



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

FACULTAD DE QUIMICOFARMACOBIOLOGÍA

“ACTIVIDAD ANTIPIRÉTICA DE EXTRACTOS CRUDOS Y
PROTEICOS DE FLOR DE JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa L.*)”

Tesis que presenta

p.QFB. MARÍA ELENA VELÁZQUEZ HERNÁNDEZ

Para obtener el título de
QUIMICOFARMACOBIOLOGO

Asesor de tesis
D.C. BERTHA FENTON NAVARRO

MORELIA, MICHOACÁN

MAYO 2010



Este trabajo se realizó bajo la dirección de la
D.C. Bertha Fenton Navarro en el
Laboratorio de Glicobiología
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”
UMSNH

Apoyado por:

CIC-16-2009

DEDICATORIA

Quiero dedicar este trabajo a mi familia por su apoyo incondicional. Especialmente a mis padres porque siempre me dieron la oportunidad de tomar decisiones propias, que en su momento fueron buenas o malas, pero que me han convertido en lo que ahora soy y me condujeron a cumplir una de las metas más importantes que tengo en la vida, convertirme en Quimicofarmacobióloga.

AGRADECIMIENTOS

Al M.C. Álvaro Rodríguez Barrón por su gran ayuda, la cual fue indispensable para llevar a cabo este trabajo, por su disposición y amabilidad.

A la D.C. Bertha Fenton Navarro, por tomar parte en mi formación profesional, por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación y por su apoyo durante el desarrollo del mismo.

A mis profesores, por compartir conmigo sus conocimientos. A mis sinodales, la M.C. Ma. De los Dolores López Calvillo, la QFB. Alma Rosa García Ríos y especialmente a la M.F.B. Blanca Nateras Marín por ser una excelente instructora y una persona ejemplar. Por todo lo que me ha enseñado, pero sobre todo por ayudarme a descubrir el camino que quiero seguir.

A todas las personas que de alguna forma estuvieron involucradas en el desarrollo de este trabajo, entre ellas: la M.C. Leticia Pérez Ordaz, la QFB. Griselda Pérez Ordaz y la D.C. Luz Torner Aguilar.

A mis amigos de la Facultad, especialmente a Yaz, Ara, Samy, Nalle, Isme, Vick y Juve, por todos los momentos agradables que compartimos durante estos cinco años.

A todos los integrantes del Laboratorio de Glicobiología por su compañerismo y por hacer agradable el ambiente de trabajo.

A mi novio Roberto Esquivel García, por estar siempre conmigo, en los momentos difíciles y en los fáciles, en el éxito y en el fracaso, en el trabajo duro y en la diversión, a pesar de los problemas, las dificultades y la distancia.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	i
ÍNDICE GENERAL	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE GRÁFICAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	xii
RESUMEN	1
I INTRODUCCIÓN	2
1.USO DE PLANTAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL	2
1.1. MEDICINA TRADICIONAL DE MORELIA Y SUS ALREDEDORES.....	3
1.2. JAMAICA (<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>).....	4
1.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA JAMAICA.....	5
1.2.2. USOS DE LA JAMAICA EN LA MEDICINA TRADICIONAL	5
1.2.3. EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE LA JAMAICA.....	6
2. PIREXIA	10
2.1. CONCEPCIÓN HISTÓRICA	12
2.2. AGENTES INDUCTORES Y SUSTANCIAS NEUROQUÍMICAS.....	13
2.3. FUNCIÓN HIPOTALÁMICA EN LA RESPUESTA FEBRIL.....	15
2.4. COMPONENTE HORMONAL.....	17
2.5. CITOCINAS.....	22
2.5.1. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS.....	23
2.5.2. CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS	26
3. LECTINAS.....	27
3.1. EFECTOS DE LAS LECTINAS EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE.....	29
4. TRATAMIENTO DE LA PIREXIA	33
5. TÉCNICAS PARA LA COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPIRÉTICA	35

II JUSTIFICACIÓN	37
III HIPÓTESIS	38
IV OBJETIVOS.....	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
V MATERIAL	39
VI MÉTODOS.....	39
VII RESULTADOS.....	43
INDUCCIÓN DE FIEBRE	43
EVALUACIÓN ANTIPIRÉTICA	47
EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE CITOCINAS	70
VIII DISCUSIÓN.....	77
IX CONCLUSIONES	88
X PERSPECTIVAS	89
XI REFERENCIAS	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Localización del hipotálamo y los órganos circumventriculares	15
Figura 2. Áreas hipotalámicas	16
Figura 3. Mecanismos de regulación de la temperatura corporal.....	16
Figura 4. Activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y del sistema simpático sistémico durante el proceso febril	17

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Monitoreo de la temperatura del Grupo Cero	48
Gráfica 2. Inducción de fiebre y efecto de la solución salina sobre las ratas con fiebre	50
Gráfica 3. Inducción de fiebre y efecto del paracetamol sobre las ratas con fiebre	51
Gráfica 4. Inducción de fiebre y efecto del extracto crudo de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre	53
Gráfica 5. Inducción de fiebre y efecto de la fracción proteica de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre	54
Gráfica 6. Inducción de fiebre y efecto de los pigmentos de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre	55
Gráfica 7. Temperaturas basales de los grupos tratados	56
Gráfica 8. Incremento de la temperatura rectal inducido con levadura de cerveza	57
Gráfica 9. Temperaturas febriles de los grupos tratados.....	58
Gráfica 10. Efecto de la solución salina sobre las ratas con fiebre	59
Gráfica 11. Efecto del paracetamol sobre las ratas con fiebre	60
Gráfica 12. Efecto del extracto crudo de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre	61
Gráfica 13. Efecto la fracción proteica de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre	62
Gráfica 14. Efecto los pigmentos de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre	63
Gráfica 15. Comparación de los tratamientos	69
Gráfica 16. Concentración de citocinas proinflamatorias en los grupos tratados al finalizar el monitoreo de temperatura	76

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plantas utilizada en la medicina tradicional de Morelia y sus alrededores	4
Tabla 2. Técnicas de inducción de fiebre en modelos animales	36
Tabla 3. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza la primera etapa	44
Tabla 4. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza en la segunda etapa	45
Tabla 5. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza en la tercera etapa	46
Tabla 5. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza en la tercera etapa (continuación)	47
Tabla 6. Monitoreo de la temperatura del Grupo Cero. Sin tratamiento	48
Tabla 7. ANOVA del Grupo Cero. Sin tratamiento	48
Tabla 8. Inducción de fiebre y efecto de la solución salina sobre las ratas con fiebre Grupo A	50
Tabla 9. Inducción de fiebre y efecto del paracetamol sobre las ratas con fiebre Grupo B	51
Tabla 10. Inducción de fiebre y efecto del extracto crudo de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre Grupo C	53
Tabla 11. Inducción de fiebre y efecto de la fracción proteica de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre Grupo D	54
Tabla 12. Inducción de fiebre y efecto de los pigmentos de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre Grupo F	55
Tabla 13. Cuadro comparativo de resultados para los cinco tratamientos	52
Tabla 14. ANOVA de las temperaturas basales de los cinco grupos tratados	56
Tabla 15. Prueba t-student para comparar la temperatura basal con la febril de cada grupo tratado	57
Tabla 16. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni de las temperaturas febriles de los cinco grupos tratados	58
Tabla 17. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni del Grupo A Solución salina	59
Tabla 18. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni del Grupo B Paracetamol	60
Tabla 19. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni del Grupo C Extracto crudo	61

Tabla 20. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni del Grupo D Fracción proteica	62
Tabla 21. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni del Grupo E Pigmentos	63
Tabla 22. ANOVA dos vías <i>post hoc</i> Bonferroni de los cinco tratamientos	64
Tabla 22. ANOVA dos vías <i>post hoc</i> Bonferroni de los cinco tratamientos (continuación).....	65
Tabla 22. ANOVA dos vías <i>post hoc</i> Bonferroni de los cinco tratamientos (continuación).....	66
Tabla 23. Expresión de citocinas en el Grupo A Solución salina.....	70
Tabla 24. Expresión de citocinas en el Grupo B Paracetamol	71
Tabla 25. Expresión de citocinas en el Grupo C Extracto crudo	72
Tabla 26. Expresión de citocinas en el Grupo E Fracción proteica	72
Tabla 27. Expresión de las citocinas en el Grupo F Pigmentos	73
Tabla 28. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni para comparar los niveles de IL-1 α	74
Tabla 29. ANOVA <i>post hoc</i> Bonferroni para comparar los niveles de IL-6.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormona adenocorticotrópica

AMP: Adenin monofosfato

AP-1: Activador de la proteína-1

ASA: Ácido acetilsalicílico

AVP: Arginina vasopresina

BNST: Cama núcleo de la stria terminalis

°C: Grados Celsius

cm: Centímetros

CNS: Sistema nervioso central

COX: Enzima Cicloxigenasa

CRH: Hormona liberadora de corticotropina

CVO: Órganos circumventriculares

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EE: Error estándar

g: Gramos

GH: Hormona del crecimiento

GR: Receptor para glucocorticoides

GRE: Elementos de respuesta a los glucocorticoides

HAs: Antocianinas de *Hibiscus sabdariffa* L.

HPA: Eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

HS: *Hibiscus sabdariffa* L.

Ig: Inmunoglobulina

IGF: Factor de crecimiento de tipo insulina

IL: Interleucina

IMP: Proteína α_1 inflamatoria del macrófago

INF: Interferón

iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible

kDa: Kilodaltones

kg: Kilogramo

KS: Kolmogorov-Smirnov

LAK: Células asesinas activadas por citocinas

LDL: Lipoproteína de baja densidad

LPS: Lipopolisacáridos

M: Molar

MBL: Lectina de unión a manosa

ME: Eminencia media

mg: Miligramos

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

μ L: Microlitros

mL: Mililitros

mmHg: Milímetros de mercurio

mmol: Milimol

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero

NF-κB: Factor nuclear kappa-B

NK: Natural killer

nm: Nanómetros

NO: Óxido nítrico

NSAIDs: Antiinflamatorios no esteroideos

NTS: Núcleo del tracto solitario

OVL: Órgano vascular de la lámina terminal

pg: Picogramos

%: Por ciento

PGE₂: Prostaglandinas E₂

PHA: Fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*

POMC: Propiomelanocortina

PVN: Núcleo paraventricular

rpm: Revoluciones por minuto

SFO: Órgano subfornical

ST: Stria terminalis

T₃: Hormona triyodotironina

T₄: Hormona tiroxina

Th: Células T ayudantes

TNF: Factor de necrosis tumoral

TRH: Hormona liberadora de tiotropina

TSH: Hormona estimulante de la tiroides

VIP: Polipéptido intestinal vasoactivo

VLM: Médula ventrolateral

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Antipirético: sustancia que hace disminuir la fiebre.

Citocina: proteína soluble producida principalmente por monocitos, macrófagos y células T, que regula la respuesta inmunológica e inflamatoria.

Factor de Necrosis Tumoral: proteína del grupo de las citocinas que estimula la fase aguda de la reacción inflamatoria.

Interferón: proteína producida naturalmente por el sistema inmunitario que participa en la regulación de las respuestas inmune e inflamatoria.

Interleucina: proteína soluble de bajo peso molecular mediadora de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades.

Lectina: proteína o glicoproteína de origen no inmune que reconoce de manera específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas.

Pirexia: Elevación de la temperatura corporal producida por un aumento del umbral termorregulador hipotalámico.

Pirógeno: agente capaz de inducir fiebre.

Prostaglandina: molécula de señalización derivada de la oxidación del ácido araquidónico por la enzima ciclooxigenasa, que actúa como mensajero autocrino y paracrino, cuyas principales funciones fisiológicas son la regulación de la memoria, el sueño, la fiebre y el dolor.

RESUMEN

La pirexia o fiebre es un aumento de la temperatura corporal producida por un ajuste del umbral termorregulador hipotalámico. La reacción febril esta mediada por pirógenos endógenos, principalmente citocinas que ejercen un control cerebral. La jamaica es usada para la preparación de bebidas refrescantes y tiene numerosas propiedades medicinales. Dentro de ellas se encuentra su acción contra la fiebre. Por lo que el presente trabajo planteamos el siguiente **Objetivo:** Comprobar la actividad antipirética de extractos de jamaica en animales experimentales con fiebre inducida. **Material y Métodos:** Se utilizaron ratas macho Wistar distribuidas en 6 grupos: Cero: control sin tratamiento; A: control negativo (solución salina), B: control positivo (paracetamol); C: extracto crudo de jamaica; D: fracción proteica de jamaica; y E: pigmentos de jamaica. Se les midió la temperatura rectal con termómetros digitales OMRON antes de la inducción de fiebre, después de la inducción de fiebre, y a los 30, 60, 120, 180 y 240 minutos posteriores a recibir el tratamiento. La fiebre se indujo por medio de una inyección subcutánea de levadura y los tratamientos se administraron vía oral. Al finalizar se extrajo sangre por punción cardiaca y se cuantificaron las citocinas TNF α , IL-1 α , IL-6 e IFN γ por el método de ELISA. **Resultados:** En el grupo Cero la temperatura promedio no varió significativamente. Con la inoculación de levadura se logró un incremento promedio de temperatura de 1°C. El grupo control negativo se mantuvo febril. El control positivo presentó una reducción de la temperatura de casi 2°C. Los extractos de jamaica redujeron aproximadamente 1°C. No se detectó la presencia de las citocinas TNF α ni IFN γ . La IL-1 α se encontró en concentraciones muy bajas, sobre todo en el grupo de la fracción proteica de jamaica y la IL-6 se encontró en altas concentraciones en los tres grupos de jamaica. **Conclusiones:** El extracto crudo, los pigmentos (flavonoides) y la fracción proteica (lectinas) de flor de jamaica presentan actividad antipirética. El mecanismo de acción involucra un incremento en los niveles de IL-6. Hasta donde sabemos, este es el primer reporte en el que se considera la participación de las proteínas en la actividad antipirética.

I INTRODUCCIÓN

1. USO DE PLANTAS EN LA MEDICINA TRADICIONAL

Desde la aparición del hombre sobre el planeta las plantas han jugado un papel muy valioso en lo individual y en lo social, pues han permitido mejorar las condiciones de vida del hombre aprovechando los recursos vegetales en la construcción, fabricación de papel, industria química, industria textil, industria farmacéutica, entre otros (Nava y Zamora, 2001).

Si bien la humanidad ha utilizado las plantas para curarse durante toda su historia, la incidencia de los productos de origen vegetal en la terapéutica ha variado a lo largo de los tiempos de acuerdo con los avances del conocimiento científico, tanto sobre estos productos, como sobre las demás herramientas terapéuticas (Fundaquim *et al*, 2004).

En las últimas décadas, los productos de origen vegetal han vuelto a tener una presencia cada vez mayor en la terapéutica. Su retorno ha sido estimulado por la tendencia del regreso a lo natural que se ha producido en la sociedad, y a otros factores como la falta de éxito de la medicina convencional en la cura de algunas enfermedades, los efectos colaterales que ciertos medicamentos acarrearán, así como el aspecto económico (Fundaquim *et al*, 2004).

En general, el uso de las plantas es más barato y tiene consecuencias secundarias poco agresivas para la salud humana. La contribución de las personas conocedoras de plantas ha mejorado la calidad de vida de los grupos domésticos rurales (Nava y Zamora, 2001).

Actualmente, la importancia de las plantas medicinales es tal que ha captado la atención de instancias internacionales como la Organización Mundial de la Salud. Dicho organismo señala que el 80% de la población de países en desarrollo resuelve sus problemas de salud mediante la medicina alternativa. Esta práctica ha logrado incrementar considerablemente el número de

remedios herbolarios y medicamentos elaborados a partir del material vegetal o de sus extractos (Feria, 2007).

En América Latina, y específicamente en México, encontramos que el interés por las plantas medicinales se remonta a la época prehispánica y al conocimiento que tenían los grupos étnicos como los nahuas y los mayas. Nuestro país ha sido geográficamente privilegiado, ya que posee una de las floras más ricas en el planeta. La diversidad tan grande se manifiesta con la presencia de prácticamente todos los tipos de vegetación que existen gracias a la diferencia de climas con que se cuenta (Estrada, 1996; Alberti, 2006).

La flora vascular mexicana se estima actualmente entre 26,000 a 30,000 especies. De todas ellas entre 10,000 a 15,000 especies son endémicas, lo que representa del 40-50% de la flora. Pero además, de los 2,410 géneros de la flora mexicana, el 12% son endémicos, lo que supone uno de los más altos porcentajes del mundo (Sánchez, 2003).

La población recurre a las plantas para curar enfermedades del aparato digestivo, del aparato reproductor, enfermedades respiratorias, entre otras. La complejidad de los padecimientos que buscan ser aliviados con este recurso va desde un simple resfriado hasta el cáncer. En México se utilizan más de 6,000 especies con fines terapéuticos, de las cuales solo el 10% han sido estudiadas a nivel farmacológico, microbiológico y fitoquímico, es decir, que únicamente el 10% tienen un respaldo científico de su uso popular (Didier, 1995; <http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/plantas-medicinal/tabla2html>).

