativa ( $\text{Sig} < 0.05$ ) en la inhibición de la extravasación del colorante de Evans de los grupos debido a los tratamientos empleados, es decir que a mayor dosis existió un aumento en la inhibición de la permeabilidad capilar por lo cual una menor extravasación del colorante Azul de Evans.

#### 4.4.2 PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCION DE 1/128 DE SUERO

Fig. 4.5



FUENTE: Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

**Cuadro: 4.11** Efecto del tratamiento vía oral durante 21 días con el extracto de y Ketotifeno en la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Concentración de azul de Evans (µg/ml)(Media ± E.E.M)	% inhibición de la extravasación
Control (C)	-	0,2640 ± 0,0050	-
<i>C. peucedanifolius</i>	200	0,1559 ± 0,0119***	40,94 %
	400	0,1341 ± 0,0038***	49,20 %
Ketotifeno (K)	3	0,1299 ± 0,0036***	50,79 %

\*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

Al realizar el análisis estadístico nos da como resultados que tanto las dos Dosis a 200 y 400 mg/kg del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)* y el grupo patrón son estadísticamente diferentes comparándolos con el grupo control se puede decir que existe diferencia significativa  $***p < 0.001$  y a ambas dosis son comparables con el grupo patrón.

Se observa una diferencia de los % de inhibición de extravasación teniendo como resultado final que los grupos de 400 mg/kg y 200 mg/kg de extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)* tiene un buen efecto ya que son diferentes del grupo control y con comparables con el grupo Patrón.

**CUADRO: 4.12 ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	0,04771	3	0,01590	81.24	0.000
Dentro de grupos	0,002349	12	0,0001958		
Total	0,05006	15			

**FUENTE:** Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Si  $p > 0.05$  se acepta que no existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

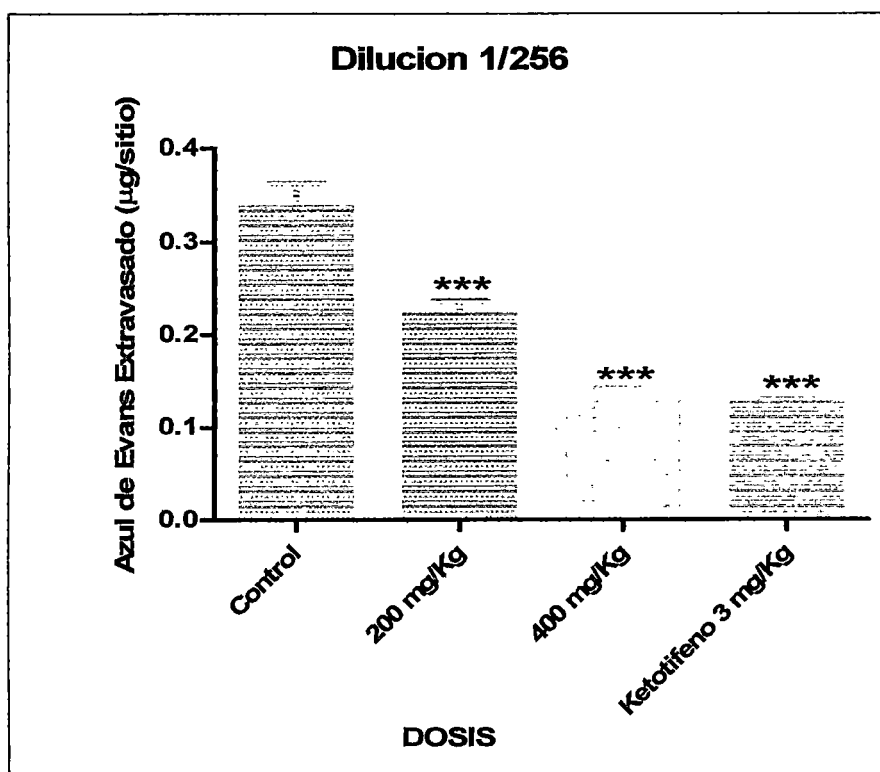
Si  $p < 0.05$  se acepta que si existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

El cuadro muestra el análisis de varianza del cual se puede afirmar que existe una diferencia altamente significativa ( $\text{Sig} < 0.05$ ) en la inhibición de la extravasación del colorante de Evans de los grupos debido a los tratamientos empleados, es decir que a mayor dosis existió un aumento en la inhibición de la permeabilidad capilar por lo cual una menor extravasación del colorante Azul de Evans.

#### 4.4.3 PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCION DE 1/256 DE SUERO

Fig. 4.6



FUENTE: Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Leyenda:

- C: Grupo Control
- 200: Grupo 200 mg
- 400: Grupo 400 mg
- K: Grupo Ketotifeno

**CUADRO: 4.12** Efecto del tratamiento vía oral durante 21 días con el extracto de y Ketotifeno en la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Concentración de azul de Evans (µg/ml)(Media ± E.E.M)	% inhibición de la extravasación
Control (C)	-	0,3390 ± 0,0244	-
<i>C. peucedanifolius</i>	200	0,2224 ± 0,0137***	34,39 %
	400	0,1357 ± 0,0057***	59,97 %
Ketotifeno (K)	3	0,1248 ± 0,0046***	63.18 %

\*\*\* $p < 0.001$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

Al realizar el análisis estadístico nos da como resultados que tanto las dos Dosis a 200 y 400 mg/kg del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (panti)* y el grupo patrón son estadísticamente diferentes comparándolos con el grupo control se puede decir que existe diferencia significativa  $***p < 0.001$  y a ambas dosis son comparables con el grupo patrón.

Se observa una diferencia de los % de inhibición de extravasación teniendo como resultado final que el grupo de 400 mg/kg de extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (Panti)* es el que mejor efecto tuvo comparándolo con el grupo Patrón.

Finalmente podemos decir que a esta dilución 1/256 es que se aprecia de mejor manera la extravasación del colorante y las diferencias entre los grupos.

**CUADRO: 4.13 ANOVA**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	0,1180	3	0,03934	46.74	<b>0.000</b>
Dentro de grupos	0,01010	12	0,0008416		
Total	0,1281	15			

**FUENTE:** Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Si  $p > 0.05$  se acepta que no existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

Si  $p < 0.05$  se acepta que si existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

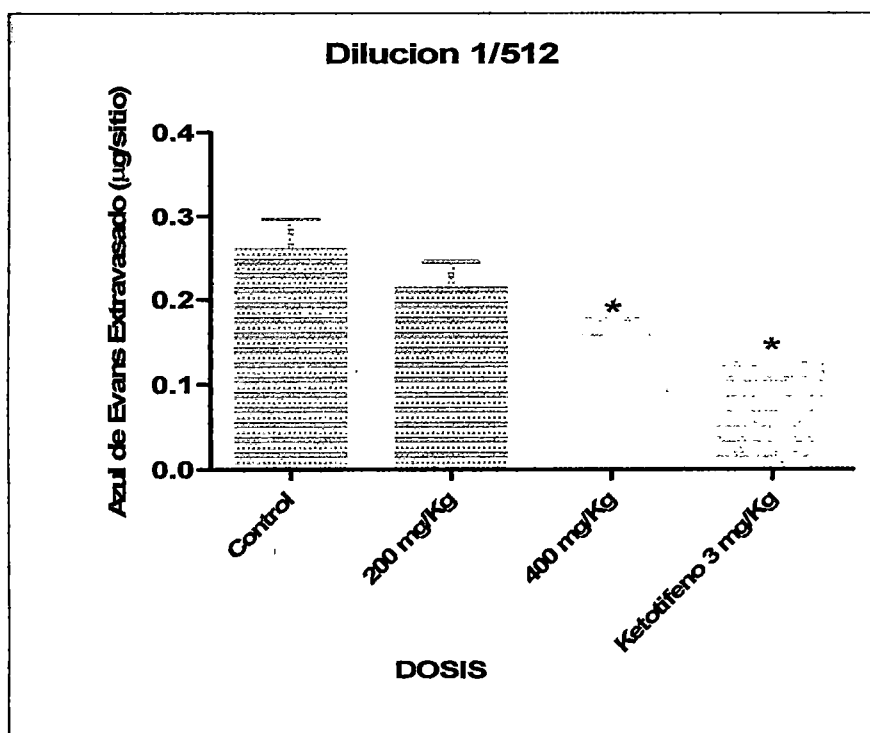
## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