1.1. MEDICINA TRADICIONAL DE MORELIA Y SUS ALREDEDORES

En la ciudad de Morelia y sus alrededores, de acuerdo a la información proporcionada por personas conocedoras de las plantas, las partes más utilizadas en los remedios son las hojas, flores y tallos. La forma de preparación y administración al paciente consiste fundamentalmente en infusiones y casi la mitad de las especies medicinales de la comunidad son

usadas para contrarrestar malestares en el aparato digestivo, mismos que van desde un simple dolor de estómago hasta la diabetes. Algunos ejemplos de plantas utilizadas en la región se muestran en la tabla 1 (<http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/plantas-medicinal/plantas-tradic.html>)

Tabla 1. Plantas utilizada en la medicina tradicional de Morelia y sus alrededores

NOMBRE COMÚN	NOMBRE CIENTÍFICO	USO	PARTE USADA	MODO DE EMPLEO
Estafiate	<i>Artemisia ludoviciana Nutt ssp.</i>	Padecimientos del aparato digestivo	hojas y tallos	infusión
Gordolobo	<i>Gnaphalium spp.</i>	Tos	flores	Infusión
Cola de caballo	<i>Equisetum hyemale L.</i>	Malestares del riñón y diabetes	tallos	infusión
Maravilla	<i>Mirabilis jalapa Lim.</i>	Golpes	raíz	cocida en alcohol y aplicada
Malva	<i>Malva rotundifolia L.</i>	Sordera	hojas	hojas calientes en el oído
Jamaica	<i>Hibiscus sabdariffa L.</i>	Diurético	Flores	infusión

<http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/plantas-medicinal/tabla2.html>

1.2. JAMAICA (*Hibiscus sabdariffa L.*)

La jamaica, *Hibiscus sabdariffa L.* (HS), es una planta hermafrodita anual o bianual, herbácea o subarborescente de la familia Malvaceae, originaria de África, que alcanza una altura de 0.5 a 3 metros, con los tallos robustos y leñosos en su base, de color morado, rojo brillante o verde, hojas digitopartidas en tres lóbulos crenado dentados, flores solitarias, sésiles, con el cáliz y las brácteas gruesas y rojas, de sabor ácido, corola amarilla, fruto y una cápsula (Jínez *et al.*, 1998).

Es una planta silvestre o cultivada en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, aprovechada por su fibra, usos alimenticios y medicinales. Debido a sus características organolépticas, la flor se emplea principalmente para la preparación de bebidas refrescantes, infusiones exentas de cafeína, gelatinas, vinos, mermeladas, ates, jalea, helados y otros derivados. También

es frecuentemente utilizada como corrector del sabor (Jínez *et al.*, 1998; Vanaclocha, Cañigüeral y Vanaclocha, 2003; Qi *et al.*, 2005).

1.2.1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA JAMAICA

La planta contiene proteínas grasas, carbohidratos, flavonoides, ácidos, minerales y vitaminas. Entre sus principales constituyentes destaca el contenido de ácidos orgánicos (15-30%), entre los que se encuentran los ácidos cítrico, málico, tartárico y la lactona del ácido (+)-alohidroxicítrico, conocida como ácido hibiscico, que es característico de la planta. El color rojo de las flores se debe a su contenido de antocianinas (aproximadamente 1.5%), 3-O-sambubiosil-delfinidina (hibiscina), 3-O-glucosil-delfinidina, delfinidina, 3-O-sambubiosil-cianidina y 3-O-β-D-glucopiranosil-cianidina. Contiene otros polifenoles, como los flavonoides quercetina, miricetina, hibiscetina, hibiscitrina y 3-O-glucosil-gosipetina y ácidos fenoles como los ácidos protocatéuico, o-cumárico, p-cumárico y ferúlico (Vanaclocha, Cañigüeral y Vanaclocha, 2003; Mahadevan *et al.*, 2009).

Contiene también polisacáridos mucilaginosos y pectinas, entre los que destaca un ramnogalacturonano, acompañado, en menor proporción, por un arabinogalactano y un arabinano, trazas de aceite esencial (como eugenol) y fitoesteroles (Vanaclocha, Cañigüeral y Vanaclocha, 2003).

Adicional a estos componentes, en el año 2008 se reportó la presencia de más de un tipo de lectinas en el extracto acuoso de flor de jamaica (Martínez y Fenton, 2008).

1.2.2. USOS DE LA JAMAICA EN LA MEDICINA TRADICIONAL

La infusión de jamaica constituye una bebida social a la que se le atribuyen propiedades: antipiréticas, emolientes, diuréticas, espasmolíticas, antibacterianas, antihipertensivas, antiescorbútics, colagogas e incluso

antihelmínticas; también ha sido utilizada como estimulante del apetito, laxante suave, diurético, en resfriados, desórdenes hepáticos y trastornos circulatorios. Algunas veces llega a ser empleada como antídoto para envenenamiento con sustancias químicas como pesticidas y hongos venenosos (Vanaclocha, Cañigueral y Vanaclocha, 2003; Mohamed y Subramanian, 2007; Márquez *et al.*, 2007).

1.2.3. EFECTOS FARMACOLÓGICOS DE LA JAMAICA

Existen numerosos estudios en los que se evalúan los potenciales efectos farmacológicos de extractos de jamaica, muchos de los cuales atribuyen sus hallazgos a la gran cantidad de pigmentos que se encuentran en la planta (0.49g de flavonoides/100g de flores) y a que dichos pigmentos presentan actividad antioxidante. Algunos de ellos se reseñan a continuación (Humadi e Istudor, 2008; Márquez *et al.*, 2007; Mohamed y Subramanian, 2007; Amin y Hamza, 2006; Ali *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003).

El extracto etanólico de flor de jamaica fue administrado durante 26 días en ratas que después se intoxicaron con cisplatino, un inductor de daño en la reproducción. El extracto produjo reducción de las anomalías espermáticas inducidas por el cisplatino. Al estudiarse el mecanismo protector se observó que restablece el nivel del malondialdehído (un marcador de peroxidación lipídica) en los testículos, a los valores control. Además regulariza los niveles de superóxido dismutasa, glutatión reducido y catalasa. Por ello se deduce que el tratamiento previo con jamaica incrementa la actividad de enzimas antioxidantes testiculares y restablece la motilidad espermática; se sugiere que el efecto protector está mediado por su actividad antioxidante (Amin y Hamza, 2006).

Odigie y colaboradores en el 2003 evaluaron el efecto del extracto etanólico sobre un perfil de lípidos séricos. Las ratas fueron alimentadas durante cuatro semanas con una dieta basal, al grupo control se le dio agua y a otro grupo el extracto de jamaica. Monitoreando la presión sanguínea y la frecuencia

cardiaca a las ocho semanas se encontró una disminución de la presión sistólica y reducción de la frecuencia cardiaca en el grupo al que se le dio jamaica. El peso del corazón fue menor también en este grupo. La creatinina sérica y los electrolitos en plasma no fueron diferentes a los controles. Los resultados sugieren que el extracto de jamaica exhibe efectos antihipertensivos y cardioprotectores (Odigie *et al.*, 2003).

Se investigó el efecto del extracto acuoso y de las antocianinas de *Hibiscus* (HAs) sobre la hepatotoxicidad inducida por paracetamol en ratas. El extracto acuoso se dio en forma de agua durante 2, 3 o 4 semanas consecutivas, y las HAs se administraron vía oral en dosis de 50, 100 y 200mg/kg durante cinco días consecutivos. El paracetamol se administró también vía oral en dosis de 700mg/kg para inducir la hepatotoxicidad al final de los tratamientos ya mencionados. Seis horas después las ratas se sacrificaron y se evaluó su función hepática bioquímica e histológicamente. El tratamiento de cuatro semanas con el extracto mejoró significativamente algunas de las funciones hepáticas evaluadas pero no alteró la histología del tejido intoxicado. Con la dosis de 200mg/kg de HAs, la histología hepática y los índices bioquímicos volvieron a la normalidad. Las dosis más bajas fueron inefectivas. Con ello se demuestra el potencial efecto hepatoprotector tanto del extracto acuoso, como de las antocianinas (Ali *et al.*, 2003).

En otro estudio, se utilizó lipopolisacárido para inducir a la óxido nítrico sintasa hepática (iNOS) y se encontró que el ácido protocatéquico contenido en la jamaica disminuye su producción, así como el nitrito sérico total. La investigación mostró que el pretratamiento de ratas con ácido protocatéquico (0.2 y 0.5mmol/kg) durante cinco días disminuyó significativamente los niveles séricos de los marcadores hepáticos enzimáticos alanina aminotransferasa y aspartato aminotransferasa inducidas por un tratamiento con lipopolisacárido (5mg/kg vía intraperitoneal). La evaluación histopatológica reveló que el ácido protocatéquico reduce la incidencia de lesión hepática, incluyendo infiltración de neutrófilos, congestión e inflamación de los hepatocitos inducida por lipopolisacárido. Se concluyó que el ácido protocatéquico, un antioxidante,

presenta potencial inhibitorio de la iNOS y daño hepático inducido por lipopolisacárido (Lin *et al.*, 2003).

La fracción etanólica de un extracto liofilizado y el extracto total acuoso (infusión) de flor de jamaica presentaron efecto diurético en ratas albino Wistar, al tener un comportamiento similar al de un control positivo de hidroclorotiazida. Sin embargo el tratamiento con la fracción etanólica presentó una diuresis no electrolítica, lo que implica que su mecanismo de acción es diferente al de la hidroclorotiazida. En el mismo estudio se hizo una evaluación de daño histopatológico, para lo cual se administraron 2mL de extracto total acuoso liofilizado disuelto en agua destilada a una concentración de de 400mg/kg de peso a las ratas durante 8 días y no se observaron alteraciones macromorfológicas ni histopatológicas (Márquez *et al.*, 2007).

El extracto acuoso de flores de *Hibiscus sabdariffa L.* se probó en un modelo experimental de tránsito intestinal. A un grupo de ratas albinas se les administró un extracto al 10% en dosis de 0.5, 1 y 2mL por cada 100g de peso corporal, encontrándose una reducción dosis dependiente en el tránsito intestinal, lo que indica una disminución de la motilidad intestinal. Esta propiedad se propuso que puede deberse al contenido de pectinas (3.19%) en el extracto que podrían formar soluciones coloidales, o a una relajación del músculo liso intestinal. El mecanismo no está esclarecido, pero se puede concluir que la jamaica puede ser útil en el control de la diarrea (Owulade *et al.*, 2004).

El extracto acuoso de las flores de jamaica previene varios tipos de hiperlipidemias en ratas con una dieta alta en fructosa y colesterol; además este extracto reduce los triglicéridos en suero de ratas con una dieta alta en fructosa. Las antocianinas de la jamaica mostraron inhibición de la oxidación de lipoproteína de baja densidad (LDL) inducida por cobre, así como también inhibición de la apoptosis de macrófagos inducida por la lipoproteína de baja densidad oxidada (ox-LDL), por lo que actúan como agentes antioxidantes (Márquez *et al.*, 2007).

Se determinó la dosis letal media y el efecto del extracto de jamaica sobre la presión arterial. La dosis letal media se estimó superior a 5000mg/kg. Se encontró que la infusión disminuye significativamente tanto la presión sistólica como la diastólica en ratas espontáneamente hipertensas y normotensas Wistar-Kioto en dosis de 500 y 1000mg/kg de peso corporal. El consumo continuo de la infusión en dosis de 1000mg/kg produce una muerte súbita en las ratas hipertensas pero no en las normotensas. Durante el desarrollo del experimento se observó que el consumo de agua de los animales tratados con respecto a los controles fue igual, sin embargo la excreción urinaria de las ratas hipertensas tratadas fue significativamente mayor. Hubo una reducción significativa en la creatinina sérica, colesterol y glucosa en las ratas tratadas, comparadas con el control, así como también un incremento significativo en el ácido úrico sérico. El mecanismo hipotensor es mediado por mecanismos que involucran acetilcolina e histamina y vía efecto vasorelajante directo (Onyenekwe *et al.*, 1999; Reanmongkol *et al.*, 2007).

Reanmongkol y colaboradores en el 2007 evaluaron la respuesta nociceptiva, antipirética y antiinflamatoria de extractos acuosos y etanólicos de flor de jamaica. Realizaron una prueba de toxicidad aguda y no observaron efectos tóxicos después de administrar dosis de 15g/kg de peso corporal de los extractos acuosos y etanólicos durante siete días en ratones, por lo que determinaron que su consumo es inocuo. En cuanto a la respuesta nociceptiva se realizaron tres pruebas en ratones: contorsión, plato caliente y formalina. En la primera prueba la administración oral de 800mg/kg del extracto etanólico inhibió significativamente el número de contorsiones y estiramientos inducidos a través de una inyección intraperitoneal de ácido acético 0.6%. El extracto acuoso no mostró efecto. La droga de referencia, aspirina (200mg/kg), también produjo efecto protector significativo. Lo que muestra que el extracto etanólico podría poseer efecto analgésico. En la segunda prueba, la del plato caliente, ninguno de los extractos ni la aspirina mostraron efecto protector sobre el dolor inducido por calentamiento en ratones. En la prueba de formalina ninguno de los extractos presentó efecto pero la aspirina sí. Para evaluar la respuesta antipirética utilizaron el modelo de fiebre inducida por levadura de cerveza. Los resultados fueron que tanto el extracto etanólico (400, 800mg/kg) como el

acuoso (800mg/kg), y la aspirina, redujeron significativamente la fiebre. Finalmente en la evaluación de la respuesta antiinflamatoria ninguno de los extractos tuvo efecto sobre el edema inducido por carragenina. Por lo anterior se concluyó que el efecto antipirético de los extractos de flor de jamaica, al no presentar efectos analgésicos ni antiinflamatorios, se lleva a cabo por un mecanismo diferente al de la aspirina. El extracto de *Hibiscus sabdariffa* podría estar involucrado en la inhibición de algunas de las sustancias inductoras de fiebre, como las citocinas (Reanmongkol *et al.*, 2007).

Finalmente, ya se han llevado a cabo estudios clínicos del empleo de jamaica en la hipertensión. En un estudio realizado por el Hospital Regional General, del Instituto Mexicano del Seguro Social en Cuernavaca (Morelos, México) se reclutaron pacientes con hipertensión de grado I y II, de ambos géneros, y con edades comprendidas entre 25 y 61 años. Se establecieron dos grupos de tratamiento, en los que se administró diariamente un extracto seco de jamaica (con un contenido de 250mg de antocianinas totales por dosis), o 10mg de lisinopril (antihipertensivo inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina) como grupo control, durante 4 semanas. Los resultados mostraron que el tratamiento con el extracto de jamaica disminuyó la presión arterial de 146.47/97.77 a 129.89/85.96mmHg (11.58%/12.21%). La efectividad observada fue del 65%, siendo un tratamiento seguro y bien tolerado (Herrera *et al.*, 2007).

2. PIREXIA

La pirexia o fiebre se define como la elevación de la temperatura corporal producida por un aumento del umbral termorregulador hipotalámico. Es la manifestación sistémica más común de la respuesta inflamatoria y un síntoma importante de las enfermedades infecciosas (Jawetz, Melnick y Adelberg, 2005; Cunningham, 2003).

Clínicamente, la fiebre se define como una temperatura corporal de 1°C o más arriba de la desviación estándar promedio en el sitio de registro, siendo

aceptados en el humano 38°C en una medición rectal, 37.6°C en una medición bucal y 37.2°C en una medición axilar (El-Radhi y Carroll, 1996).

La fiebre se caracteriza por tres fases. La primera es la fase de elevación de la temperatura, en la que se presentan artralgiyas, mialgias, cefaleas, depresión, palidez y malestar general. Se incrementan la producción y conservación de calor, por lo que el paciente se siente frío al tacto. A continuación se presenta la fase de estabilización, en la que la temperatura asciende hasta el nuevo nivel termorregulador fijado. La producción y pérdida de calor se equilibran en este nuevo punto de ajuste y el paciente luce sonrojado. Finalmente se produce la fase de descenso de temperatura o defervescencia que inicia con un nuevo ajuste al centro termorregulador hipotalámico con pérdida de calor de forma brusca (crisis) o lenta (lisis) por medio de sudación (El-Radhi y Carroll, 1996; <http://www.odon.edu.uy/cafispat/fiebre/fiebre.htm>).

Durante la fiebre aumenta el metabolismo basal en un 10-12% por cada grado centígrado de temperatura, predominando las vías catabólicas que incluyen la proteólisis a nivel muscular. Como consecuencia se produce taquipnea (incremento de la frecuencia respiratoria en casi 2.5 respiraciones/minuto por cada 1°C de elevación de temperatura) y taquicardia (aumento de 10 latidos/minuto por cada 1°C de elevación de temperatura) para atender la mayor demanda periférica de oxígeno y nutrientes (Guinart y López, 1997; El-Radhi y Carroll, 1996).

Es importante señalar que la fiebre es un mecanismo innato de defensa. Entre los efectos beneficiosos de la fiebre están el de favorecer la activación del sistema de complemento, la activación y proliferación linfocitaria, aumento de la liberación medular de granulocitos, acción quimiotáctica sobre neutrófilos y macrófagos, y la síntesis de citocinas y anticuerpos. Además, está demostrado que varios microorganismos son sensibles a temperaturas elevadas (Chirinos, 1996; Guinart y López, 1997).

En general, la fiebre no representa, ningún riesgo importante cuando sube entre 3 y 3.5°C. Sin embargo a partir de 41°C puede causar convulsiones en

los niños y cuando supera los 42°C puede producir lesiones cerebrales irreversibles por despolarización de la membrana de los tejidos excitables. La despolarización en el cerebro induce la liberación de aminoácidos excitatorios que producen daño cerebral a través de la inducción de la producción excesiva de óxido nítrico. Algunas otras consecuencias de la fiebre elevada son el desequilibrio hidroiónico causado por el exceso de sudación, precipitación de insuficiencias cardíacas o coronarias latentes y descompensación hepática o diabética (<http://www.odon.edu.uy/cafispat/fiebre/fiebre.htm>).

2.1. CONCEPCIÓN HISTÓRICA

Las más antiguas civilizaciones como: la egipcia, mesopotámica, china, indostana y griega, a pesar de tener un amplio conocimiento de anatomía y fisiología, consideraban a la fiebre como una enfermedad causada por una posesión demoníaca. Los sacerdotes sumerios expulsaban a los espíritus malignos causantes de la fiebre mediante exorcismos, mientras que los sanadores védicos preparaban remedios a base de hierbas y hacían hechizos con la misma finalidad. Los antiguos chinos pensaban que las plantas poseían una fuerza espiritual capaz de curar a los enfermos, por lo que golpeaban a los pacientes febriles con ramas de durazno para expulsar a los espíritus que producían la fiebre. En contraste con estas culturas, los hebreos no consideraban a la fiebre como posesión, pero en el Antiguo Testamento la fiebre era considerada como parte del castigo divino por el pecado (El-Radhi y Carroll, 1996).

En la antigua Grecia la fiebre era considerada un signo benéfico. Los sabios griegos, incluyendo a Hipócrates, pensaron que el cuerpo estaba formado por cuatro humores o jugos: sangre, flema, bilis amarilla y bilis negra, y consideraban que la enfermedad se presentaba cuando había exceso o deficiencia de uno de estos humores. En las enfermedades febriles se pensaba que había exceso de flema y que la función de la fiebre era cocinar el exceso del humor y alejarlo del cuerpo. Hipócrates no le dio importancia al tratamiento

de la fiebre puesto que consideraba a la naturaleza como la mejor medicina (Álpizar y Medina, 1999; El-Radhi y Carroll, 1996).

En el siglo XVI, Santorio Sanctorius, inventó un termoscopio con escala graduada que representó el primer termómetro de la historia. Años después el médico inglés Thomas Sydenham hizo una descripción de enfermedades febriles, en la que incluye su famosa afirmación: "La fiebre es el motor que la naturaleza brinda al mundo para la conquista de sus enemigos". Este concepto beneficioso de la fiebre se mantuvo alrededor de 2 000 años (Álpizar y Medina, 1999; El-Radhi y Carroll, 1996).

Hacia mediados del siglo XIX, Claude Bernard, reconocido fisiólogo francés, demostró que los animales morían cuando su temperatura corporal normal excedía de 5 a 6°C. A partir de entonces se le consideró a la fiebre como algo dañino, y debido a ello, con la posterior introducción de los antipiréticos, el tratamiento farmacológico de la fiebre fue muy difundido (El-Radhi y Carroll, 1996).

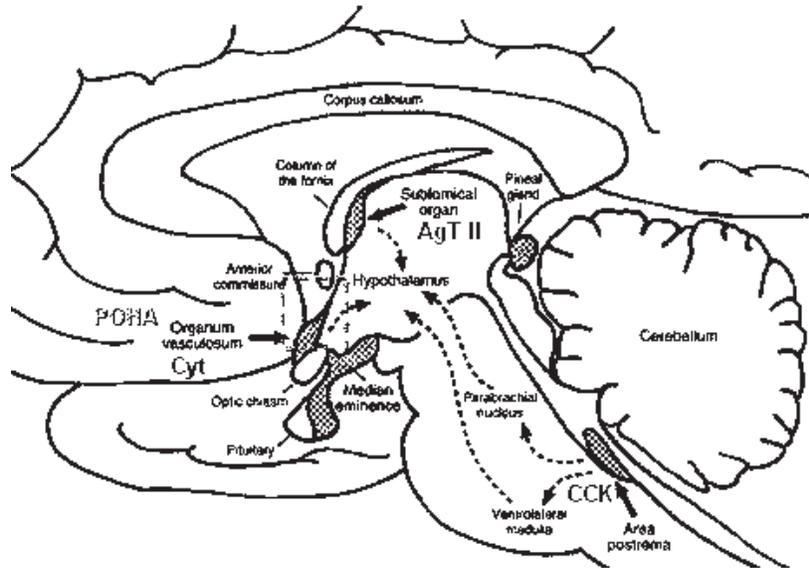
Casi un siglo después (mediados del XX), el concepto acerca del papel de la fiebre empezó a cambiar gradualmente con los avances sobre el conocimiento de su patogenia. Para 1948 el doctor Dubois expresó: "La fiebre sólo es un síntoma, y no estamos muy seguros que sea un enemigo, tal vez sea un amigo". El conocimiento actual sugiere que la fiebre aumenta la actividad de los sistemas defensivos, sin embargo en muchos casos es necesario combatirla para evitar complicaciones mayores y mejorar el estado del paciente (El-Radhi y Carroll, 1996; <http://www.odon.edu.uy/cafispat/fiebre/fiebre.htm>).

2.2. AGENTES INDUCTORES Y SUSTANCIAS NEUROQUÍMICAS

La reacción febril se inicia por los efectos de agentes inductores externos conocidos como pirógenos exógenos, entre los que se encuentran: bacterias grampositivas, endotoxinas de bacterias gramnegativas, hongos, parásitos, polen, polvo, vacunas, cuerpos nitrados de fenol, proteínas o productos de

desintegración de éstas y fármacos. Estos agentes estimulan a monocitos, macrófagos, células del sistema retículoendotelial, fibroblastos, linfocitos o células neoplásicas, infectadas por virus y otras, para la producción de pirógenos endógenos, principalmente citocinas, entre las que se encuentran la interleucina 1 α y β (IL-1 α e IL-1 β), la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α y β (TNF α y TNF β), el interferón γ (IFN γ) y la proteína α_1 inflamatoria del macrófago (MIP) (Padilla, 2009; Álpizar y Medina, 1999; Silverman *et al.*, 2005).

Las señales de la periferia podrían estar accedando al cerebro por medio de tres rutas: 1) vía fibras aferentes que viajan principalmente a través del nervio vago y hacen su primera sinapsis en el núcleo del tracto solitario; 2) vía órganos circumventriculares, como el órgano vascular de la lámina terminal (OVLT) y el órgano subfornical (SFO), que carecen de barrera hematoencefálica (figura 1); y 3) vía interacción con células localizadas en la interfase sangre-cerebro, como las células perivasculares y endoteliales. La activación de estas vías aferentes produce un incremento en los niveles de prostaglandinas E_2 (PGE $_2$), promoviendo su síntesis a través de la estimulación de la enzima cicloxigenasa (COX). Esta prostaglandina difunde hasta el núcleo ventromedial preóptico y paraventricular hipotalámico (figura 2) donde produce la elevación del punto prefijado hipotalámico. Interactúa con los receptores EP $_3$ y con ello disminuye el nivel intracelular de AMP cíclico en las neuronas preópticas y produce la liberación de citocinas en los sitios terminales y distales de las neuronas responsables de los componentes autonómicos, endocrinos y conductuales de la respuesta febril (Padilla, 2009; Álpizar y Medina, 1999; Martínez y Rivas, 2005; Almeida *et al.*, 2004).



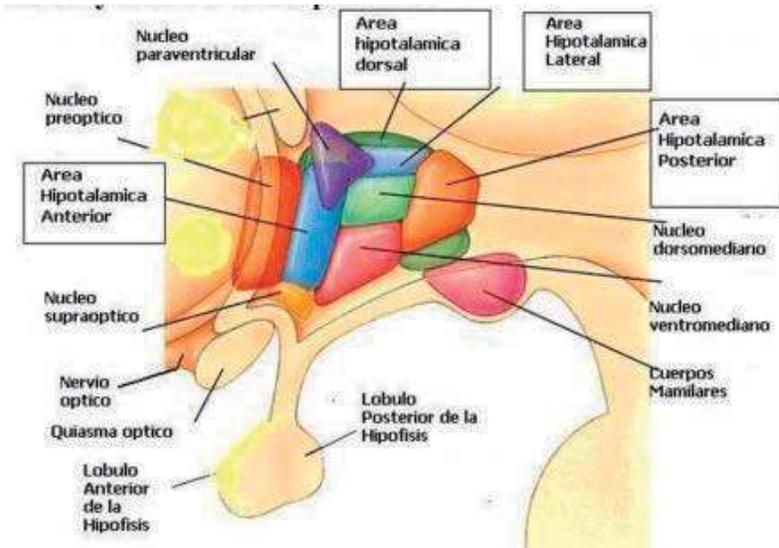
(www.endotext.org/.../neuroendo3b_4.htm)

Figura 1. Localización del hipotálamo y los órganos circumventriculares.

2.3. FUNCIÓN HIPOTALÁMICA EN LA RESPUESTA FEBRIL

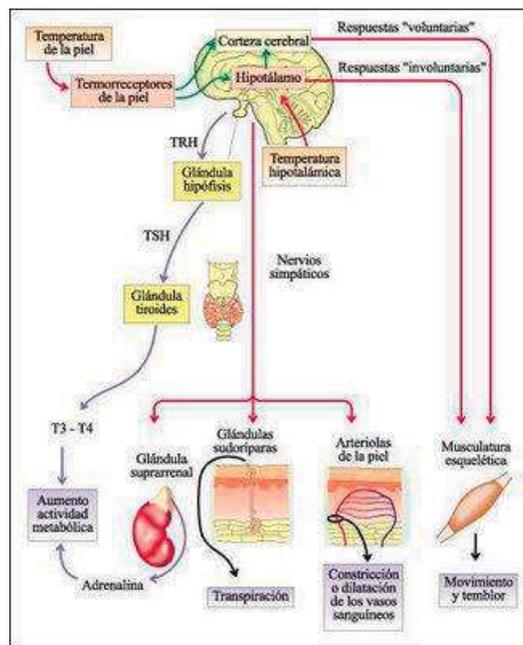
A partir de la formación del pirógeno endógeno se desencadenan los mecanismos ya mencionados que culminan en la elevación térmica. Con el ajuste del centro termorregulador, la zona preóptica del hipotálamo anterior envía señales aferentes tanto inhibitorias como excitatorias a núcleos localizados en el hipotálamo, cerebro medio y médula espinal que están involucrados en el control de la actividad termoeffectora. El incremento en la termogénesis se produce al estimular la zona dorsomedial del hipotálamo posterior (figura 2), donde hay neuronas que transmiten impulsos a través del tronco encefálico hacia las columnas laterales de la médula y de ahí, a las motoneuronas del asta anterior. Estos estímulos aumentan el tono de los músculos esqueléticos hasta alcanzar un determinado nivel crítico. Por otra parte la excitación de los núcleos simpáticos del hipotálamo posterior produce vasoconstricción periférica, que lleva a evitar la pérdida de calor. Esta fase de aumento progresivo de la temperatura persiste hasta que la temperatura de la sangre que irriga el hipotálamo sea igual al nuevo nivel del punto de ajuste. El equilibrio entre producción y pérdida de calor se mantiene en un nivel superior al basal mientras el pirógeno endógeno este presente. Con su desaparición se

desarrollan mecanismos de pérdida de calor, principalmente a través de la vasodilatación, sudación e inhibición de la termogénesis, que tienden a revertir la temperatura del organismo a un valor comprendido en el rango de la normalidad (figura 3) (El-Radhi y Carroll, 1996; Almeida *et al.*, 2004; <http://www.odon.edu.uy/cafispat/febre/febre.htm>).



(http://grupos.emagister.com/imagen/areas_y_nucleos_del_hipotalamo/t98977-0.jpg)

Figura 2. Áreas hipotálamicas.

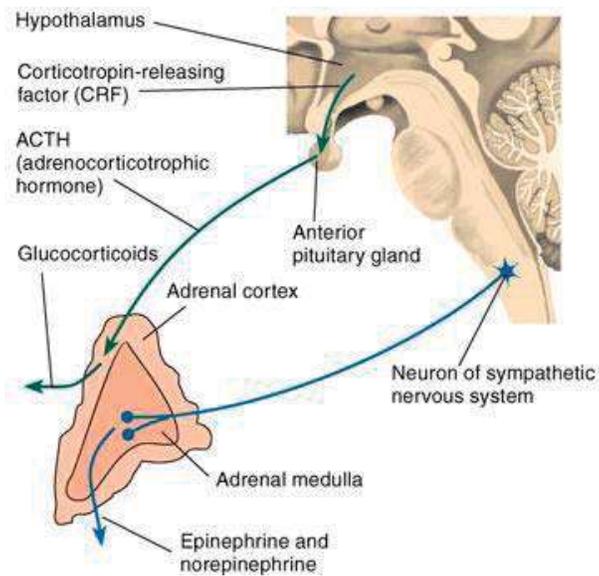


(<http://forofarmaceutico.blogspot.com/2008/12/olas-de-calor-efectos-sobre-la-salud.html>)

Figura 3. Mecanismos de regulación de la temperatura corporal.

2.4. COMPONENTE HORMONAL

La fiebre está integrada por una respuesta hormonal en la que participa el sistema de estrés constituido por el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y el sistema simpático sistémico, cada uno de los cuales tiene componentes centrales de regulación, localizados en el hipotálamo y el tronco encefálico, respectivamente (Eskandari *et al.*, 2003).



(<http://homepage.psy.utexas.edu/HomePage/Class/Psy308/Salinas/Autism/HPA.GIF>)

Figura 4. Activación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA) y del sistema simpático sistémico durante el proceso febril.

El estrés inflamatorio se desencadena por la acción de varias citocinas sobre el sistema nervioso central, las principales son la IL-1, los factores de necrosis tumoral y la IL-6. Las citocinas activan el sistema de estrés a través de las prostaglandinas, que actúan sobre neuronas localizada en el hipotálamo. Además, las citocinas también pueden actuar directamente sobre la hipófisis anterior y sobre la corteza suprarrenal (Chirinos, 1996).

Cuando se activa el eje HPA, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es secretada por neuronas originadas en la división parvocelular del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo, que terminan en la capa externa de la eminencia media (ME), liberando la CRH hacia la circulación portal hipofisaria.

Las neuronas secretoras de CRH del PVN reciben impulsos convergentes de múltiples áreas del cerebro. Estas vías aferentes incluyen proyecciones de: a) la vía noradrenérgica ascendente del tallo cerebral (de la médula ventrolateral (VLM) y del núcleo del tracto solitario (NTS)) que transmite información sensorial visceral; b) las vías cortical y límbica descendentes (provenientes del septum, amígdala e hipocampo) a través de la cama núcleo de la stria terminalis (BNST)) que transmite información cognitiva y emocional; c) conexiones intrahipotalámicas que reciben información del tallo cerebral y estructuras límbicas; y d) órganos circumventriculares (CVO) como el OVLT y SFO que transmiten señales quimiosensoras del torrente sanguíneo. Por lo tanto, las neuronas secretoras de CRH están situadas estratégicamente para interceptar y dispersar señales desde y hacia todo el cuerpo que involucran tanto el ambiente interno como el externo, lo que permite que la CRH coordine las respuestas conductuales, neuroendocrinas y autonómicas (Silverman *et al.*, 2005; Eskandari *et al.*, 2003).

La CRH actúa sobre los receptores CRH-R₁ para estimular la liberación de hormona adenocorticotrópica (ACTH) por la hipófisis anterior a partir de los depósitos celulares y, posteriormente estimula la síntesis del precursor de ACTH, el péptido proopiomelanocortina (POMC) para reponer los depósitos. En presencia de CRH, la arginina vasopresina (AVP) actúa sinérgicamente para potenciar la liberación de ACTH vía el receptor V1b de vasopresina. La ACTH liberada a la circulación periférica estimula la liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y otros primates; corticosterona en roedores) por la corteza adrenal actuando en el receptor MC2-R (receptor tipo 2 de melanocortina). Los glucocorticoides regulan una amplia variedad de genes relacionados con la inmunidad y la expresión y función de las células inmunológicas. Dirigen la respuesta que consiste en la rápida movilización de energía (glucosa, aminoácidos, y ácidos grasos) de los depósitos hacia los músculos y el cerebro, lo que implica un incremento del gasto cardíaco, la presión sanguínea y la respiración para facilitar el transporte rápido de nutrientes y oxígeno a los tejidos principales (Silverman *et al.*, 2005; Eskandari *et al.*, 2003).