El cuadro muestra el análisis de varianza del cual se puede afirmar que existe una diferencia altamente significativa ( $\text{Sig} < 0.05$ ) en la inhibición de la extravasación del colorante de Evans de los grupos debido a los tratamientos empleados, es decir que a mayor dosis existió un aumento en la inhibición de la permeabilidad capilar por lo cual una menor extravasación del colorante Azul de Evans.



#### 4.4.4 PRUEBA REALIZADA A UNA DILUCION DE 1/512 DE SUERO

Fig. 4.7



FUENTE: Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

**CUADRO: 4.14** Efecto del tratamiento vía oral durante 21 días con el extracto de y Ketotifeno en la respuesta de anafilaxia pasiva cutánea mediada por IgE en ratas

Tratamientos	Dosis (mg/kg)	Concentración de azul de Evans (µg/ml)(Media ± E.E.M)	% inhibición de la extravasación
Control (C)	-	0,2597 ± 0,0366	-
<i>C. peucedanifolius</i>	200	0,2151 ± 0,0307	17,21 %
	400	0,1563 ± 0,0197*	39,81 %
Ketotifeno (K)	3	0,1302 ± 0,0016*	87,23 %

\* $p < 0.05$ , comparado con el grupo control (ANOVA seguido del test de comparaciones múltiples de Dunnett).

## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

Al realizar el análisis estadístico nos da como resultados que solo el grupo patrón y el grupo de 400 mg/kg de extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (parti)*, son estadísticamente diferentes que el grupo control es decir que existe diferencia significativa \* $p < 0.05$ .

Se observa un % de inhibición de extravasación muy bueno del grupo control mas no así de los grupos con tratamiento aunque con un porcentaje algo mayor el grupo de 400 mg/kg , pudiendo ser comprada con el grupo patrón.

CUADRO: 4.15 ANOVA

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F	Sig
Entre grupos	0,04076	3	0,01359	5,068	0.000
Dentro de grupos	0,03218	12	0,002681		
Total	0,07294	15			

FUENTE: Tratamiento Estadístico De Los Datos Experimentales

Si  $p > 0.05$  se acepta que no existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

Si  $p < 0.05$  se acepta que si existe una diferencia significativa en la inhibición de la inflamación debido a los tratamientos.

## ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

El cuadro muestra el análisis de varianza del cual se puede afirmar que existe una diferencia altamente significativa ( $\text{Sig} < 0.05$ ) en la inhibición de la extravasación del colorante de Evans de los grupos debido a los tratamientos empleados, es decir que a mayor dosis existió un aumento en la inhibición de la permeabilidad capilar por lo cual una menor extravasación del colorante Azul de Evans.

## DISCUSIÓN

Como es conocido, la reacción antígeno - IgE produce un cambio estructural a nivel de la membrana del mastocito que suele alterar la permeabilidad de la misma, permitiendo el rápido ingreso de diversos iones, entre ellos el calcio, el cual es esencial para la degranulación de éstas células. Además, se produce un cambio bifásico en los niveles de AMP cíclico, lo que hace que ocurra un

incremento rápido del mismo, seguido de una disminución notable. Es precisamente durante esta disminución notable de AMP cíclico que se liberan los mediadores de la anafilaxia.

En el estudio Doctoral denominado "Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica" realizado por Dagmar García en el año 2008, tuvo como resultados en la Evaluación del ensayo para la determinación de IgE específica un porcentaje de inhibición de 54.3% a Dosis de 500 mg/kg de su planta en estudio (Mangiferina) siendo los resultados similares con nuestro estudio que dio como resultado un porcentaje de inhibición de 59.97% a Dosis de 800 mg/kg a una dilución de 1/256.(3)

En el presente ensayo se provocó la anafilaxia pasiva cutánea mediante un mecanismo inmunológico y se observó el efecto inhibitorio mostrado por las Dosis de 200 y 400 mg/Kg las cuales se escogieron después de realizar la prueba de Toxicidad Aguda, en la cual nos indicó que a dosis cercanas de 1000 mg/kg los ratones ya presentan ciertos síntomas de toxicidad es por eso que como se no se sabía con certeza si los diferentes diluciones del suero que reacción tendrían en las ratas albinas es que se considero solo 2 dosis algo alejadas de la dosis de 1000 mg/Kg, probablemente debido a que estas:

- Impidan de alguna manera la reacción antígeno - anticuerpo.
- Impidan la síntesis y/o liberación de los mediadores alérgicos como consecuencia de la reacción antígeno – anticuerpo especialmente de la histamina, serotonina, bradiquinina, factor activador de plaquetas, prostaglandinas y/o leucotrienos por ser ellos los que provocan fragilidad capilar, por parte de los mastocitos.
- Antagonicen los receptores de la histamina, serotonina, bradiquinina, prostaglandinas y/o leucotrienos impidiendo así que se produzca la fragilidad capilar provocada por ellos y por lo tanto que haya una disminución de la cantidad de colorante extravasado/sitio, ya que los productos antagonistas de estos mediadores inhiben el aumento de la permeabilidad capilar producida por estos.

## 4.5 DE LA DETERMINACION TOXICIDAD AGUDA DL<sub>50</sub>

**CUADRO: 4.16 FASE I: TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANOLICO de  
*Cosmos peucedanifolius (Panti)***

Grupo	Dosis (mg/kg)	N° de ratones	N° de ratones muertos	Observaciones
1	10	3	0	Estado aparentemente normal
2	100	3	0	Estado aparentemente normal
3	1000	3	0	Actividad motora disminuida, insalivación

FUENTE: datos experimentales

### ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

En la determinación de la toxicidad aguda por vía oral en ratones sometidas a dosis crecientes del extracto acuoso metanólico de *Cosmos peucedanifolius (Panti)* según el método de Lorke, se observa que la sustancia es prácticamente atóxica debido a que de un grupo de 9 ratas ninguna muere a las 24 horas a la dosis de 1000mg/kg sugiriendo este un límite para las dosis a emplear en el desarrollo del presente trabajo. Así mismo se observa que a la dosis de 1000mg/kg existe la presencia de una ligera disminución de la actividad motora a los 30 minutos después de la administración.

También se observa que a dosis menos de 1000 mg/Kg de peso de los animales de experimentación presentan estado aparentemente normal con lo cual se estaría confirmando la dosis de 1000 mg/Kg es un límite para la determinación de la dosis utilizadas en el presente trabajo.