Los glucocorticoides modulan la expresión de citocinas, moléculas de adhesión, quimioattractores y otros mediadores inflamatorios; también afectan el tráfico, la migración, la maduración y la diferenciación celular. Promueven un cambio en la respuesta inmune, de Th1 (inmunidad celular) a Th2 (inmunidad humoral); de un padrón proinflamatorio de citocinas con IL-1 y TNF α incrementados, a un padrón antiinflamatorio con aumento de IL-10 e IL-4. Las dosis fisiológicas de glucocorticoides no son completamente inmunosupresivas pero pueden contribuir y regular específicamente la respuesta inmune bajo ciertas circunstancias (Eskandari *et al.*, 2003).

Estas moléculas ejercen sus efectos inmunomoduladores a través de un receptor esteroidal citosólico, el receptor para glucocorticoides (GR). Este es un factor de transcripción ligando-dependiente, que después de unirse a su ligando, se disocia de un complejo de proteínas, dimeriza y se transloca al núcleo donde se une a secuencias específicas del DNA (elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE)) para regular la transcripción. El GR también puede intervenir con otros factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (NF- κ B) y el activador de la proteína-1 (AP-1), para reprimir la transcripción; es a través de estos mecanismos que la mayoría de las acciones antiinflamatorias están mediadas (Silverman *et al.*, 2005; Eskandari *et al.*, 2003).

Gran parte de los efectos inmunosupresores y antiinflamatorios de los glucocorticoides (independientemente del tipo celular) resulta de uno de los siguientes mecanismos: inhibición de la síntesis o de sus receptores, inducción de la producción de lipocortina-1, que inhibe la síntesis de eicosanoides, o inhibición de la síntesis de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II y moléculas de adhesión intercelular, involucradas en la interacción directa entre las diversas células del sistema inmune. Todas las células nucleadas del cuerpo expresan receptores de glucocorticoides, por eso los efectos de estas moléculas se presentan en prácticamente todos los sistemas (metabólico, endócrino, nervioso, cardiovascular, inmune) (Silverman *et al.*, 2005; Eskandari *et al.*, 2003; Chirinos, 1996).

Los glucocorticoides inhiben la mielopoyesis y la expresión de moléculas MHC de clase II inducida por el IFN en los macrófagos; inhiben la adhesión de los neutrófilos a las células endoteliales, lo que disminuye el reclutamiento de neutrófilos en sitios de inflamación; disminuyen el número de eosinófilos y basófilos circulantes; inhiben el aumento de la permeabilidad vascular en los lugares de inflamación y la expresión de diversas moléculas implicadas en la interacción adhesiva entre los leucocitos y las células endoteliales; inhiben la función de las células natural killer (NK); suprimen la función de las células dendríticas y estimulan la acción de las citocinas inflamatorias sobre los hepatocitos, favoreciendo la respuesta hepática de fase aguda (Chirinos, 1996).

La actividad del eje HPA también necesita ser controlada, por lo cual los glucocorticoides ejercen una retroalimentación negativa en el hipotálamo y la pituitaria para inhibir la síntesis y secreción de CRH y POMC/ACTH respectivamente. Además, la retroalimentación negativa de glucocorticoides causa una reducción en la expresión de CRHR1 mRNA, un decremento en el número de CRHR1, y consecuentemente, la desensibilización de la corticotropina por el efecto estimulante de la CRH sobre la liberación de ACTH. Adicionalmente, el hipocampo, que presenta una alta densidad de GR, ejerce una influencia negativa en el PVN y en la actividad del eje HPA (Silverman *et al.*, 2005; Eskandari *et al.*, 2003).

La hormona del crecimiento (GH) también participa en la modulación del sistema inmune. Sus efectos están mediados principalmente a través de factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1). La GH y el IGF-1 modulan el sistema inmune induciendo la sobrevivencia y proliferación de células linfoides, por lo que se piensa que actúan como citocinas. Así, células inmunológicas incluyendo linfocitos T y B y células mononucleares expresan el receptor IGF-1. Al unirse a su receptor la GH activa las vías de la fosfoinositol-3-cinasa (PI₃K/Akt) y el NF-κB conduciendo a la expresión de genes involucrados en el ciclo celular. La GH podría también modular la respuesta inmune al interactuar con otros sistemas hormonales. Así, un incremento con

corta duración de glucocorticoides eleva la producción de GH, mientras que a largo plazo altas dosis de glucocorticoides resultan en su disminución (Eskandari *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 2005).

La hormona liberadora de tirotropina (TRH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH), y las hormonas tiroideas triyodotironina (T_3) y tiroxina (T_4) tienen efectos estimulantes sobre las células inmunológicas. Se sugiere que protegen de los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides. La inflamación inhibe la secreción de TSH por el efecto inhibitorio de las citocinas sobre la TRH. La IL-1 suprime la secreción de TSH, mientras que la IL-2 estimula el eje pituitaria-tiroides (Eskandari *et al.*, 2003; Silverman *et al.*, 2005).

El sistema nervioso simpático regula al sistema inmune a nivel regional, local y sistémico. Los órganos del sistema inmune (timo, bazo, nódulos linfáticos) están inervados por nervios simpáticos. Las células inmunológicas también expresan receptores para neurotransmisores, como receptores adrenérgicos en los linfocitos, que permiten responder a los neurotransmisores liberados por esos nervios. Las catecolaminas inhiben la producción de citocinas proinflamatorias como la IL-12, $TNF\alpha$ e $INF\gamma$, y estimulan la producción de citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y el factor transformador de crecimiento. A través de este mecanismo, las catecolaminas sistémicas pueden causar supresión selectiva de la respuesta Th1 y activar la respuesta Th2. En algunas respuestas locales, y bajo ciertas condiciones, las catecolaminas pueden fortalecer la respuesta inmune regional al inducir la producción de IL-1, $TNF\alpha$ e IL-8. La noradrenalina desencadena la liberación de PGE_2 , sin embargo, el grupo noradrenérgico neuronal involucrado es aún desconocido (Eskandari *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2004).

La activación del sistema nervioso parasimpático resulta en la estimulación de fibras nerviosas colinérgicas del nervio vago eferente y la liberación de acetilcolina en la sinapsis. Junto con las fibras nerviosas sensoriales activadas por la inflamación, el nervio vago forma el "reflejo antiinflamatorio". El cual es un mecanismo rápido por el cual las señales inflamatorias llegan al cerebro y el cerebro responde con una acción antiinflamatoria a través de las fibras

nerviosas colinérgicas. La acetilcolina atenúa la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1 β , IL-6 e IL-18) pero no la de las citocinas antiinflamatorias, como IL-10. Este efecto parece ser independiente del eje HPA (Eskandari *et al.*, 2003).

El sistema nervioso periférico regula la inmunidad local, en los sitios de inflamación, a través de neuropéptidos como la sustancia P, la CRH liberada en la periferia y el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP). Estas moléculas son liberadas por las terminaciones nerviosas o sinapsis, o podrían ser sintetizadas y liberadas por células inmunes y tener un efecto inmunomodulador, generalmente proinflamatorio (Eskandari *et al.*, 2003).

El eje HPA esta sujeto a la regulación de neurotransmisores y neuropéptidos del sistema nervioso central. La CRH está regulada positivamente por los sistemas serotoninérgico, colinérgico y catecolaminérgico. Otros neuropéptidos como el ácido γ -aminobutírico y las benzodiazepinas inhiben la secreción de CRH inducida por la serotonina (Eskandari *et al.*, 2003).

2.5. CITOCINAS

Las citocinas comprenden un amplio grupo de glicoproteínas de bajo peso molecular, normalmente entre 15-30 kDa, constituidas por 120-180 aminoácidos. Son producidas principalmente por monocitos, macrófagos y células T, y regulan la respuesta inmunológica e inflamatoria. Penetran a la circulación y actúan sobre órganos y tejidos distantes y por esta razón se les considera hormonas (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996).

Las interleucinas son citocinas. El término interleucina (IL) se aplicó a aquellas moléculas que servían como señales de comunicación entre distintos tipos de leucocitos, numerándose consecutivamente a medida que se descubrían. No obstante, a algunas de ellas se les nombra de acuerdo con su función biológica, como es el caso del factor de necrosis tumoral (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996).

En general, no se detecta una producción constitutiva significativa de citocinas, siendo necesaria la activación celular para que se produzcan en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. Son moléculas que poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad presentes en la superficie de la propia célula productora o en otros tipos celulares (Suárez *et al.*, 2003).

En relación con la respuesta inflamatoria, algunas citocinas favorecen su desarrollo (citocinas proinflamatorias) mientras que otras ejercen un efecto supresor de la inflamación (citocinas inmunosupresoras). En el grupo de las citocinas con actividad proinflamatoria se incluyen la IL-1, IL-6, TNF α y algunos miembros de la familia de las quimiocinas. Otra importante citocina proinflamatoria es el IFN γ , producido por linfocitos Th1 en las respuestas inmunes específicas y por células NK activadas. Las citocinas con actividad antiinflamatoria e inmunosupresora inhiben el crecimiento celular o suprimen la secreción de otras citocinas. Entre ellas se encuentran la IL-4, IL-13 e IL-10, que activan las acciones de los linfocitos B a la vez que inhiben las respuestas inflamatorias. Los interferones tipo I (α y β), también se pueden considerar citocinas supresoras debido a su capacidad antiproliferativa y a su efecto regulador de la producción de citocinas proinflamatorias (Suárez *et al.*, 2003).

2.5.1. CITOCINAS PROINFLAMATORIAS

IL-1. Es producida fundamentalmente por monocitos y macrófagos, pero también por células dendríticas, endoteliales, NK y otros tipos celulares. Existen dos formas, la IL-1 α y la IL-1 β , que comparten el mismo receptor y ejercen efectos biológicos similares. Esta interleucina tiene múltiples funciones. Cuando se secreta en concentraciones bajas actúa como mediador de la inflamación local aumentando la expresión de moléculas de superficie por las células endoteliales que median la adhesión leucocitaria. Cuando se secreta en cantidades mayores entra a la circulación y ejerce efectos endocrinos. Su

función primaria, al ser el principal pirógeno endógeno, es inducir fiebre a través de la producción de prostaglandinas. Parte de su efecto proinflamatorio se debe a que induce la liberación de histamina en los mastocitos, generando vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular en el lugar de la inflamación. También promueve la síntesis de proteínas de fase aguda, como fibrinógeno, haptoglobina y proteína C reactiva por los hepatocitos. Actúa sobre el sistema nervioso central (CNS) induciendo sueño y anorexia. Aumenta la liberación de lactoferrina en neutrófilos, lo cual produce una disminución del hierro sérico, inhibiendo así el incremento de muchos microorganismos. Estimula la proliferación de linfocitos B y la producción de anticuerpos. Desempeña un papel importante en la activación y proliferación de linfocitos T (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Álpizar y Medina, 1999).

IL-2. Es secretada por linfocitos T CD_4^+ y CD_8^+ activados, en respuesta a un estímulo antigénico. Tiene un papel esencial en el desarrollo de las respuestas inflamatorias crónicas, tanto humorales como celulares. Es un factor estimulador del crecimiento de linfocitos T, B y NK. Es responsable de la proliferación de las células específicas del antígeno tras su reconocimiento por las células T. Promueve la actividad citotóxica mediada por linfocitos T y células NK, así como el desarrollo de células LAK (células asesinas activadas por citocinas). Tras unirse a su receptor en linfocitos T, activa la secreción de $IFN\alpha$, linfotóxina, IL-4 e IL-5. Incrementa la expresión de moléculas de MHC de clase II (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Abbas *et al.*, 2002).

IL-6. Es producida fundamentalmente por monocitos, macrófagos, fibroblastos, células endoteliales, linfocitos T y células del estroma de la médula ósea, en respuesta a microorganismos y a otras citocinas, principalmente la IL-1 y el TNF. Es la principal interleucina inductora de la síntesis de proteínas de fase aguda, sobre todo de fibrinógeno, contribuyendo así a los efectos sistémicos de la inflamación. Además de su efecto en la inflamación, se ha observado que promueve la diferenciación de linfocitos B hacia células plasmáticas, induciendo la producción de inmunoglobulinas. También puede aumentar la producción de IL-2 y el desarrollo de los precursores hematopoyéticos

dependientes de la IL-3 (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Abbas *et al.*, 2002).

TNF. Se han descrito dos moléculas estrechamente relacionadas, el TNF α y el TNF β , con bastante homología en su secuencia de aminoácidos. El TNF α es producido fundamentalmente por monocitos y macrófagos en respuesta a estímulos invasivos, aunque también puede ser producido por linfocitos T y B, NK, fibroblastos y mastocitos. Es el mediador principal de la respuesta inflamatoria aguda frente a las bacterias gramnegativas y a otros microorganismos infecciosos. Es el primero en aparecer ante una situación de estrés, seguido por la IL-1 y la IL-6. Induce la síntesis de IL-1 y al igual que ésta, actúa sobre el hipotálamo para producir fiebre. También produce caquexia y sueño al actuar sobre el CNS. Su principal función es la estimulación del reclutamiento de neutrófilos y monocitos en los focos de infección y la activación de estas células para erradicar microorganismos. Promueve la remodelación normal de tejidos, induce apoptosis de algunos tipos celulares y muestra efecto directo contra ciertas células tumorales. Estimula la producción de IL-8 por células del endotelio vascular, lo que contribuye a la extravasación de linfocitos, neutrófilos y TNF β . El TNF β o linfoxina es producido exclusivamente por linfocitos T activados, se une a los mismos receptores que el TNF α e induce funciones similares (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Abbas *et al.*, 2002).

IFN Tipo II. La síntesis del interferón de tipo II o IFN γ sólo se lleva a cabo en linfocitos T. Es la principal citocina de activación de los macrófagos. Potencia su función microbicida al estimular la síntesis de intermediarios reactivos de oxígeno y óxido nítrico. Actúa como pirógeno endógeno, sea directamente sobre macrófagos para obligarlos a liberar IL-1 o directamente sobre el centro termorregulador hipotalámico. El interferón puede potenciar las actividades antiviral y citolítica del TNF. Incrementa la eficiencia de las células NK y activa a los neutrófilos. Estimula las células B para aumentar la producción de anticuerpos. Potencia la presentación de antígenos asociada al complejo mayor de histocompatibilidad y estimula la producción de muchas proteínas implicadas en el procesamiento del antígeno. Inhibe la proliferación de los

linfocitos Th2, de manera que su presencia durante la estimulación antigénica induce la diferenciación de linfocitos T hacia células efectoras tipo Th1 favoreciendo, por lo tanto, el desarrollo de las respuestas inflamatorias (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Abbas *et al.*, 2002).

2.5.2. CITOCINAS ANTIINFLAMATORIAS

IL-4. Es producida por linfocitos Th2, mastocitos, basófilos, células del estroma de la médula ósea y, posiblemente, por determinadas subpoblaciones de células NK. Es una citocina muy pleiotrópica, ya que ejerce numerosos efectos en diferentes tipos celulares. Promueve la diferenciación de linfocitos T vírgenes hacia células de tipo Th2, inhibiendo la generación de células Th1. Posee efectos inmunosupresores, ya que inhibe la producción de determinados mediadores inflamatorios de los macrófagos e induce la producción del receptor antagonista de IL-1, que bloquea la acción de la IL-1. Por otra parte, promueve el desarrollo de las respuestas inmunes humorales a través de la inducción del crecimiento y diferenciación de linfocitos B, y la inducción de la síntesis de inmunoglobulinas IgE e IgG4 (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Abbas *et al.*, 2002).

IL-10. Es producida por linfocitos del tipo Th2, así como también por monocitos, macrófagos, linfocitos B, queratinocitos y otros varios tipos celulares. Es la citocina inmunosupresora por excelencia. Inhibe a los macrófagos activados para abolir su respuesta y restablecer el estado de reposo del organismo una vez erradicada la infección. Esto lo logra a través de la inhibición de la síntesis de muchas citocinas, entre las que podemos citar al IFN γ , TNF α , IL-2, IL-12, y la expresión del MHC-II y de moléculas de adhesión en monocitos. También tiene efectos antiproliferativos sobre muchos otros tipos celulares. La IL-10 ejerce además múltiples actividades inmunomoduladoras. Se ha visto que es un cofactor para el crecimiento de líneas y colonias de células mastocíticas *in vitro*. Regula las funciones mediadas por linfocitos B induciendo la síntesis de inmunoglobulina G, y por linfocitos T, influyendo en el desarrollo de timocitos y células T (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Abbas *et al.*, 2002).

IFN Tipo I. Los interferones tipo I (IFN α e IFN β) median la respuesta inmunitaria innata precoz a las infecciones virales. Se producen en la mayor parte de las células (leucocitos, fibroblastos y macrófagos) en respuesta a infección viral. Tienen capacidad para interferir con la replicación de virus en células infectadas. Además poseen una importante actividad inmunomoduladora. Incrementan la expresión de antígenos polimórficos de superficie de histocompatibilidad de clase I en varios tipos celulares, lo que facilita su función presentadora de antígenos y activa a los macrófagos, incrementando su capacidad tumoricida y de defensa contra las infecciones. Estimulan el desarrollo de células Th1 y actúan de forma autocrina sobre las propias células NK que lo producen, aumentando su actividad citolítica. Muestran actividad antitumoral, ya sea en forma directa al inhibir la división celular a través de un aumento en la duración del ciclo de multiplicación celular o indirectamente alterando la respuesta inmunológica. También actúan como antagonistas de la IL-4 (Suárez *et al.*, 2003; El-Radhi y Carroll, 1996; Abbas *et al.*, 2002).

3. LECTINAS

Las lectinas son un grupo de proteínas o glicoproteínas de origen no inmune que reconocen de manera específica y reversible a los carbohidratos, ya sean libres o que formen parte de estructuras más complejas. Usualmente poseen al menos dos sitios de reconocimiento por molécula: un sitio azúcar específico y otro para una molécula glicosilada; lo que les confiere la capacidad para aglutinar células y precipitar glicoconjugados (Hernández *et al.*, 2005; Castillo y Abdullaev, 2005).

Las lectinas no poseen actividad enzimática y no son producto de una respuesta inmune. Se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza y han sido identificadas en diversos organismos como virus, bacterias, hongos, plantas y animales (Hernández *et al.*, 2005; Castillo y Abdullaev, 2005).

La gran importancia de las lectinas se debe fundamentalmente a su actividad biológica tan diversa, en la que siempre esta involucrado el reconocimiento de un receptor oligosacárido. Realizan funciones relacionadas con el reconocimiento celular como son: fertilización, regulación del tejido conectivo, apoptosis (muerte celular programada), en respuestas inflamatorias, en el sistema inmune y en la determinación y diferenciación celular, la organogénesis, la migración de linfocitos y como factores determinantes en la metástasis (Hernández *et al.*, 2005; Sharon y Lis, 2004).

Una gran diversidad de lectinas han sido aisladas y caracterizadas de diferentes especies vegetales y/o animales, siendo las plantas su fuente más abundante. Las lectinas vegetales pueden tener diversas funciones dentro de la planta como son: regulación fisiológica, defensa mecánica contra el ataque de microorganismos, almacenamiento de proteínas, transporte de carbohidratos, estimulación mitogénica y reconocimiento de las bacterias fijadoras de nitrógeno, entre otras (Hernández *et al.*, 2005; Castillo y Abdullaev, 2005).

Las lectinas se consideran armas valiosas en el campo de la Genética, la Biomedicina y la Inmunología. Su utilidad está basada en la propiedad que tienen de combinarse con varios tipos de glicoconjugados presentes en las superficies celulares y fluidos corporales (Hernández *et al.*, 1999).

Algunas de las lectinas son específicas en sus reacciones con los grupos sanguíneos ABO, MN, A₁ y A₂ de humanos, por esto han sido utilizadas en la determinación del tipo de sangre de los individuos (Sharon y Lis, 2004).

Sus propiedades mitogénicas permiten que se utilicen en estudios que tienen como base la proliferación de linfocitos en cultivos, como son: la evaluación de la producción de citocinas y la expresión de sus receptores en sobrenadantes de cultivos; la caracterización de algunos aspectos relacionados con la respuesta inmune y fenómenos asociados con ellas como la inmunosupresión; la interacción entre virus, así como la susceptibilidad y resistencia a éstos; evaluación de la efectividad de terapias antirretrovirales de acuerdo con la

respuesta de los linfocitos a la estimulación con las lectinas antes y después de la terapia; análisis de funciones linfoproliferativas y citotóxicas en células mononucleares causadas por algunas drogas; la inducción de genes en linfocitos; y la detección de anomalías cromosómicas (Hernández *et al.*, 2005).

Debido a que las lectinas se enlazan a carbohidratos de la superficie celular, se han convertido en útiles marcadores para emplearlos en técnicas histoquímicas y en la microscopía electrónica para estudiar la estructura y función de la membrana plasmática. Se les utiliza en cromatografía de afinidad para purificar receptores celulares, donde un exceso de monosacárido que inhibe su actividad hemaglutinante, permite la liberación del receptor (Hernández *et al.*, 1999; Hernández *et al.*, 2005).

Otra área importante en la cual se emplean las lectinas es la detección de transformaciones malignas en células, a través de la aglutinación preferencial que muestran las lectinas con células transformadas. Además se han realizado investigaciones para utilizar las lectinas y polímeros sintéticos enlazados a ellas como agentes anticancerígenos *in vivo* e *in vitro*, ya que se ha visto que disminuyen el crecimiento de las células tumorales (Hernández *et al.*, 1999).

Recientemente, se ha propuesto su utilización como auxiliares en el transplante de médula ósea de pacientes con inmunodeficiencias severas (Hernández *et al.*, 1999; Sharon y Lis, 2004).

3.1. EFECTOS DE LAS LECTINAS EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE

Las galectinas son una familia de lectinas animales que se unen a β -galactósidos y están ampliamente distribuidas en el reino animal. Al menos veinte galectinas están presentes en el humano. Un gran número de estudios han reportado sus funciones biológicas, entre las que se encuentran la adhesión celular, regulación del crecimiento celular, inflamación,

inmunomodulación, apoptosis y metástasis (Almkvist *et al.*, 2004; Rabinovich *et al.*, 1999).

Las galectinas están presentes tanto en el citosol como en el núcleo y pueden ser secretadas al medio extracelular por un mecanismo aún desconocido, similar al utilizado por la IL-1. Las dos galectinas más extensamente estudiadas son la galectina-1 y la galectina-3 (Almkvist *et al.*, 2004).

La galectina-1 es expresada ampliamente en el sistema inmune por células T y B activadas, y macrófagos. Esta lectina ha mostrado propiedades inhibitorias del crecimiento de diferentes tipos celulares como células T leucémicas humanas y fibroblastos murinos. El estudio de la regulación negativa del crecimiento celular ha sido extendido hasta células tumorales. La galectina 1 también ha mostrado ser un regulador positivo de crecimiento en otros tipos celulares como las células del endotelio vascular. Por lo que se especula que la propiedad inhibitoria o estimuladora depende del tipo celular y las señales del entorno (Rabinovich *et al.*, 2002).

En contraste con la galectina-1, la mayoría de la evidencia experimental indica que la galectina-3 promueve el crecimiento y la proliferación celular, y actúa como una señal mitogénica para muchos tipos celulares. Esta actividad estimulante del crecimiento celular se relaciona con el funcionamiento intracelular de la proteína. Se ha reportado que la galectina-3 estimula la síntesis de DNA en cultivos de fibroblastos humanos (Rabinovich *et al.*, 2002).

La participación de interacciones lectina-carbohidrato en el proceso inflamatorio se ha vuelto evidente, como en el caso de la unión de leucocitos al endotelio que es mediado por selectinas (lectinas dependientes de calcio), o las colectinas que pueden unirse a carbohidratos de la superficie de diversos microorganismos y actuar como opsoninas, promoviendo la actividad fagocítica (Almkvist *et al.*, 2004).

La galectina-1 impide la síntesis o liberación de citocinas proinflamatorias. En estudios *in vivo* la galectina-1 ha mostrado una supresión de la respuesta

inflamatoria. En un modelo animal de artritis reumatoide los ratones tratados con la galectina-1 exhiben una respuesta inmune con producción incrementada de IL-5 y reducción de la secreción de IFN γ . Esta lectina inhibe la producción de IL-2 mediada por el receptor de células T, y TNF α e INF γ derivados de células T pero no la secreción de IL-10 (Rabinovich *et al.*, 2002).

La galectina-3 potencia la producción de IL-1 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en monocitos humanos. Esta lectina también inhibe la expresión genética de la IL-5 por eosinófilos humanos a través de la inhibición de un elemento regulador de la transcripción, el REIII (Rabinovich *et al.*, 2002).

La galectina-1 juega un papel importante en la inflamación aguda, muestra propiedades antiinflamatorias al inhibir la fosfolipasa A₂, la liberación del ácido araquidónico y la producción de PGE₂ por los macrófagos estimulados con LPS. La administración de esta proteína inhibe la extravasación de neutrófilos y la degranulación de los mastocitos, e interfiere con el metabolismo de la arginina en los macrófagos y consecuentemente con la liberación de óxido nítrico (NO) (Rabinovich *et al.*, 2002).

La galectina-3 muestra actividad proinflamatoria *in vitro* e *in vivo*. Estimula la producción de superóxido por leucocitos en sangre periférica y activa la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa en neutrófilos que experimentan extravasación. Es evidente que las galectinas pueden funcionar como mediadores pro y antiinflamatorios que podrían proveer de posibles puntos de ataque para regular el proceso inflamatorio (Almkvist *et al.*, 2004; Rabinovich *et al.*, 2002).

Otra lectina que constituye un componente principal del sistema inmune innato es la lectina de unión a manosa (MBL), una glicoproteína perteneciente a la familia de las lectinas tipo C, que se clasifica dentro del grupo de las colectinas. Es una proteína sérica sintetizada por el hígado, que responde como reactante de fase aguda. La MBL presenta afinidad por diversos azúcares como manosa, N-acetil-glucosamina, N-acetil-galactosamina y L-fucosa, lo que le permite unirse con los carbohidratos presentes en la superficie de las células de los

microorganismos patógenos, como virus, bacterias, levaduras y hongos, mediando la opsonización, activando a los macrófagos a través del receptor C1q y estimulando la activación de la vía de las lectinas del complemento mediante dos proteasas de serina (MASP1 y MASP2). La deficiencia de MBL influye en la severidad de muchas enfermedades debido a que posiblemente participa en una modulación dosis-dependiente de citocinas proinflamatorias (Eisen *et al.*, 2003; Merlín *et al.*, 2006; Turner, 2003; Villareal *et al.*, 2008).

Las lectinas de leguminosas también pueden ejercer acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. Algunos estudios demuestran que la respuesta inflamatoria *in vitro* inducida por lectinas de plantas que reconocen a glucosa-manosa involucra la activación de mastocitos y la liberación de histamina. Lectinas con afinidad por N-acetil-galactosamina han mostrado una inhibición de la secreción de células mastocíticas también *in vitro*. Se ha observado que estas actividades son revertidas cuando las lectinas se encuentran asociadas con el carbohidrato específico al que reconocen. En un estudio *in vivo* del efecto pro y antiinflamatorio de una lectina de semilla de *Araucaria angustifolia*, se encontraron indicios de que la lectina podría actuar reconociendo azúcares específicos de la superficie celular de los mastocitos y de esta manera estabilizar la membrana para prevenir la liberación de los mediadores, serotonina e histamina, contenidos en los gránulos. Esta actividad antiinflamatoria se observa al administrar la lectinas vía intravenosa, mientras que al administrarla vía subcutánea, actúa como agonista de los receptores de la membrana del mastocito estimulando la liberación de sus mediadores. Esta propiedad proinflamatoria involucra la liberación de citocinas primarias como la IL-1 y el TNF α . Esta lectina, al igual que muchas otras lectinas de plantas, no muestra toxicidad a las dosis que presenta actividad antiinflamatoria. Por ello estas proteínas proporcionan una opción como inhibidoras de la liberación de mediadores inflamatorios, lo que les confiere utilidad en el tratamiento de condiciones patológicas como las alergias (Mota *et al.*, 2006).

Una lectina de origen vegetal que ha sido ampliamente estudiada es la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* (PHA). Esta comprende cinco glicoproteínas tetraméricas, de las cuales, en estudios *in vitro* se ha

demostrado que sus subunidades L confieren actividad estimulante de la mitosis en diferentes estirpes celulares, incluidos los linfocitos. Su posible efecto de modulación mitogénica podría ser de utilidad en la terapéutica del cáncer, infecciones graves y anemia aplásica. En un modelo experimental *in vivo* para evaluar la potencialidad de la fitohemaglutinina para modular el sistema inmunológico, las ratas administradas con PHA e inoculadas con eritrocitos de carnero, presentaron incrementos en el número total de leucocitos y linfocitos circulantes. En el mismo experimento se encontró que la PHA estimula a los linfocitos B para la producción de anticuerpos. Algunos resultados de otros estudios *in vitro* avalan el posible uso terapéutico de la isoforma mitogénica L4 de la PHA como modificador de respuestas biológicas presentando las ventajas de que es poco tóxica, no oncogénica, no infecciosa, compatible con diversas modalidades terapéuticas, probablemente compatible con el embarazo y representa una adecuada relación costo-efectividad (Ruiz *et al.*, 2005).

Por todo lo anterior se propone que el diseño de nuevas estrategias terapéuticas basadas en el reconocimiento a carbohidratos podría proveer alternativas para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, procesos inflamatorios, reacciones alérgicas y crecimiento tumoral (Rabinovich *et al.*, 1999).

4. TRATAMIENTO DE LA PIREXIA

Existen varias formas de abordaje terapéutico para el control de la fiebre, pero el tratamiento mayormente usado son los fármacos antipiréticos. Estos medicamentos pueden ser del grupo de los esteroides o del grupo de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (NSAIDs). Dentro del primer grupo se encuentran los corticoesteroides, que reducen la fiebre porque interfieren en la síntesis o en los efectos de las citocinas, sin embargo no se deben emplear para ese fin, debido a que tienen un efecto desfavorable sobre el sistema inmune (Barba *et al.*, 2008; <http://www.odon.edu.uy/cafispat/fiebre/fiebre.htm>).

Los NSAIDs son un grupo de compuestos con estructura química diferente cuyo efecto primario es inhibir la síntesis de prostaglandinas mediante la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Estos medicamentos comparten acciones farmacológicas y efectos indeseables semejantes. Entre los utilizados con mayor frecuencia se incluyen el paracetamol y el ácido acetil salicílico (ASA) (Barba *et al.*, 2008; Valsecia y Malgor, 1999).

Existen dos isoformas de la enzima ciclooxigenasa, la ciclooxigenasa 1 (COX₁) y la ciclooxigenasa 2 (COX₂). La COX₁ es una enzima constitutiva presente en la mayoría de las células del organismo, es la encargada de la síntesis de prostaglandinas para la regulación fisiológica como la citoprotección gástrica, la regulación de flujos sanguíneos, la función renal y plaquetaria. La COX₂ es una enzima inducida por citocinas y otros factores, que se expresa en respuesta a procesos inflamatorios y estimula la síntesis de prostaglandinas que producen fiebre, dolor o inflamación (Valsecia y Malgor, 1999; Lorenzo *et al.*, 2004).

La mayoría de los NSAIDs son inhibidores reversibles y competitivos de la ciclooxigenasa, mientras que el ASA es un inhibidor irreversible, pues acetila la enzima en el sitio activo. Inhibe muy efectivamente la COX₁ y con ello la agregación plaquetaria. La asociación del ASA con síndrome de Reye (encefalopatía aguda no inflamatoria) cuando se utiliza en infecciones virales ha reducido su indicación en pediatría (Lorenzo *et al.*, 2004; El-Radhi y Carroll, 1996).

A pesar de que estos fármacos son muy potentes, presentan diversos efectos adversos que incluyen espasmo bronquial, hemorragia digestiva, redistribución de la grasa corporal y daño renal. Pueden producir hepatotoxicidad, sobre todo en pacientes con artritis u otros trastornos del tejido conectivo (Boakye-Gyasi *et al.*, 2008; El-Radhi y Carroll, 1996).

El paracetamol es el fármaco más utilizado en pediatría para el tratamiento de la fiebre. Difiere de otros NSAIDs en que no reduce la inflamación, ni causa daño a la mucosa gástrica, así como tampoco inhibe la agregación plaquetaria.

Posee solo una ligera actividad sobre la COX₁ y la COX₂. Al ser un inhibidor pobre de la COX₂ se explica la carencia de efecto antiinflamatorio, y una pobre inhibición de la COX₁ explica la ausencia de gastrotoxicidad y acción antiagregante plaquetaria. La inhibición de la COX₁ y la COX₂ por el paracetamol solo ocurre en células y tejidos con baja concentración de peróxidos, como en el cerebro, y no en presencia de altas concentraciones de peróxidos como en los tejidos inflamados. Desde hace tiempo se ha teorizado sobre la posibilidad de que su efecto se deba a una tercera isoforma, identificada como variante de la COX₁, la COX₃, de localización preferentemente central. Las sobredosis agudas de este agente pueden causar daño hepático fatal, en los últimos años ha aumentado el número de intoxicaciones por automedicación (Boakye-Gyasi *et al.*, 2008; El-Radhi y Carroll, 1996; Lorenzo *et al.*, 2004).