**CUADRO: 4.17 FASE II: TOXICIDAD AGUDA DEL EXTRACTO METANOLICO de  
*Cosmos peucedanifolius (Panti)***

Grupo	Dosis (mg/kg)	N° de ratones	N° de ratones muertos	Observaciones
1	1600	1	0	Disminución motora, depresión y respiración acelerada
2	2900	1	0	Disminución motora, depresión y respiración acelerada
3	5000	1	0	Disminución motora, depresión y respiración acelerada

FUENTE: datos experimentales

### ANÁLISIS, INTERPRETACIÓN

En la segunda fase de la determinación de toxicidad aguda por vía oral en ratas sometidas a dosis crecientes del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (Panti)* según el método de Lorke, se observa que la sustancia es muy poco toxica debido a que no hubo ninguna muerte ni en la dosis máxima de 5000 mg/kg. En las 3 dosis usadas (1600, 2900, 5000 mg/kg) hubo disminución motora, depresión y respiración acelerada. También se observa que a dosis menores de 1000mg/kg de peso los animales de experimentación presentan estado aparentemente normal con lo cual se estaría confirmando la dosis de 1000 mg/kg es un límite para la determinación de las dosis utilizadas en el presente trabajo.

### DISCUSIÓN

En la segunda fase de la determinación de toxicidad aguda por vía oral en ratas sometidas a dosis crecientes del extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius (Panti)* según el método de Lorke, se observa que la sustancia es poco toxica debido a que no hubo ninguna muerte ni en la dosis máxima de 5000 mg/kg. En las 3 dosis usadas (1600, 2900, 5000 mg/kg) hubo disminución motora, depresión y respiración acelerada. También se observa que a dosis menores de 1000mg/kg de peso los animales de experimentación presentan estado aparentemente normal con lo cual se estaría confirmando la dosis de

1000 mg/kg es un límite para la determinación de las dosis utilizadas en el presente trabajo.

Esto puede comparado el estudio denominado "Evaluación de la capacidad antioxidante, efecto hepatoprotector y toxicidad aguda del extracto acuoso liofilizado de *Geranium fillipes killip* (Chilli chilli) ", realizado por: Miluska Elorrieta Carbajal y Delia Quispe Sulcaccori en el año 2010 donde dio como resultado que su planta en estudio fue poco toxica.

## CONCLUSIONES

- Se determino experimentalmente que el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (Panti) tiene un muy buen efecto inhibitorio sobre la respuesta alérgica.
- Se determino experimentalmente que el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (Panti) en ratones albinos realizado por el método de Lorke es débilmente toxica.
- En las pruebas preliminares se reporto lo siguiente: Un porcentaje de Humedad de 58.33%, un porcentaje de Rendimiento de 16.67%.
- En cuanto a la marcha fitoquímica se encontró una presencia abundante de azucares reductores glicósidos y aminoácidos una moderada cantidad de flavonoides, alcaloides y una ausencia de saponinas y compuestos fenólicos y en cuanto a las pruebas de solubilidad se observó una gran solubilidad en solventes polares.
- Al hacer la prueba de Anafilaxia Pasiva Cutánea para determinar IgE específica se concluyo que a una dosis de 400mg el extracto metanólico de *Cosmos peucedanifolius* (Panti) inhibe la extravasación del colorante Azul de Evans en un 59.97% a una dilución de 1/256 dando como resultado final un muy buen efecto inhibitorio.
- Se determino que el efecto sobre la inflamación mediante el método de Edema plantar inducido por OVA en animales previamente inmunizados con el mismo antígeno desarrolla una reacción alérgica inflamatoria que constituye un adecuado modelo in vivo para evaluar las propiedades antialérgicas de un producto, evidenciaron una significativa reducción obtenida El efecto del extracto fue dependiente de la dosis. La máxima inhibición obtenida con el extracto fue de 52 % con la dosis de 800 mg/kg dando como resultado final un buen efecto antiinflamatorio.
- En la determinación de la Reacción cutánea en Ratas albinas inducida por se obtuvo los mejores resultados a dosis de 800 mg/kg obteniéndose un porcentaje de inhibición de 72.76 % dando como resultado que la planta en estudio a esta Dosis es muy buena, El extracto evidenció un efecto dependiente de la dosis.

## SUGERENCIAS

- **A la autoridad:**

- ✓ Se sugiere la Implementación de los laboratorios de Farmacia y Bioquímica para el desarrollo de nuevas investigaciones
- ✓ Implementar un bioterio para facilitar la crianza de diferentes tipos de animales de experimentación que son utilizados tanto en la formación del Químico Farmacéutico como en la realización de diferentes trabajos de investigación.
- ✓ Implementar de una base de datos que permita el acceso directo a antecedentes.

- **A los docentes de la Carrera Profesional:**

- ✓ Realizar más cursos sobre investigación y métodos de investigación para una mejorar la calidad de los trabajos de investigación.
- ✓ Incentivar al alumnado de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica a buscar nuevas áreas de investigación.

- **A los estudiantes:**

- ✓ Continuar con el trabajo de investigación realizando nuevas pruebas como: Evaluación del efecto sobre la proliferación linfocitaria, inhibición en la producción de leucocitos, etc. Para así al finalmente llegar a la conclusión si la planta en estudio tiene o no propiedades Inmunomoduladoras.



## REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍAS

1. Jawetz, Melnick & Adelberg's – Medical Microbiology 25th edition- McGrawHill Lange, Atlanta-EEUU 2010
2. Moscoso M. "Secretos Medicinales de la Flora Peruana y Guía de la Maternidad" cuarta edición, Perú, Editorial Alfa 1997
3. García Rivera Dagmar; Delgado Hernández René; Tutor: José Manuel Leiro Vidal, "Efecto inmunomodulador del extracto acuoso de *Mangifera indica* L. sobre la funcionalidad de los macrófagos y la respuesta alérgica", Ciudad de La Habana: Editorial Universitaria, 2008. -- ISBN Centro de Química Farmacéutica. – Tesis (Doctor en Ciencias Farmacéuticas).
4. Morris Quevedo Humberto J.; Martínez Manrique Clara E.; Abdala Díaz, Roberto T.; Cobas Pupo, Guillermo, Evidencias "Preliminares de la actividad inmunomoduladora de la fracción polisacárida de origen marino pc-1"
5. Jimenez Eva Maria "Estudio de las actividades antitumorales de un extracto de caléndula: propiedades inmunomoduladoras y citotóxicas", Editorial: Universidad de Granada-Granada; Mayo 2006.
6. Almara A., Valverde J., Morisoli L. y Rasia R., "tH50: un parámetro indicador de la actividad global del complemento", Departamento de patología – Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Rosario -Argentina
7. Tillán Capó Juana, Nuñez Figueredo Yanier, Agüero Fernández Sara y Carrillo Domínguez Carmen, "Actividad antiinflamatoria de compuestos liposolubles de *Zingiber officinale* Roscoe frente a diferentes agentes flogísticos", Rev. Cubana Plant Med v.12 n.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2007 - Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM).
8. Nuñez Figueredo Yanier, Tillán Capó Juana, Carrillo Domínguez Carmen, Menéndez Castillo Rosa y Diego León Rafael "Efecto de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Tabletas sobre la anafilaxia pasiva cutánea, transmisión histaminérgica y adrenérgica", Centro de investigación y desarrollo de medicamentos (CIDEM). UCTB control