5. TÉCNICAS PARA LA COMPROBACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIPIRÉTICA

Para comprobar que una sustancia presenta actividad antipirética se pueden llevar a cabo diferentes técnicas con el objetivo de evaluar su efecto sobre un modelo biológico, al cual se le induce fiebre por medio de la inoculación de un agente pirógeno. Los modelos biológicos más utilizados son rata y conejo, mientras que los agentes pirógenos mayormente empleados son levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*), lipopolisacáridos (LPS) purificados de bacterias como *E. coli* y *Pseudomonas*, e interleucina-1 β recombinante humana o de rata. En la tabla 2 se mencionan algunas de las técnicas utilizadas para inducir fiebre. Como se muestra, el empleo de levadura es muy frecuente, presentando solamente algunas variantes hechas por los autores (Sundgren, 1998; Riedel, 1997; Fewell y Wong, 2002; Tijani *et al.*, 2008; Tomazetti *et al.*, 2005; Kaway *et al.*, 1971; Boakye *et al.*, 2008; García *et al.*, 2007).

Tabla 2. Técnicas de inducción de fiebre en modelos animales

Modelo biológico	Agente pirógeno	Dosis y vía de administración	Incremento de temperatura y tiempo de respuesta	Referencia
Conejo	LPS	1µg/kg vía intravenosa	1°C en menos de 3 horas	Riedel, 1997
Rata	IL-1β recombinante humana	0.20 µg/kg vía subcutánea	0.7°C	Fewell y Wong, 2002
Rata	Levadura	1ml/kg al 15% vía intraperitoneal	A partir de 0.5°C a las 16 horas	Tijani <i>et al.</i> , 2008
Rata	Levadura	0.135g/kg vía intraperitoneal	Significativo durante 4 horas	Tomazetti <i>et al.</i> , 2005
Rata	Levadura	1ml/100g al 15% vía subcutánea	Significativo a las 16 horas	Kaway <i>et al.</i> , 1971
Rata	Levadura	10ml/kg al 20% vía subcutánea	A partir de 0.5°C a las 19 horas	Boakye <i>et al.</i> , 2008
Rata	Levadura	4g/kg vía subcutánea	A partir de 0.5°C a las 17 ó 18 horas	García <i>et al.</i> , 2007

II JUSTIFICACIÓN

La fiebre es una manifestación muy frecuente de enfermedad. Se acompaña de otros síntomas como cefalea, anorexia, malestar general, fatiga y dolores musculares. La fiebre alta puede producir delirios, daño neurológico, e incluso inducir convulsiones en personas con predisposición genética (Reverón, 2000).

A pesar de que existe una gran variedad de fármacos antipiréticos disponibles en el mercado, la búsqueda de nuevos agentes con menos efectos secundarios adversos continúa. En las últimas décadas, los productos de origen vegetal han vuelto a tener una presencia cada vez mayor en la terapéutica, ya que el uso de las plantas es más barato, accesible y tiene consecuencias secundarias poco agresivas para la salud humana (Fundaquim *et al*, 2004).

La actividad antipirética de flor de jamaica fue reportada en el 2007 por Reanmongkol e Itharat, sin embargo, no se han realizado estudios en los que se compare la respuesta antipirética empleando extracto crudo y fracciones (pigmentos y proteínas), ni se ha explorado el posible mecanismo de acción involucrado.

En cuanto a la flor de jamaica, se sabe que además de su alto contenido de flavonoides contiene lectinas, que como se mencionó anteriormente, son proteínas que tienen la capacidad de modular la respuesta del sistema inmune y de regular la producción de citocinas involucradas en los procesos febriles (Martínez y Fenton, 2008).

Por otro lado, no existen reportes de la participación de lectinas vegetales en el efecto antipirético exhibido por extractos de plantas medicinales. Dicho efecto es atribuido principalmente a los flavonoides. Por lo que la presente investigación representa el primer estudio donde se consideran los aspectos antes mencionados.

III HIPÓTESIS

Los extractos crudos, fracciones proteicas y pigmentos de la flor de jamaica *Hibiscus sabdariffa L.* exhiben actividad antipirética.

IV OBJETIVOS

Objetivo General

Comprobar la actividad antipirética de extractos de jamaica en animales experimentales con fiebre inducida.

Objetivos Particulares

- 1) Inducir fiebre en animales de experimentación
- 2) Comprobar el efecto antipirético del extracto crudo de jamaica y compararlo con el control positivo y negativo.
- 3) Comprobar el efecto antipirético de la fracción proteica de jamaica y compararlo con el control positivo y negativo
- 4) Comprobar el efecto antipirético de los pigmentos de jamaica y compararlo con el control positivo y negativo
- 5) Cuantificar los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias y correlacionarlos con los grupos tratados
- 6) Realizar un análisis estadístico de los resultados con los grupos realizados

V MATERIALES

- Flor de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*)
- Solución de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) al 20%
- Solución de paracetamol (acetaminofen) 100 mg/mL
- Solución salina fisiológica 0.9%
- Kits de ELISA para citocinas proinflamatorias
- Placas multipozos de 96
- 135 ratas macho Wistar de 300-500g de peso corporal
- Termómetros digitales OMRON
- Sondas intragástricas
- Reactivos de Grado Analítico

VI MÉTODOS

1) Preparación de los extractos de flor de jamaica

Para la obtención del Extracto Crudo se realizó una cocción de 100g de flores de jamaica desecadas en 1 litro de agua destilada a 100 °C durante 30 minutos. Posteriormente se homogeneizó y se filtró. Se utilizó el filtrado.

Los pigmentos se removieron de las flores por medio de extracciones acetónicas y etanólicas. Se eliminaron los solventes mediante destilación simple y evaporación, respectivamente. Los pigmentos así aislados se disolvieron en agua para obtener una solución de pigmentos al 20%.

La Fracción Proteica es una fracción enriquecida de proteínas (lectinas) de flor de jamaica. Para obtenerla se utilizaron las flores a las que previamente se les removieron los pigmentos. Éstas se homogeneizaron en buffer PBS y se filtró. Posteriormente se separaron las proteínas utilizando una cromatografía de intercambio iónico, en la que se obtuvieron dos fracciones (picos), las lectinas se localizaron en la fracción hidrofílica, donde se comprobó la presencia de

lectinas mediante el ensayo de hemaglutinación (Martínez y Fenton, 2008). Se verificó la concentración proteica por el método de Bradford (Bradford, 1976) siendo de 100 µg/mL.

2) Inducción de Fiebre

Los animales fueron marcados, pesados y distribuidos aleatoriamente en grupos de diez. Para la medición de las temperaturas se utilizaron termómetros digitales OMRON, los cuales se introdujeron 1.5 cm en el recto del animal. Se midió la temperatura rectal antes de inducir la fiebre, a la cual se consideró como temperatura basal.

Se utilizó levadura de cerveza *Saccharomyces cerevisiae* como agente inductor de fiebre siguiendo el método utilizado por García *et al.* (2007). La estandarización se realizó en tres etapas. En la primera etapa se administró una solución de levadura al 20% en dosis de 4 g/kg de peso corporal. Las ratas se dejaron toda la noche con agua *ad libitum* y sin alimento. A las 18 horas posteriores a la administración de la levadura se midió nuevamente la temperatura rectal para verificar el incremento. Debido a la variación en la respuesta febril se realizaron cambios, por lo que en la segunda etapa se hizo una modificación al método, al duplicar la dosis de levadura (8g/kg). Los animales se dejaron bajo las mismas condiciones que en la primera etapa, hasta las 18 horas en que se midió nuevamente la temperatura. Finalmente, en la tercera etapa, en la que se obtuvieron los resultados esperados, se mantuvo la dosis 8 g/kg de peso corporal, los animales se dejaron bajo las mismas condiciones que en las etapas anteriores, pero el tiempo en que se midió nuevamente la temperatura se redujo a 16 horas. A la temperatura registrada a las 18 y 16 horas respectivamente, se le denominó temperatura febril. Se seleccionaron solamente los animales con incremento igual o mayor a 0.5°C para continuar con el experimento (García *et al.*, 2007; Tijani *et al.*, 2008).

3) Evaluación de la respuesta antipirética

A los animales con fiebre se les administró por vía oral mediante una sonda intragástrica el tratamiento correspondiente a cada grupo:

Grupo Cero: Control sin tratamiento. No se le indujo fiebre ni se le dio tratamiento.

Grupo A. Control antipirético negativo: 2 mL de solución salina al 0.9%.

Grupo B. Control antipirético positivo: 1mL/100g peso corporal de solución de paracetamol de 100mg/mL.

Grupo C. Extracto Crudo de flor de jamaica: 1mL/100g de peso corporal.

Grupo D. Fracción Proteica de flor de jamaica: 1mL/100g de peso corporal.

Grupo E. Pigmentos de flor de jamaica: 1mL/100g de peso corporal.

Para evaluar el efecto de los tratamientos se realizaron mediciones de las temperaturas rectales a los 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos posteriores a la aplicación de los tratamientos.

4) Evaluación de citocinas circulantes

Al finalizar el monitoreo de temperatura se extrajo sangre a las ratas de los grupos con fiebre por medio de punción cardiaca. Las muestras de sangre se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos y se separaron los sueros, los cuales se congelaron a -70°C hasta su evaluación.

Se utilizaron estuches comerciales de la marca PreproTech para evaluar las concentraciones circulantes de las citocinas TNF α , IL-1 α , IL-6 e IFN γ mediante el método de Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (ELISA) tipo sandwich. Para las cuatro citocinas se siguió el protocolo indicado por el proveedor ajustándolo para utilizar 50 μ L de muestra. Se prepararon las placas de 96 pozos fijando el anticuerpo de captura y adicionando el buffer de bloqueo. A continuación se adicionó la muestra de suero, todas las determinaciones se hicieron por duplicado. En cada placa se incluyó una curva

de calibración para interpolar los valores obtenidos de las muestras. La curva de calibración para cada citocina se realizó en el intervalo útil indicado por el fabricante. Posteriormente se adicionó el anticuerpo de detección específico para cada citocina y la enzima avidina peroxidasa. Finalmente, para revelar se utilizó el sustrato 2,2'-azino-di[3-etil-benzotiazolin sulfonato] (ABTS) y la reacción se detuvo con sulfato de dodecilo sódico (SDS). Los tiempos de incubación entre cada etapa del proceso fueron los recomendados por el fabricante, realizando cuatro lavados entre cada una. La lectura de las placas se realizó en un lector de ELISA a 405nm. Las concentraciones se obtuvieron al interpolar la absorbancia de las muestras en la curva de calibración.

5) Análisis estadístico

La información se procesó utilizando el software Microsoft Office Excel 2007. Se obtuvo la media, mediana, moda, desviación estándar y error estándar de las temperaturas y de las concentraciones de citocinas. Se realizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov a todos los resultados. Para comparar el efecto de cada tratamiento se utilizaron las pruebas paramétricas t-Student y ANOVA de una y dos vías *post hoc* Bonferroni. Para el análisis de citocinas se utilizó la prueba ANOVA de una vía *post hoc* Bonferroni. Todos los análisis se llevaron a cabo utilizando el programa GraphPad Prism versión 4.0

VII RESULTADOS

INDUCCIÓN DE FIEBRE

Como se describió en la metodología, se realizó la estandarización del método de inducción de fiebre, donde se utilizaron dos diferentes concentraciones de levaduras y tiempos. A continuación se describen los resultados en cada etapa.

En la primera etapa se inoculó una dosis de levadura de 4g/kg y la medición de temperatura para comprobar la presencia de fiebre se realizó a las 18 horas. Como se muestra en la tabla 3, no hubo un incremento de temperatura en todos los animales, sin embargo el promedio del incremento en los que si lo presentaron fue de 0.92°C.

En la segunda etapa se duplicó la dosis de levadura, pero se conservó el tiempo de 18 horas para valorar la respuesta de los animales. La tabla 4 muestra los resultados. Al igual que en la primera etapa, no todas las ratas presentaron el incremento de temperatura, pero el promedio del aumento en las que si lo presentaron fue de 1.67 °C.

En la tercera etapa se mantuvo la dosis de levadura de 8g/kg de peso corporal, pero el monitoreo de la respuesta se realizó a las 16 horas posterior a su administración. Los resultados se muestran en la tabla 5. Para esta etapa el incremento de temperatura promedio fue de 0.80°C. A pesar de ser ligeramente menor que en las etapas anteriores, el comportamiento fue más homogéneo, ya que todas las ratas presentaron un aumento de temperatura.

Tabla 3. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza la primera etapa

GRUPO A				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	373.5	37.6	37.7	0.1
2	440.0	37.4	36.7	-0.7
3	441.0	36.2	37.4	1.2
4	467.0	36.8	36.5	-0.3
5	473.0	37.1	37.2	0.1
6	495.5	37.0	37.8	0.8
7	503.0	36.9	38.2	1.3
8	529.0	36.6	38.1	1.5
9	540.0	36.5	37.8	1.3
10	624.0	37.0	38.7	1.7
GRUPO B				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	406.0	36.6	38.0	1.4
2	440.0	36.4	36.9	0.5
3	442.0	38.4	37.2	-1.2
4	467.0	38.2	37.8	-0.4
5	478.5	37.9	36.1	-1.8
6	495.0	36.7	37.1	0.4
7	505.0	36.8	37.4	0.6
8	523.0	36.3	37.9	1.6
9	547.5	37.0	37.4	0.4
10	582.0	38.0	37.5	-0.5

GRUPO C				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	416.0	37.0	38.0	1.0
2	438.0	36.6	37.1	0.5
3	449.0	36.3	38.1	1.8
4	464.5	35.7	37.8	2.1
5	479.0	36.7	37.0	0.3
6	492.0	36.0	37.4	1.4
7	507.0	36.9	38.0	1.1
8	522.0	36.3	37.6	1.3
9	549.5	36.9	37.5	0.6
10	581.0	36.7	37.2	0.5
GRUPO D				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	417.0	38.2	37.5	-0.7
2	438.0	37.6	37.5	-0.1
3	452.0	37.6	38.2	0.6
4	461.0	36.9	36.7	-0.2
5	481.0	37.3	36.5	-0.8
6	486.0	36.6	36.8	0.2
7	512.0	37.2	36.9	-0.3
8	516.0	37.9	37.8	-0.1
9	555.0	37.2	36.9	-0.3
10	572.0	37.5	38.1	0.6

Tabla 4. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza en la segunda etapa

GRUPO A					GRUPO C				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$		Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	518.0	34.8	37.8	3.0	1	479.0	35.1	38.4	3.3
2	426.0	37.1	36.6	-0.5	2	372.0	36.5	38.6	2.1
3	400.0	37.8	36.6	-1.2	3	492.0	36.4	38.7	2.3
4	370.0	38.3	37.2	-1.1	4	460.0	36.8	38.4	1.6
5	418.0	36.6	35.6	-1.0	5	451.0	36.2	38.5	2.3
6	434.0	36.6	37.7	1.1	6	540.0	37.2	37.9	0.7
7	450.0	38.2	37.4	-0.8	7	440.0	36.5	38.6	2.1
8	445.0	37.7	38.1	0.4	8	502.0	36.7	38.5	1.8
9	453.0	38.1	36.6	-1.5	9	472.0	36.0	38.9	2.9
10	500.0	38.6	37.7	-0.9	10	428.0	36.0	39.1	3.1
GRUPO B					GRUPO D				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$		Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	435.0	35.6	37.0	1.4	1	505.0	37.5	38.8	1.3
2	422.0	36.4	34.8	-1.6	2	460.0	37.1	37.9	0.8
3	388.0	37.2	36.3	-0.9	3	425.0	36.4	37.8	1.4
4	405.0	37.5	37.4	-0.1	4	452.0	36.8	37.8	1.0
5	380.0	37.7	36.5	-1.2	5	412.0	36.3	38.2	1.9
6	461.0	37.6	36.1	-1.5	6	402.0	37.0	38.1	1.1
7	422.0	36.8	36.8	0.0	7	482.0	37.4	38.6	1.2
8	480.0	36.8	35.6	-1.2	8	478.0	37.7	37.7	0.0
9	465.0	37.3	36.1	-1.2	9	485.0	36.7	38.1	1.4
10	368.0	36.1	36.2	0.1	10	427.0	38.4	37.5	-0.9

Tabla 5. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza en la tercera etapa

GRUPO A				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	295.0	37.1	37.8	0.7
2	299.0	36.8	37.8	1.0
3	302.0	36.9	37.2	0.3
4	365.0	36.9	37.7	0.8
5	390.0	37.5	37.9	0.4
6	385.0	37.6	37.9	0.3
7	337.0	36.9	38.8	1.9
8	310.0	36.7	38.1	1.4
9	310.0	37.4	37.6	0.2
10	317.0	37.1	37.9	0.8
GRUPO B				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	303.0	36.9	37.8	0.9
2	308.0	36.2	37.5	1.3
3	333.0	35.9	37.9	2.0
4	339.0	37.6	38.1	0.5
5	284.0	37.0	38.0	1.0
6	345.0	38.1	38.3	0.2
7	304.0	37.4	38.1	0.7
8	331.0	37.2	38.0	0.8
9	421.0	37.4	37.8	0.4
10	317.0	36.2	37.4	1.2

GRUPO C				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	426.0	36.9	37.4	0.5
2	381.0	36.7	37.6	0.9
3	390.0	36.7	37.4	0.7
4	388.0	37.1	37.8	0.7
5	399.0	37.6	38.2	0.6
6	370.0	36.4	37.3	0.9
7	338.0	36.4	37.6	1.2
8	398.0	36.9	37.3	0.4
9	392.0	36.2	37.4	1.2
10	369.0	36.9	37.5	0.6
GRUPO D				
Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$	
1	357.0	36.6	37.6	1.0
2	416.0	36.4	37.1	0.7
3	409.0	36.7	37.7	1.0
4	362.0	35.9	37.1	1.2
5	364.0	36.5	37.8	1.3
6	447.0	36.7	37.5	0.8
7	462.0	37.1	37.8	0.7
8	486.0	36.7	37.2	0.5
9	458.0	36.0	37.3	1.3
10	390.0	36.2	37.0	0.8

Tabla 5. Temperatura basal y efecto pirético de la levadura de cerveza en la tercera etapa (continuación)

	GRUPO E			
	Peso (g)	Basal (°C)	Fiebre (°C)	$\Delta T (T_r - T_b)$
1	500.0	36.6	36.3	-0.3
2	465.0	36.3	36.8	0.5
3	357.0	36.9	37.3	0.4
4	496.0	36.3	36.5	0.2
5	457.0	36.3	36.6	0.3
6	374.0	36.0	37.4	1.4
7	423.0	36.6	38.1	1.5
8	376.0	36.6	37.2	0.6
9	408.0	36.1	36.8	0.7
10	436.0	36.9	37.2	0.3
11	445.0	36.3	36.3	0.0
12	449.0	36.4	37.3	0.9
13	448.0	36.9	37.6	0.7
14	470.0	36.1	36.9	0.8

EVALUACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIPIRÉTICA

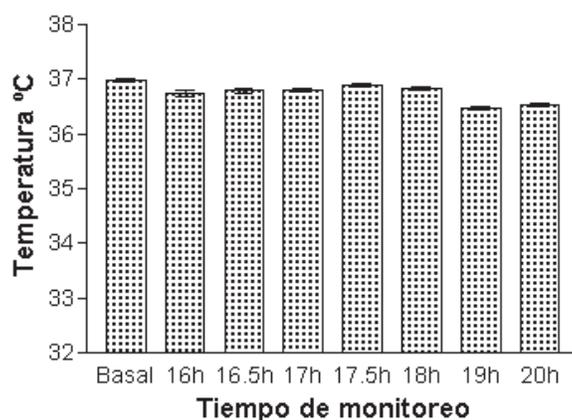
En la tercera etapa se incluyó un grupo al que no se le indujo fiebre pero se le realizó el monitoreo de la temperatura a los mismos tiempos que al resto de los grupos y se le designó como grupo Cero. Este grupo se incluyó con el objetivo de evaluar el efecto de la manipulación, así como del ciclo circadiano de temperatura de la rata. Como podemos observar en la tabla 6 las temperaturas se mantienen entre los 36.48 y 36.97°C. No hay incremento de la temperatura después de 16 horas, que es el tiempo en el que se determinó la temperatura febril en los grupos a los que se les inoculó levadura. Por lo que se puede afirmar que el incremento presentado por el resto de los animales es debido a la levadura. Durante la duración del experimento en este grupo se presentaron variaciones menores a 0.5°C entre cada medición. Con la prueba Kolmogorov-Smirnov (KS) verificamos que los resultados siguen un comportamiento normal, por lo que se procedió a realizar la prueba paramétrica ANOVA (tabla 7) para comparar entre los tiempos. No hubo diferencias significativas, lo que indica que ni la manipulación de los animales, ni el ciclo circadiano de temperatura de la rata tienen impacto sobre los resultados del experimento. La gráfica 1 ilustra el comportamiento de este grupo.

Tabla 6. Monitoreo de la temperatura del Grupo Cero. Sin tratamiento

Número	Basal	16 hrs	16.5 hrs	17 hrs	17.5 hrs	18 hrs	19 hrs	20 hrs
1	36.7	36.1	36.2	36.7	37.0	37.1	37.2	36.9
2	36.5	35.8	36.3	36.2	36.5	36.7	36.3	36.8
3	36.9	36.9	37.0	36.7	36.5	36.9	36.3	36.4
4	36.9	36.4	36.7	37.0	37.1	36.8	36.5	36.4
5	37.0	36.4	36.7	37.0	37.2	36.8	36.9	36.5
6	37.6	37.9	37.4	37.1	36.5	36.5	36.2	36.4
7	36.9	37.3	37.5	37.0	36.9	36.7	36.0	36.2
8	36.7	36.6	36.8	37.1	37.2	37.1	36.7	36.6
9	37.4	37.5	37.3	37.1	37.2	36.9	36.5	36.7
10	37.1	36.5	36.0	36.1	36.7	36.8	36.2	36.4
Media	36.97	36.74	36.79	36.80	36.88	36.83	36.48	36.53
Desviación estándar	0.33	0.66	0.52	0.37	0.30	0.18	0.36	0.22
Error estándar	0.10	0.21	0.16	0.12	0.10	0.06	0.12	0.07

Tabla 7. ANOVA del Grupo Cero. Sin tratamiento

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Entre grupos	1.97	7	0.28	1.80	0.10	No
Dentro de los grupos	11.27	72	0.16			
Total	13.24	79				



Gráfica 1. Monitoreo de la temperatura del Grupo Cero. Se representa la Media±E.E. de la temperatura rectal de las ratas a las que no se les administró ningún tratamiento. La temperatura se mantiene entre 36.48 y 36.97°C con una variación menor a 0.5°C entre las mediciones a los diferentes tiempos. No existen diferencias significativas (ANOVA, p< 0.05).

De las tres etapas de inducción de fiebre que se realizaron, solamente se seleccionaron los animales con incremento de temperatura a partir de 0.5°C, por lo que a pesar de haber iniciado con el mismo número de ratas para todos los grupos, el tamaño de muestra se redujo a las que cumplieron este criterio, además de que algunos murieron por broncoaspiración al administrarles el tratamiento.

La administración del tratamiento se realizó por vía oral mediante sondas intragástricas: Grupo A: Solución salina, Grupo B: Paracetamol, Grupo C: Extracto crudo de flor de jamaica, Grupo D: Fracción proteica de flor de jamaica y Grupo E: Pigmentos de flor de jamaica. En la primera etapa el monitoreo de la temperatura se realizó a los 30, 60, 120 y 180 minutos después de haber recibido el tratamiento. En la segunda etapa se realizó a los 30, 60, 90 y 120 minutos, y en la tercera a los 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos. Los resultados para cada grupo se muestran en las tablas 8 a 12. En cada tabla aparece la temperatura basal y febril de los animales, así como el monitoreo realizado a los diferentes tiempos posteriores a la administración del tratamiento.

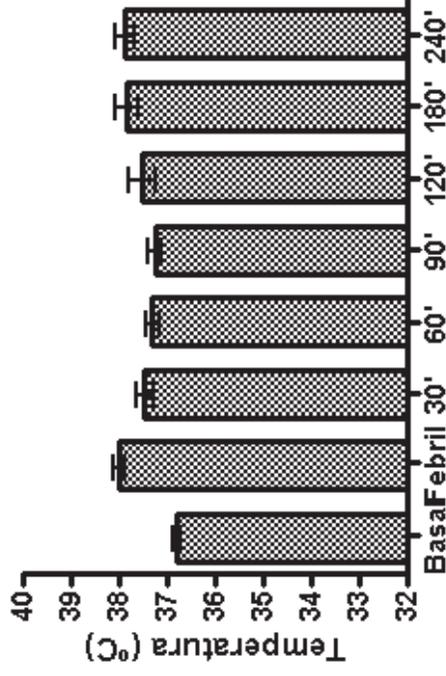
En el grupo de solución salina (tabla 8 y gráfica 2), algunos animales presentaron un ligero descenso de temperatura durante los primeros 90 minutos posteriores a la administración del tratamiento, pero a partir de los 120 minutos comenzó a aumentarles nuevamente la temperatura.

Con el paracetamol, a excepción de la rata 5, el resto presentaron el descenso de temperatura desde los 30 minutos (tabla 9 y gráfica 3), y a partir de allí continuó disminuyendo hasta que se mantuvo oscilando alrededor de los 36°C. En todos los animales se llegó a una temperatura menor a la basal. Por ejemplo, la rata 7 presentó una temperatura basal de 36.2°C, con la levadura se incrementó a 37.5°C y con el paracetamol se redujo hasta 35.2°C.

Tabla 8. Inducción de fiebre y efecto de la solución salina sobre las ratas con fiebre Grupo A

Rata	Basal	Febрил	30'	60'	90'	120'	180'	240'
1	36.2	37.4	37.3	38.0		38.2	36.8	
2	37.0	37.8	37.8	37.7		36.6	38.0	
3	36.9	38.2	37.5	37.6		36.4	38.1	
4	36.6	38.1	37.3	37.6		36.8	37.5	
5	37.0	38.7	38.1	37.9		36.9	36.2	
6	36.6	37.7	37.5	37.0	36.8	36.7		
7	37.1	37.8	36.8	36.7	37.6	38.8	38.1	38.4
8	36.8	37.8	36.9	36.4	37.1	39.3	38.0	37.9
9	36.9	37.7	36.5	37.0	37.3	38.8	38.0	38.3
10	36.9	38.8	39.0	37.3	37.6	37.5	38.3	38.1
11	36.7	38.1	37.3	37.2	36.8	36.9	39.4	37.1
12	37.1	37.9	37.6	37.3	37.6	37.3	37.9	37.5
Media	36.82	38.00	37.47	37.31	37.26	37.52	37.85	37.88
Desviación estándar	0.26	0.41	0.65	0.48	0.36	1.00	0.82	0.50
Error estándar	0.07	0.12	0.19	0.14	0.11	0.29	0.24	0.14

En las ratas de la primera etapa no se realizaron mediciones a los 90 y 240 minutos (ratas 1-5) y en las de la segunda etapa solo se realizaron mediciones hasta los 120 minutos (rata 6).

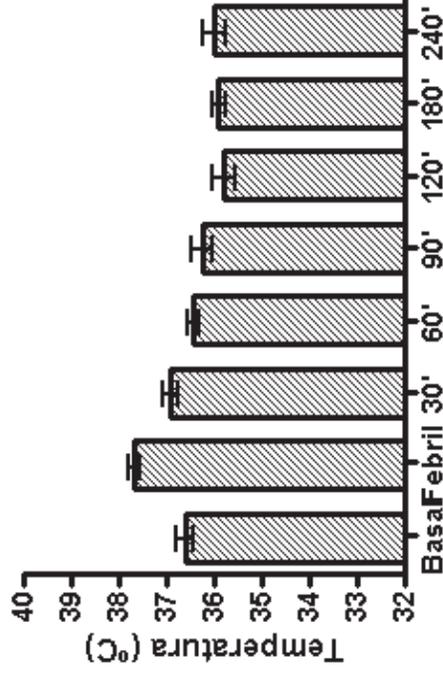


Gráfica 2. Inducción de fiebre y efecto de la solución salina sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media \pm E.E. de la temperatura rectal de las ratas antes de la inducción de fiebre (basal), después de la inducción de fiebre (febрил), y 30, 60, 90 120, 180 y 240 minutos posteriores a la administración de la solución salina (n=12).

Tabla 9. Inducción de fiebre y efecto del paracetamol sobre las ratas con fiebre Grupo B

Rata	Basal	Febрил	30'	60'	90'	120'	180'	240'
1	36.6	38.0	37.2	36.6		35.9	35.0	
2	36.4	36.9	35.3	36.6		37.0	36.1	
3	36.8	37.4	36.7	36.5		35.1	36.2	
4	36.3	37.9	37.5	35.7		36.0	36.7	
5	35.6	37.0	37.5	36.8	35.3	33.8		
6	36.9	37.8	36.7	36.2	36.9	36.4	36.5	36.7
7	36.2	37.5	37.0	36.8	37.0	36.8	36.1	35.2
8	35.9	37.9	37.1	36.9	36.3	35.6	35.9	35.4
9	37.6	38.1	37.2	36.3	36.5	35.5	35.9	35.7
10	37.0	38.0	36.7	36.9	36.1	35.2	35.8	36.0
11	37.4	38.1	36.8	36.2	36.4	36.4	35.3	36.7
12	37.2	38.0	37.1	35.6	35.2	35.7	35.1	35.5
13	36.2	37.4	37.2	36.6	36.7	36.1	36.3	36.9
Media	36.62	37.69	36.92	36.44	36.27	35.81	35.91	36.01
Desviación estándar	0.59	0.41	0.56	0.42	0.64	0.83	0.54	0.67
Error estándar	0.16	0.11	0.16	0.12	0.21	0.23	0.15	0.24

En las ratas de la primera etapa no se realizaron mediciones a los 90 y 240 minutos (ratas 1-4) y en las de la segunda etapa solo se realizaron mediciones hasta los 120 minutos (rata 5).



Gráfica 3. Inducción de fiebre y efecto del paracetamol sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media±EE de la temperatura rectal de las ratas antes de la inducción de fiebre (basal), después de la inducción de fiebre (febрил), y 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos posteriores a la administración del paracetamol (n=13).

En el grupo del extracto crudo se puede observar un descenso de temperatura en la mayoría de los animales desde los 30 minutos, que para algunos alcanzó 1°C como en el caso de la rata 1. En algunas ratas como la 2 el descenso rebasó a la temperatura basal, y en otras como la 25, si se redujo la fiebre, pero no llegó al nivel basal (tabla 10 y gráfica 4).

Para la fracción proteica, solo en la mitad de los animales se observó descenso de temperatura en los primeros 90 minutos (tabla 11 y gráfica 5). Sin embargo para los 120 minutos todas las ratas, a excepción de la 18, habían presentado la reducción de temperatura.

En el caso de los pigmentos (tabla 12 y gráfica 6), a los 30 minutos la mitad de los animales presentaron una ligera reducción de temperatura. Para los 90 minutos todos habían presentado reducción de temperatura, y para los 180 la mitad había alcanzado una temperatura incluso menor a la basal.

En la tabla 13 se presenta un resumen de todos los grupos, con su media y error estándar. En ella se puede observar que mientras el control negativo permaneció febril durante todo el experimento, el resto de los tratamientos produjeron el efecto antipirético.

Tabla 13. Cuadro comparativo de resultados para los cinco tratamientos

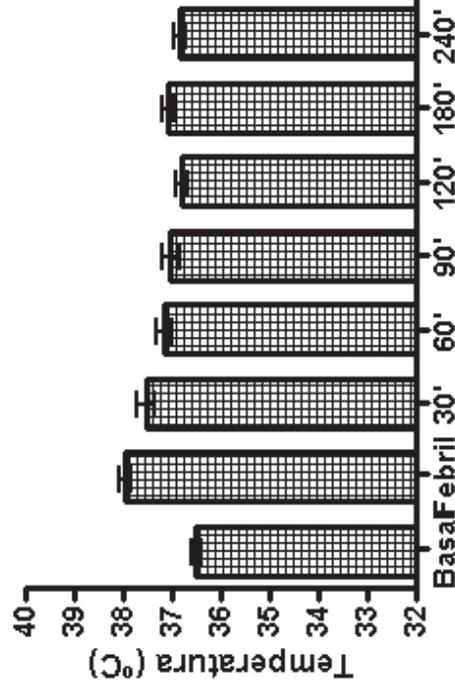
Grupo	Basal	Febril	30'	60'	90'	120'	180'	240'
Solución salina	36.82 ±0.07	38.00 ±0.12	37.47 ±0.19	37.31 ±0.14	37.26 ±0.11	37.52 ±0.29	37.85 ±0.24	37.88 ±0.14
Paracetamol	36.62 ±0.16	37.69 ±0.11	36.92 ±0.16	36.44 ±0.12	36.27 ±0.21	35.81 ±0.23	35.91 ±0.15	36.01 ±0.24
Extracto crudo de flor de jamaica	36.51 ±0.10	37.97 ±0.11	37.54 ±0.18	37.16 ±0.16	37.03 ±0.19	36.81 ±0.11	37.08 ±0.16	36.85 ±0.13
Fracción proteica de flor de jamaica	36.76 ±0.11	37.79 ±0.11	37.63 ±0.16	37.71 ±0.12	37.53 ±0.13	37.01 ±0.07	37.09 ±0.09	36.81 ±0.08
Pigmentos de flor de jamaica	36.38 ±0.11	37.26 ±0.16	37.20 ±0.22	36.75 ±0.21	36.33 ±0.20	36.24 ±0.21	36.01 ±0.25	36.48 ±0.16

Se representa la Media±E.E. de la temperatura rectal de las ratas antes de la inducción de fiebre (basal), después de la inducción de fiebre (febril), y 30, 60, 90 120, 180 y 240 minutos posterior a la administración de los tratamientos. Solución salina: n=12, paracetamol: n=13, extracto crudo: n=27, fracción proteica: n=20, pigmentos: n=8.