biológico - Rev. Cubana Plant Med v.11 n.3-4 Ciudad de la Habana jul.-dic. 2006

9. Nuñez Figueredo Yanier, Tillán Capó Juana, Carrillo Domínguez Carmen, Olivares Guerra Odila A. y Núñez Gomero Ramona "Efecto de un extracto oleoso de rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (MVZ) sobre la anafilaxia pasiva cutánea y el espasmo bronquial inducido por histamina", Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) - REV CUBANA PLANT MED 2005
10. Nuñez Figueredo Yanier, Tillán Capó Juana, Carrillo Domínguez Carmen, Vega Hurtado Yamilet, Guerra Marta, Rivero Reinaldo & Garrigó García Eilyn, "Efecto del Extracto Acuoso Liofilizado de *Boerhavia erecta* L. sobre la Anafilaxia Pasiva Cutánea, Espasmo y Tonicidad Bronquial y la Musculatura Lisa Intestinal", - 19 de julio de 2004 - Departamento de Farmacología Experimental y Departamento de Productos Naturales. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). Departamento de Investigaciones Biológicas.
11. Núñez Figueredo Yanier, Barzaga Fernández Pedro, Carrillo Domínguez Carmen, Lastra Valdés Humberto, Chávez Hernández Ismael, Fernández Mena Dianelis y González Sanabria María Lidia, "Efecto del extracto acuoso liofilizado de *Ocimum tenuiflorum* L. sobre la anafilaxia pasiva cutánea, espasmo y tonicidad bronquial", - REV CUBANA PLANT MED 2004 - Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM)
12. Ben-efraim S., Fuchs S. and Sela M. – "Passive Cutaneous Anaphylaxis in the Guinea-Pig with Rabbit Antibodies against Synthetic Polypeptides" Israel Institute for Biological Research, Nes Ziona, and The Weizmann Institute of Science, Rehovoth, , Israel - (Received 20th June 1963)
13. Bafna Ar, Mishra Sh - Actividad inmunomoduladora del extracto de metanol de la cabeza floral de *Sphaeranthus indicus* Linn - Pharmacy Department, Faculty of Technology and Engineering, India - 2004
14. Roersch Carlos y Van der Hoogte Liesbeth, "Plantas Medicinales del Sur Andino del Peru".
15. Brack Egg Antonio, (1999) "Diccionario Enciclopédico de Plantas Útiles Del Perú".

16. Olabazal Castillo Oscar y Mantilla Holguin Justo, (2001) "Pachamama Hampa Qhoranchiskuna Las Plantas Medicinales de Nuestra Madre Tierra"
17. Facultad de Ingenieria Industrial de la Universidad de Lima "Industria Farmacéutica – Catalogo de Plantas Medicinales" (1994)
18. Pastor Soplin Santiago, "Informe Nacional Para La Conferencia Técnica Internacional De La FAO Sobre Los Recursos Filogenéticos" (1996)
19. Arrázola Rivero Susana, Atahuachi Margoth, Saravia Edwin y Lopez Alvaro "Diversidad Florística Medicinal Y Potencial Etnofarmacológico De Las Plantas De Los Valles Secos De Cochabamba" (2002).
20. Camacho Cáceres E., Soncco Acurio V. "Estudio etnobotánico, etnofarmacológico y determinación de la bioactividad de plantas medicinales más representativas de las comunidades de Ampay y Huandar del distrito de Pisac – Cusco" (2005).
21. Hind Nicholas, "The Board of Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew 2005" (2005)
22. Fuzzati, Sutarjadi Nicola, Wahjo Dyatmiko, Rahman Abdul y Hostettmann Kurt, "Phenylpropane Derivatives from roots of *Cosmos caudatus*" (1995).
23. Guanghou Shui, Peng Leong Lai y Peng Wong Shih "Rapid screening and characterisation of antioxidants of *Cosmos caudatus* using liquid chromatography coupled with mass spectrometry" (2003).
24. Abas Faridah, Nordin H. Lajis, Israf D.A., Khozirah S., y Kalsom Umi. "Antioxidant and nitric oxide inhibition activities of selected Malay traditional vegetables" (2006).
25. Akihisa Toshihiro, Yasukawa Ken, Oinuma Hirotohi, Kasahara Yoshimasa, Yamanouchi Sakae, Takido Michio, Kumaki Kunio y Tamur Toshitake. "Triterpene Alcohols From The Flowers Of Compositae And Their Anti-Inflammatory Effects" (1996).
26. Mantilla Justo - "Cultivando Salud en los Andes" – Edición 1º - Editorial : Moderna – Cusco – Perú – 2007
27. Manual de merk Decima Edicion
28. Fernández Javier Profesor Titular de Alergia Dpto. de Medicina Clínica Facultad de Medicina Universidad Miguel Hernández , Alergia elemental

29. Abbas A, Lichtman A, Pober J. "Células y tejidos del sistema inmune Inmunología celular y molecular". (Interamericana McGraw Hill). Madrid. Pp 18-33, 1996
30. Carayannopoulos LN, Yokoyama WM. "Recognition of infected cells by natural killer cells". *Curr Opin Immunol*, 16(1): 26-33, 2004
31. Reis-Sousa C. "Activation of dendritic cells: translating innate into adaptative immunity". *Curr Opin Immunol*, 16(1): 21-25, 2004
32. Robbie-Ryan M, Brown M. "The role of mast cells in allergy and autoimmunity". *Curr Opin - Immunol*, 14(6): 728-733, 2002
33. Wedemeyer J, Tsai M, Galli SJ. "Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity". *Curr Opin Immunol*, 12(6): 624-631, 2000
34. Dombrowicz D, Capron M. Eosinophils,"Allergy and parasites". *Curr Opin Immunol*, 13(6):716-20, 2001
35. Janeway CA, Travers P, Walport M, Capra J. Garrison J. "La respuesta inmunitaria humoral Inmunobiología: el sistema inmune en condiciones de salud y enfermedad" (Ediciones Massons, S.A.). Barcelona. 309-359, 2000
36. Saini S, MacGlashan D. How "IgE upregulates the allergic response". *Curr Opin Immunol*, 14(6): 694-697, 2002
37. Morel PA, Oriss TB. "Crossregulation between Th1 and Th2 cells". *Crit Rev Immunol*, 18(4):275-303, 1998
38. Wild MK, Huang MC, Schulze-Horsel U, van der Merwe PA, Vestweber D. Affinity, "Kinetics and thermodynamics of E-selectin binding to E-selectin ligand-1". *J Biol Chem*, 276(34):31602-31612, 2001
39. Harlan JM, Winn RK. "Leukocyte-endothelial interactions: clinical trials of anti-adhesion therapy". *Crit Care Med*, 30(5): 214-219, 2002
40. Moser B, Loetscher P. "Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature Immunology*", 2(2):123-128, 2001
41. Oda T, Matsumoto S. "Identification and characterization of histamine H4 receptor". *Nippon Yakurigaku Zasshi*, 118(1): 36-42, 2001
42. Charles A. Janeway, Paul Travers, Mark Walport , J. Donald Capra- "El Sistema Inmunitario en condiciones de salud y enfermedad"- editorial

masson inmunobiologia –año: 2000 – versione spañola de la cuarta edición)

43. Sanchez Perez Miguel, "Inmunidad Aplicada y Técnicas Inmunológicas" ,editorial síntesis – 1998
44. Abul K. Abbas "Inmunologia celular y molecular" 6ª edición , MBBS el servier
45. <http://es.wikipedia.org/wiki/Clorfenamina>  
Enciclopedia libre Wikipedia, Reinio Unido, 1 dic 2010, a las 21:25,
46. <http://www.imedicinas.com/GPTage/Obrir.php?ident=ca03se04sb01gm02mo05>  
Pharma Editores, S.L. 2011 Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, España, Fecha de última actualización: 18 de junio de 2008
47. [http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol30\\_2\\_96/far08296.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol30_2_96/far08296.htm)  
Rev Cubana Farm, Cuba, 1997
48. Yamanaka S., Hashimoto M., Tobe M., Kobayashi K., Sekizawa J., A simple method for screening assessment of acute toxicity of chemicals. Archives of toxicology., 1990
49. Lorke D., A New Approach to practical acute toxicity testing. Archives of toxicology, 1983
50. Kim SH, Park HJ, Lee CM, Choi IW, Moon DO, Roh HJ, Lee HK, Park YM. Epigallocatechin-3-gallate protects toluene diisocyanate-induced airway inflammation in a murine model of asthma.: 1883-1890, 2006b
51. Winter, C.A., Risley E.A., Nuss N.W., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 544, (1962).
52. Sugishita, E., Amagaya, S., Ogihara, Y., *J. Pharm. Dynamic.*, **4**, 565, (1981).
53. Gonzales Dávalos Eduardo, Villca Jiménez Tania, Loza Almanza Rocio Evaluación de la actividad antiinflamatoria de ocho especies del género *baccharis*: *b. articulata*, *b. dracunculifolia*, *b. salicifolia*, *b. ulcina*, *b. latifolia*, *b. pentlandii*, *b. obtusifolia*, *b. subalata*. Área de Farmacología del Instituto de Investigaciones Fármaco-bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés, , Av. Saavedra No.2224, La Paz, Bolivia.

54. Villanueva Alfonso Rafael Diccionario Mosby: Medicina, enfermería y ciencias de la salud 5º Edición Editorial Harcourt, - España – 2000

# **ANEXOS**



CERTIFICADO

La que suscribe Magali Raquel Salas Martinez, identificada con DNI 08889967, Gerente General de la empresa ALFA BIOL S.A.C; certifica lo siguiente:

Que los 25 roedores color blanco, de 9 semanas, son animales que no han sido expuestos a ningun tipo de ensayos experimentales de laboratorio; por lo tanto se encuentran libres de cualquier agente bacteriano incluido salmonella.

Expedimos el presente certificado para los fines de transito a la ciudad del Cusco.

Atentamente,

ALFA BIOL S.A.C.  
LABORATORIOS VETERINARIOS  
  
-----  
Dra. MAGALI SALAS  
Gerente General



Original and duplicate copies of this certificate are to be kept in the laboratory files.

# Certificate of Analysis

SIGMA-A-LDRICH

Product Name	Formamide, ≥99% (GC)
Product Number	F7503
Product Brand	SIAL
CAS Number	75-12-7
Molecular Formula	HCONH <sub>2</sub>
Molecular Weight	45.04

ICST	LOT 038100601 RESULTS
APPEARANCE	CLEAR COLORLESS LIQUID
IR SPECTRUM	CONFORMS
PURITY BY GAS CHROMATOGRAPHY	99.6%
QC RELEASE DATE	4 MAY 2009

Rodney Burbach, Manager  
Quality Control  
St. Louis, Missouri USA

# ANEXO 3: CERTIFICADO DE REACTIVOS (ALBUMINA DE HUEVO, SIGMA)

http://www.sigmaaldrich.com/chemistry/chemicals/peptides/albumin.html

## Certificate of Analysis

SIEMA-ALDRICH

**Product Name** Albumin from chicken egg white,  
lyophilized powder, ≥98% (agarose gel electrophoresis)  
**Product Number** A5503  
**Product Brand** SIGMA  
**CAS Number** 9006-59-1  
**Storage Temp** 2-8°C

TEST	SPECIFICATION	LOT 118K7002 RESULTS
APPEARANCE	WHITE TO YELLOW POWDER CLEAR TO SLIGHTLY HAZY	YELLOW POWDER SLIGHTLY HAZY FAINT YELLOW
SOLUBILITY	COLORLESS TO YELLOW SOLUTION AT 40MG/ML IN WATER	
WATER BY KARL FISCHER	NMT 6%	1%
ELEMENTAL ANALYSIS	13.0 TO 16.0% NITROGEN	15.1%
AGAROSE ELECTROPHORESIS	MINIMUM 98%	98%
RECOMMENDED RETEST	5 YEARS	FEB 2014
QC RELEASE DATE		19 FEB 2009



Rodney Burbach, Manager  
Quality Control  
St. Louis, Missouri USA

# ANEXO 4: CERTIFICADO DE REACTIVOS (COLORANTE AZUL DE EVANS)

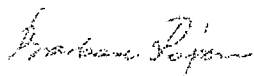
Report generated by Bio-Rad's distributed technology center on 06/08/2010 08:27 a.m.

## Certificate of Analysis

SIGMA-ALDRICH

Product Name	Evans Blue, Dye content ≥75 %
Product Number	E2129
Product Brand	SIGMA
CAS Number	314-13-6
Molecular Formula	$C_{34}H_{24}N_8Na_4O_{14}S_4$
Molecular Weight	960.81

TEST	SPECIFICATION	LOT MKB21107 RESULTS
Appearance (Color)	Dark Brown	dark brown
Appearance (Form)	Powder	Powder
Carbon	30.0 - 42.5 %	37.4 %
Nitrogen	6.1 - 8.7 %	7.5 %
Dye Content	≥75 %	86 %
Specification Date:		OCT 2008
Date of QC Release:		MAR 2009
Recommended Retest Date:		MAR 2013
Print Date:		JAN 18 2010



Barbara Ryzner, Supervisor  
Quality Control  
Milwaukee, Wisconsin USA

# ANEXO 5: CERTIFICADO DE REACTIVOS (DIFOSFATO DE HISTAMINA)



SIGMA-ALDRICH

SIGMA

Union, MO 65033  
 281 922 1000  
 Mexico 52 55 56 23 11 00

Telephone: 31 705 00 00  
 Telex: 543 313 5279  
 Fax: 31 704 230 00 00

Certificate of Analysis

Product Brand	Sigma	
PRODUCT NO	H1371	
PRODUCT	HISTAMINE BISPHOSPHATE MONOHYDRATE	
FORMULA	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> • 2H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	
MOLECULAR MASS	325.16	
CAS NUMBER	51 74 1	
LOT	1316543	
Test	Specification	Result
APPEARANCE (COLOR)	WHITE	WHITE
APPEARANCE (FORM)	POWDER	POWDER
PURITY (HPLC AREA %)	99.9%	99.9%
SOLUBILITY (COLOR)	TYLORLESS	TYLORLESS
SOLUBILITY (TURBIDITY)	CLAY 0.95 (H)	CLEAR
SOLUBILITY (MEDIUM)	50 MG/ML IN WATER	50 MG/ML IN WATER
WATER	REFORM 0.001	0.001
CARBON CONTENT	14.1% (ANHYDROUS BASIS)	13.4% (ANHYDROUS BASIS)
NITROGEN CONTENT	13.7% (ANHYDROUS BASIS)	13.7% (ANHYDROUS BASIS)
DATE OF ISSUE	03/09/07	

*[Signature]*  
 Dr. [Name]  
 Quality Control  
 Sigma-Aldrich

Sigma-Aldrich and the Sigma-Aldrich logo are trademarks of Sigma-Aldrich. All other trademarks are the property of their respective owners. © 2007 Sigma-Aldrich. All rights reserved.

## ANEXO 6: CERTIFICADO DE LA PLANTA *Cosmos Peucedanifolius* (Panti)

### UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO ABAD DEL CUSCO

• DEPARTAMENTO	• CIUDAD VARGAS	• MESA INKA
• FACULTAD	• CENTRAL DE QUÍMICA	• CENTRO CROMOMBIOLÓGICO
• LABORATORIO	• LABORATORIO CENTRAL	• COLEGIO FORTINADO DE HERBERIA

LA QUE SUSCRIBE DIRECTORA DEL HERBARIO VARGAS (CUZ)

### CERTIFICA

Que la bachiller SALAS CARDENAS ERIKA LEONOR de la Carrera Profesional de Farmacia y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas, Físicas y Matemáticas Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco, ha presentado al herbario Vargas (CUZ) una muestra botánica herbóricada para su determinación.

Dicho material ha sido sometido a una diagnosis en base a claves taxonómicas, análisis morfológico, filogenético y comparación con muestras existentes en el herbario, de la que se desprende que el material analizado corresponde a la especie *Cosmos peucedanifolius*. Siendo su posición taxonómica de acuerdo al Sistema de Clasificación de Arthur Cronquist (1981).

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Asterales
Familia	Asteraceae
Género	Cosmos
Especie	<i>Cosmos Peucedanifolius</i>
N. vulgar	Panti, Panti-Panti, Para-Para

Se le expide la presente certificación de determinación de la especie por los datos que figura por convenirle.

Cusco, Setiembre de 2010

Arch. HV. CUZ

UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN ANTONIO  
 ABAD DEL CUSCO  
 Herbario Vargas (CUZ)  
 M.S. Josefina de la Torre Mayorga  
 Directora

**ANEXO 7: FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA LA TOXICIDAD AGUDA**

TOXICIDAD AGUDA									
GRUPO	5min	10min	15min	30min	1hr	2hr	12hr	24hr	2 días
Peso									
Muerte									
Actividad									
Reacción externa									
Sensibilidad al dolor									
Cola anormal									
Agresividad									
Ataxia									
Convulsiones									
Parálisis									
Respuesta somática									
Temblores									
Fotofobia									
Defecación									
Micción									
Salivación									
Respiración									
Piloerección									

**ANEXO 8: FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA METODO DE EDEMA PLANTAR INDUCIDO POR OVA**

<b>GRUPO: DOSIS 200 mg</b>				
	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA</b>	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA 30 MINUTOS DESPUES</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA 30 MINUTOS DESPUES</b>
ratón 1				
ratón 2				
ratón 3				
ratón 4				
<b>GRUPO: DOSIS 400 mg</b>				
	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA</b>	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA 30 MINUTOS DESPUES</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA 30 MINUTOS DESPUES</b>
ratón 1				
ratón 2				
ratón 3				
ratón 4				
<b>GRUPO: DOSIS 800 mg</b>				
	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA</b>	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA 30 MINUTOS DESPUES</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA 30 MINUTOS DESPUES</b>
ratón 1				
ratón 2				
ratón 3				
ratón 4				
<b>GRUPO PATRON: INDOMETACINA</b>				
	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA</b>	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA 30 MINUTOS DESPUES</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA 30 MINUTOS DESPUES</b>
ratón 1				
ratón 2				
ratón 3				
ratón 4				
<b>GRUPO BLANCO</b>				
	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA</b>	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA 30 MINUTOS DESPUES</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA 30 MINUTOS DESPUES</b>
ratón 1				
ratón 2				
ratón 3				
ratón 4				
<b>GRUPO NO INMUNIZADO</b>				
	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA</b>	<b>VOL.(ml) PATA IZQUIERDA 30 MINUTOS DESPUES</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA</b>	<b>VOL.(ml) PATA DERECHA 30 MINUTOS DESPUES</b>
ratón 1				
ratón 2				
ratón 3				
ratón 4				

**ANEXO 9: FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA  
EVALUACION DE SOLUBILIDAD**

<b>Solvente</b>	<b>TEMPERATURA (T°) AMBIENTE</b>	<b>TEMPERATURA (T°) 37 °C</b>
<b>Agua destilada</b>		
<b>Metanol</b>		
<b>Etanol 40%</b>		
<b>Etanol 50%</b>		
<b>Etanol 70%</b>		
<b>Etanol 90%</b>		
<b>Acetato de etilo</b>		
<b>Acetona</b>		
<b>Cloroformo</b>		
<b>Hexano</b>		



**ANEXO 10: FICHA PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS PARA  
EVALUACION DE COMPUESTOS FITOQUIMICOS**

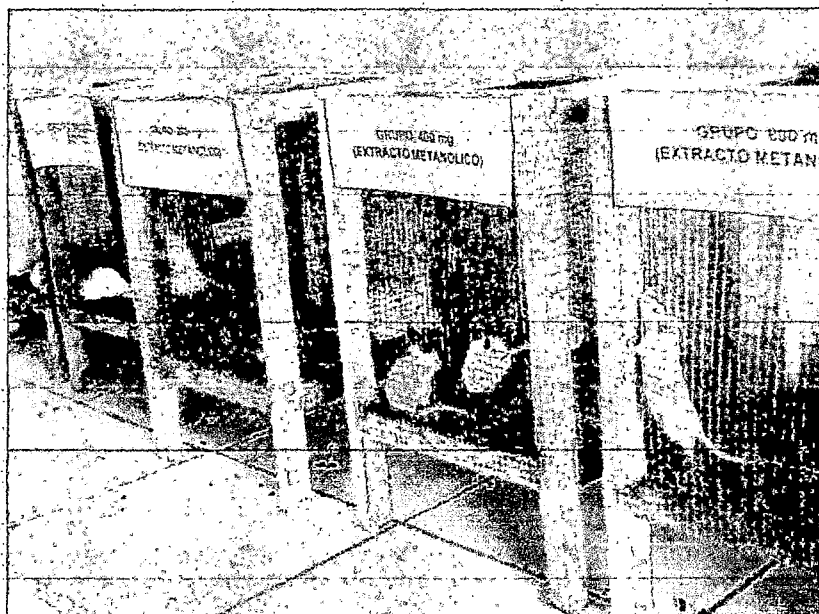
<b>Metabolito secundario</b>	<b>Reactivo</b>	<b>Muestra</b>
<b>Azucares reductores y glucósidos</b>	<b>Benedict</b>	
<b>Aminoácidos</b>	<b>Ninhidrina</b>	
<b>Compuestos fenólicos</b>	<b>Cloruro férrico</b>	
<b>Flavonoides</b>	<b>Shinoda</b>	
<b>Alcaloides</b>	<b>Dragendorff</b>	
<b>Saponinas</b>	<b>Afrosimetrico</b>	
<b>Triterpenoides y esteroides</b>	<b>Lieberman- Burchard</b>	

## ANEXO 1.

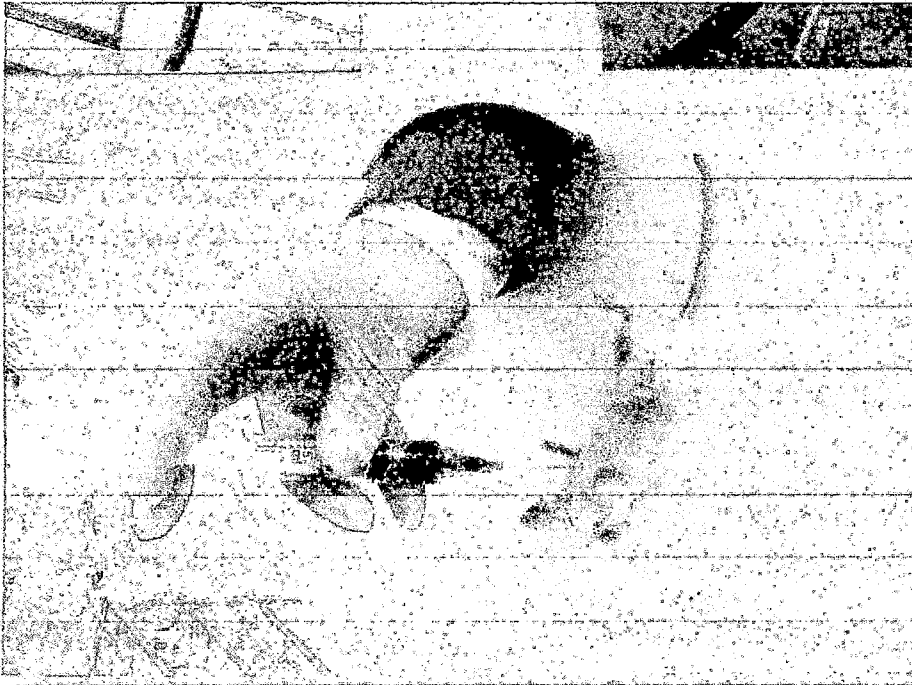
### FOTOGRAFIAS



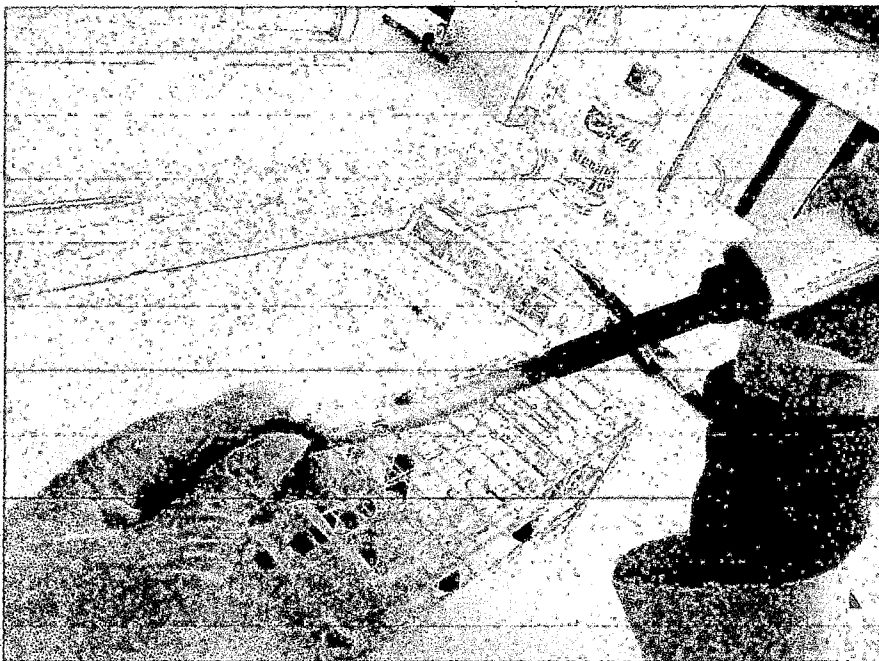
FOTOGRAFIA N°1: Grupos de ratones albinos debidamente separados antes de la prueba de edema plantar inducido por Ovoalbumina.



FOTOGRAFIA N°2: Grupos de ratones albinos debidamente separados antes de la prueba de Reaccion cutánea inducido por Histamina .



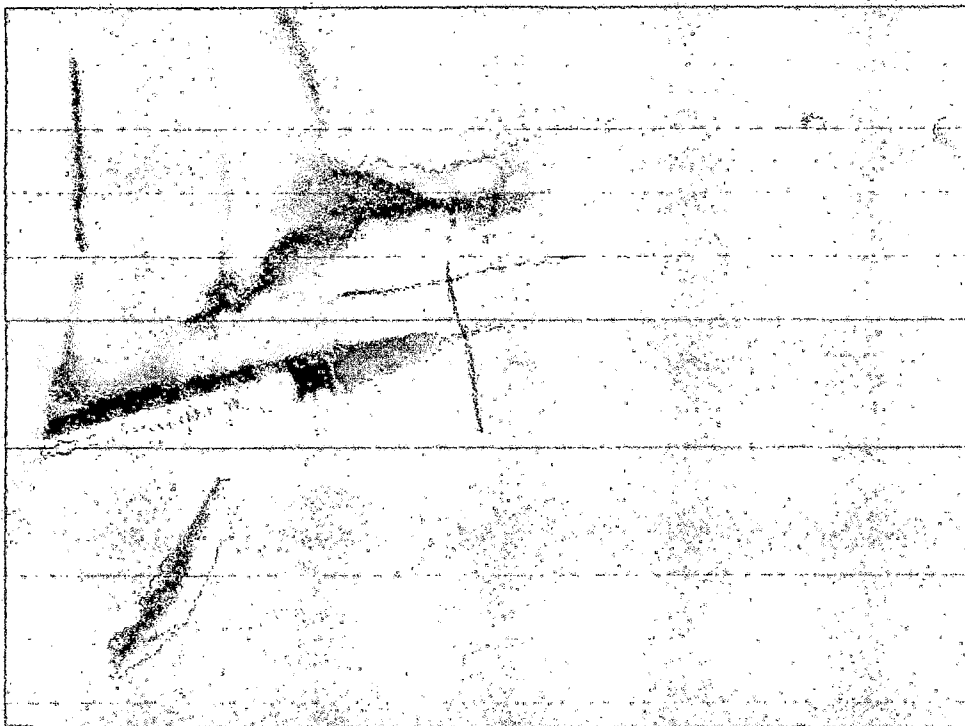
FOTOGRAFIA N°3: Punción intracardiaca: la obtención de sangre se realizo mediante este método para luego poder obtener el suero por centrifugación



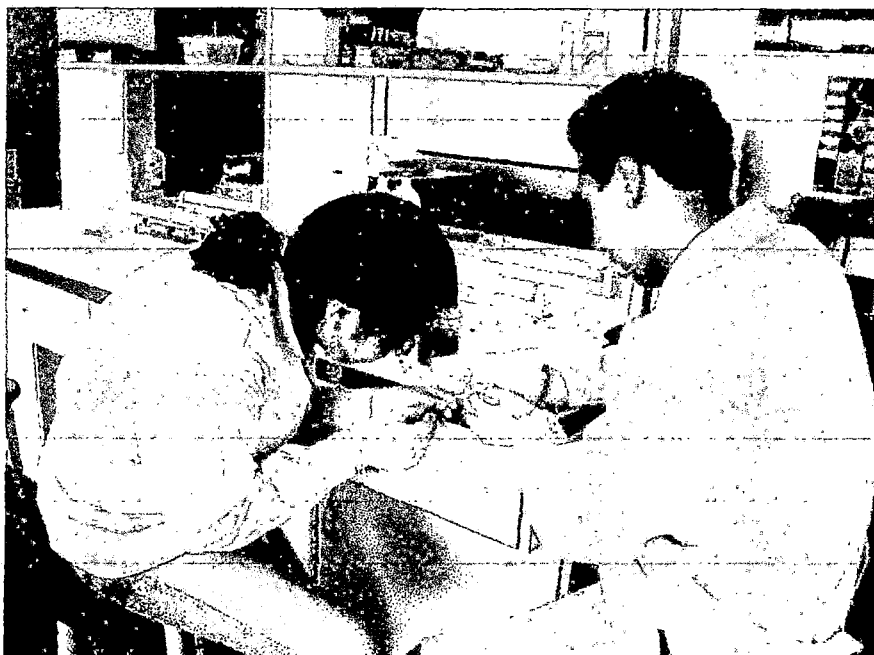
FOTOGRAFIA N°4: Obtención del suero después de haberse realizado una centrifugación a 2500 rpm por 10 min, la utilización de micropipetas es para tener mayor precisión.



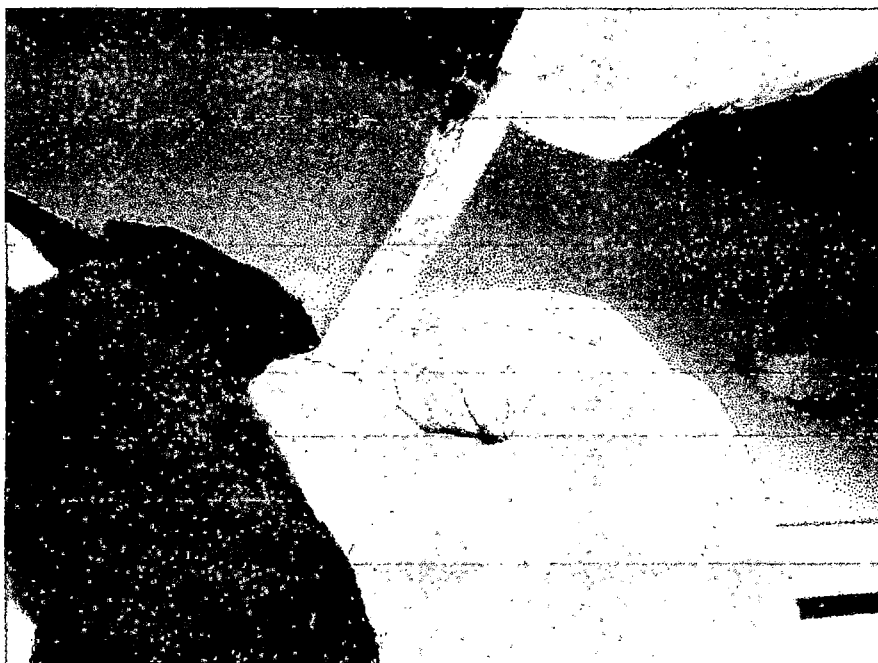
FOTOGRAFIA N°5: Delimitación del lomo de las ratas para conocer con exactitud la zona de piel en la cual se tiene que realizar la inoculación de la sustancia sensibilizante.



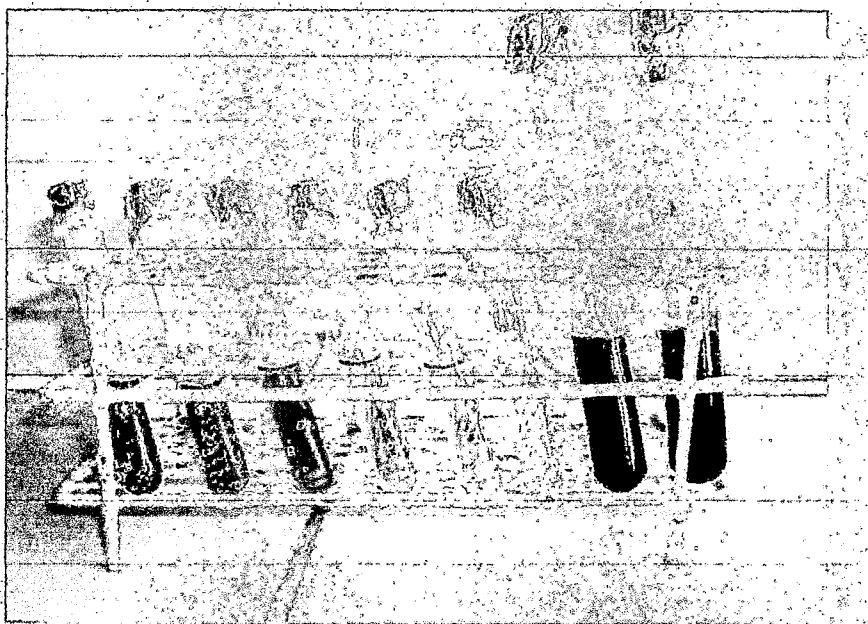
FOTOGRAFIA N°6: Administración vía intradérmica de la sustancia sensibilizante



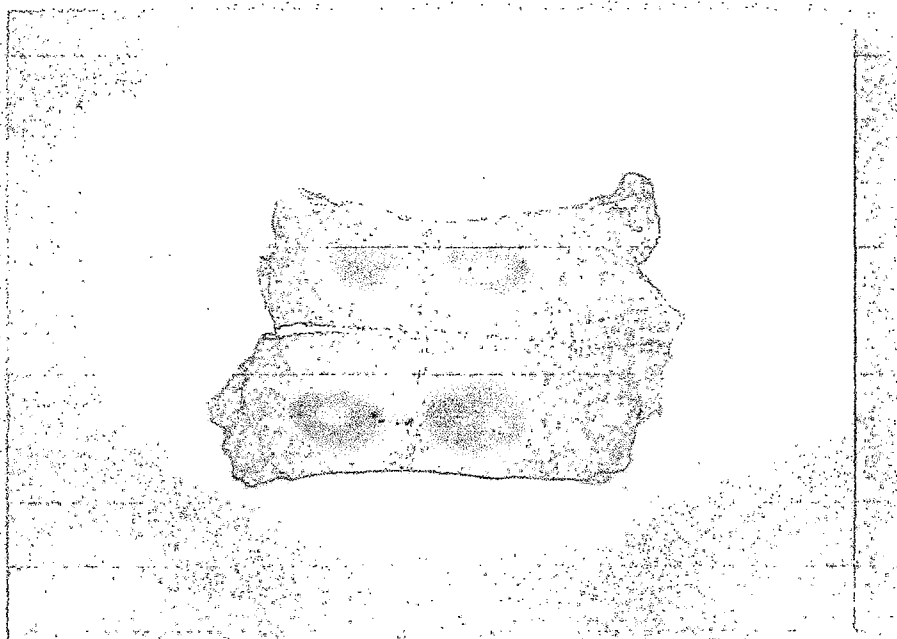
FOTOGRAFIA N°7: Administración vía endovenosa del colorante azul de Evans



FOTOGRAFIA N°8: Administración vía endovenosa del colorante azul de Evans (Por la cola de la Rata)



FOTOGRAFIA N°9: Preparación de diferentes diluciones del colorante Azul de Evans para luego realizar una lectura en el espectrofotómetro a 623 nm y construir una curva de calibración la cual nos servirá para conocer la concentración de colorante que extravasó.



FOTOGRAFIA N°10: Corte de un pedazo de piel en la cual podemos observar claramente en que zonas hubo mayor extravasación del colorante Azul de Evans.