Tabla 10. Inducción de fiebre y efecto del extracto crudo de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre Grupo C

Rata	Basal	Febril	30'	60'	90'	120'	180'	240'
1	37.0	38.0	37.0	35.6	37.3	37.3	37.3	37.3
2	36.6	37.1	37.8	36.5	37.1	35.9	37.1	37.1
3	36.3	38.1	37.1	36.7	36.9	36.9	37.4	37.4
4	35.7	37.8	38.5	37.8	35.9	35.9	37.7	37.7
5	36.0	37.4	37.3	37.4	36.8	36.8	37.7	37.7
6	36.9	38.0	36.5	36.8	36.8	36.8	37.3	37.3
7	36.3	37.6	36.3	36.1	36.4	36.4	37.1	37.1
8	36.9	37.5	37.2	37.3	37.2	37.2	36.8	36.8
9	36.7	37.2	36.8	37.9	36.9	36.9	38.0	38.0
10	35.1	38.4	37.0	36.7	34.6	35.5		
11	36.5	38.6	38.8	38.0	37.3	37.3		
12	36.4	38.7	38.9	38.0	37.9	37.8		
13	36.8	38.4	34.9	34.5	36.8	37.3		
14	36.2	38.5	38.4	37.8	37.6	37.4		
15	37.2	37.9	37.9	38.6	38.2	36.2		
16	36.5	38.6	38.9	37.5	37.6	37.2		
17	36.7	38.5	37.9	37.5	37.5	36.3		
18	36.0	38.9	37.9	38.0	38.0	38.1		
19	36.0	39.1	39.1	37.9	36.3	36.9		
20	36.7	37.6	37.3	37.1	36.9	36.7	36.4	36.7
21	36.7	37.4	37.2	37.2	36.5	36.2	36.6	37.1
22	37.1	37.8	37.4	37.6	36.6	36.8	36.4	36.7
23	37.6	38.2	37.7	36.9	36.9	37.2	36.9	37.5
24	36.4	37.3	38.3	37.1	37.1	36.5	37.0	36.5
25	36.4	37.6	37.0	36.8	36.9	36.8	36.9	36.8
26	36.2	37.4	37.0	37.2	37.1	36.7	36.9	36.4
27	36.9	37.5	37.6	36.9	36.7	36.9	36.9	37.1
Media	36.51	37.97	37.54	37.16	37.03	36.81	37.08	36.85
DE	0.51	0.56	0.93	0.84	0.81	0.58	0.45	0.36
EE	0.10	0.11	0.18	0.16	0.19	0.11	0.16	0.13

En las ratas de la primera etapa no se realizaron mediciones a los 90 y 240 minutos (ratas 1-9) y en las de la segunda etapa solo se realizaron mediciones hasta los 120 minutos (rata 10-19). DE: desviación estándar. EE: error estándar

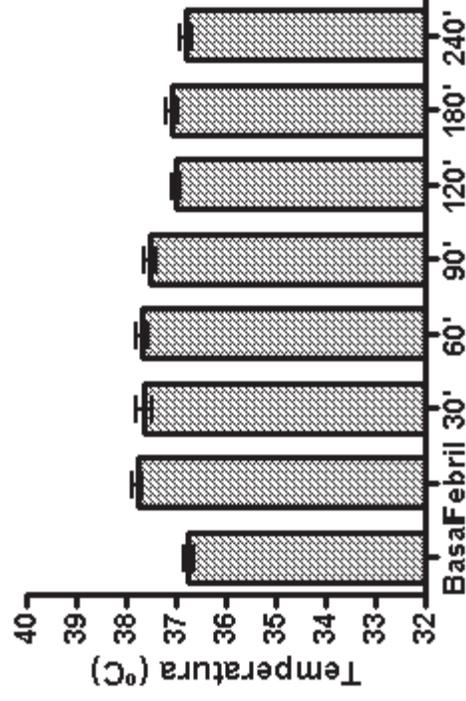


Gráfica 4. Inducción de fiebre y efecto del extracto crudo de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media±EE de la temperatura rectal de las ratas antes de la inducción de fiebre (basal), después de la inducción de fiebre (febril), y 30, 60, 90 120, 180 y 240 minutos posteriores a la administración del extracto crudo (n=27).

Tabla 11. Inducción de fiebre y efecto de la fracción proteica de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre Grupo D

Rata	Basal	Febрил	30'	60'	90'	120'	180'	240'
1	37.6	38.2	36.7	37.9		37.0	37.9	
2	37.5	38.1	36.4	37.7		37.6	37.7	
3	37.5	38.8	38.5	37.8	38.2	36.6		
4	37.1	37.9	38.0	37.6	38.2	36.6		
5	36.4	37.8	37.1	36.5	37.6	37.1		
6	36.8	37.8	39.2	38.1	37.7	37.0		
7	36.3	38.2	38.1	37.7	37.1	36.8		
8	37.0	38.1	37.4	37.9	37.9	37.2		
9	37.4	38.6	36.4	38.5	38.5	37.1		
10	36.7	38.1	38.1	38.6	38.4	37.5		
11	36.6	37.6	38.4	37.2	36.4	37.2	36.7	36.7
12	36.4	37.1	38.2	37.8	37.2	36.9	37.5	36.5
13	36.7	37.7	37.7	38.3	37.7	37.0	36.6	36.6
14	35.9	37.1	37.6	37.8	37.5	36.9	36.8	37.2
15	36.5	37.8	37.7	37.8	37.7	37.6	37.3	36.5
16	36.7	37.5	37.8	37.2	36.9	37.0	37.1	36.9
17	37.1	37.8	37.2	38.2	37.1	36.6	36.9	37.2
18	36.7	37.2	37.2	37.4	37.3	37.2	36.8	37.4
19	36.0	37.3	37.5	37.4	36.9	36.7	36.9	36.8
20	36.2	37.0	37.4	36.7	37.2	36.6	36.9	36.3
Media	36.76	37.79	37.63	37.71	37.53	37.01	37.09	36.81
Desviación estándar	0.50	0.49	0.70	0.54	0.57	0.32	0.42	0.36
Error estándar	0.11	0.11	0.16	0.12	0.13	0.07	0.09	0.08

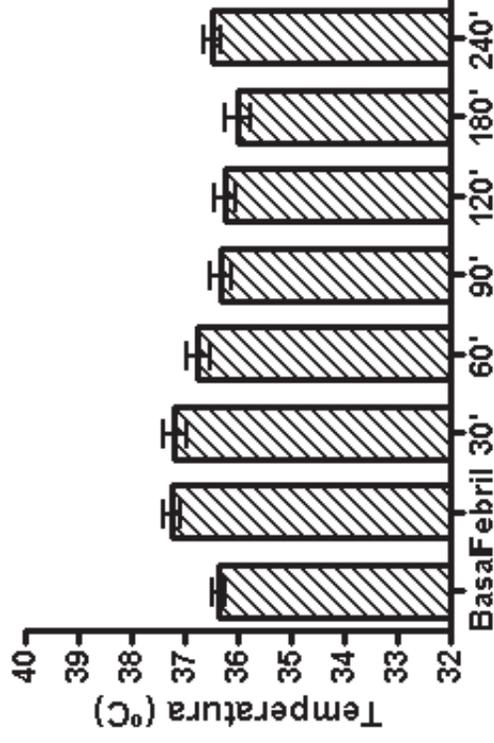
En las ratas de la primera etapa no se realizaron mediciones a los 90 y 240 minutos (ratas 1-2) y en las de la segunda etapa solo se realizaron mediciones hasta los 120 minutos (rata 3-10).



Gráfica 5. Inducción de fiebre y efecto de la fracción proteica de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media±EE de la temperatura rectal de las ratas antes de la inducción de fiebre (basal), después de la inducción de fiebre (febрил), y 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos posteriores a la administración de la fracción proteica (n=20).

Tabla 12. Inducción de fiebre y efecto de los pigmentos de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre Grupo F

Rata	Basal	Febril	30'	60'	90'	120'	180'	240'
1	36.3	36.8	36.7	36.0	35.6	35.1	35.7	36.5
2	36.0	37.4	38.0	37.2	37.2	36.9	36.1	36.9
3	36.6	38.1	38.1	36.6	35.6	35.8	35.9	35.9
4	36.6	37.2	37.2	37.1	36.5	36.2	36.3	36.0
5	36.1	36.8	36.5	35.8	36.0	36.3	35.7	36.8
6	36.4	37.3	36.6	37.1	36.8	36.9	37.0	37.1
7	36.9	37.6	36.9	36.8	36.4	36.3	34.7	36.0
8	36.1	36.9	37.6	37.4	36.5	36.4	36.7	36.6
Media	36.38	37.26	37.20	36.75	36.33	36.24	36.01	36.48
Desviación estándar	0.31	0.45	0.63	0.58	0.56	0.59	0.70	0.46
Error estándar	0.11	0.16	0.22	0.21	0.20	0.21	0.25	0.16



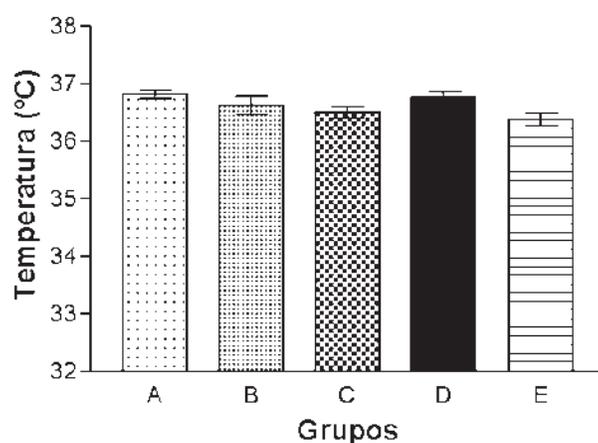
Gráfica 6. Inducción de fiebre y efecto de los pigmentos de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media±EE de la temperatura rectal de las ratas antes de la inducción de fiebre (basal), después de la inducción de fiebre (febril), y 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos posteriores a la administración de los pigmentos (n=8).

Al igual que para los resultados del grupo Cero, se hizo la prueba KS para evaluar la normalidad de los resultados de todos los grupos tratados. Como todos presentaron comportamientos normales, se utilizaron análisis paramétricos.

Primero se realizó una prueba ANOVA para comparar las temperaturas basales de los grupos tratados (A al E) y no se encontraron diferencias significativas (tabla 14 y gráfica 7). Lo que comprueba que partimos de una muestra homogénea.

Tabla 14. ANOVA de las temperaturas basales de los cinco grupos tratados

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Entre grupos	1.629	4	0.4071	1.793	0.1391	No
Dentro de los grupos	17.03	75	0.2271			
Total	18.66	79				



Gráfica 7. Temperaturas basales de los grupos tratados. Media \pm E.E. No existe diferencia estadísticamente significativa entre ellas (ANOVA, p< 0.05).

El incremento de temperatura inducido mediante la inyección de levadura fue de 1.18°C en el grupo A, 1.07°C en el grupo B, 1.46°C en el grupo C, 1.03°C en el grupo D y 0.89°C en el grupo E, y resultó significativo al comparar la temperatura basal con su respectiva temperatura febril por medio de una prueba t-student (tabla 15 y gráfica 8).

Tabla 15. Prueba t-student para comparar la temperatura basal con la febril de cada grupo tratado

Grupo	t	Grados de libertad	Valor de p	Significancia (p< 0.05)
A	10.560	11	P<0.0001	Sí
B	8.367	12	P<0.0001	Sí
C	9.098	26	P<0.0001	Sí
D	13.120	19	P<0.0001	Sí
E	6.818	7	0.0002	Sí

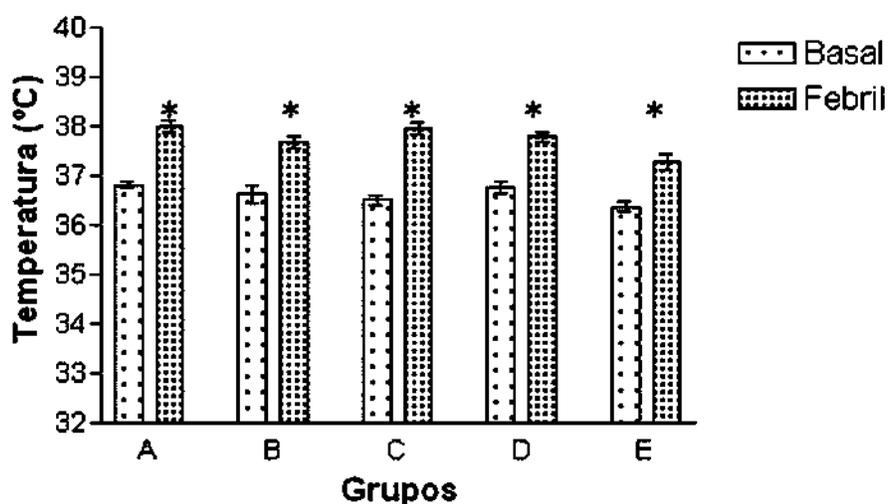


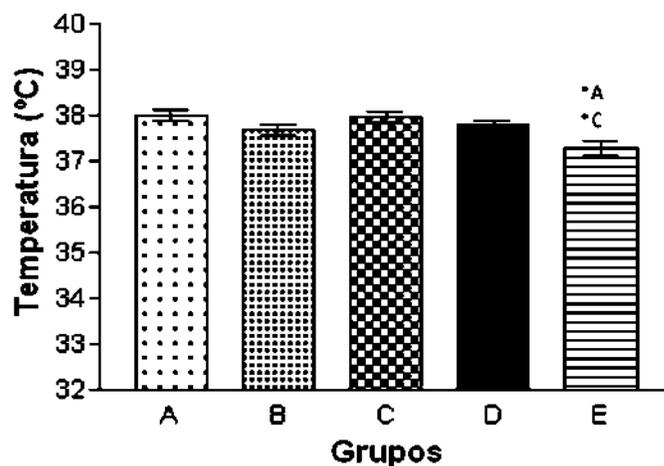
Gráfico 8. Incremento de la temperatura rectal inducido con levadura de cerveza. Media \pm E.E. * Diferencia estadísticamente significativa (Prueba t, p< 0.05).

Al realizar la prueba de ANOVA *post hoc* Bonferroni para comparar las temperaturas febriles de todos los grupos (tabla 16), se encontró una diferencia significativa entre el grupo de los pigmentos con el grupo control de solución salina y con el grupo de extracto crudo. Como se observa en las gráficas 8 y 9 dicha diferencia se debe a que el aumento de temperatura en el grupo de los pigmentos es menor (0.88°C) que en los dos grupos de los cuales difiere (1.18 y 1.46°C respectivamente).

Tabla 16. ANOVA *post hoc* Bonferroni de las temperaturas febriles de los cinco grupos tratados

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p < 0.05)
Entre grupos	3.686	4	0.9216	3.829	0.0069	Sí
Dentro de los grupos	18.05	75	0.2407			
Total	21.74	79				

Comparación	t	Probabilidad	Significancia (p < 0.05)
A vs B	1.567	P > 0.05	No
A vs C	0.1958	P > 0.05	No
A vs D	1.2	P > 0.05	No
A vs E	3.293	P < 0.05	Sí
B vs C	1.657	P > 0.05	No
B vs D	0.5303	P > 0.05	No
B vs E	1.95	P > 0.05	No
C vs D	1.255	P > 0.05	No
C vs E	3.565	P < 0.01	Sí
D vs E	2.546	P > 0.05	No



Gráfica 9. Temperaturas febriles de los grupos tratados. Se representa la Media ± E.E. Existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo A (solución salina) y el E (pigmentos) (*A), y entre el C (extracto crudo) y el E (pigmentos) (*C) (ANOVA *post hoc* Bonferroni, p < 0.05).

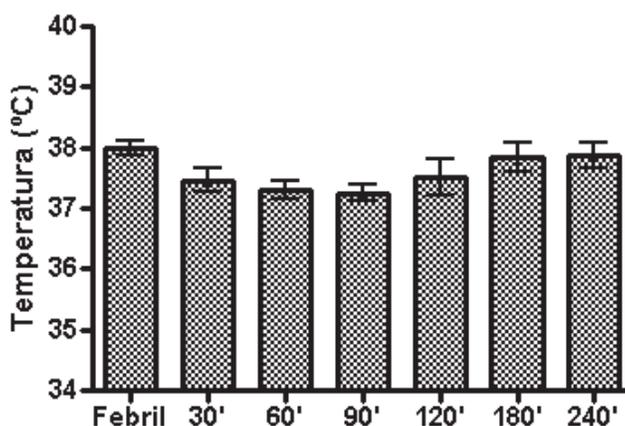
Para evaluar el efecto de cada uno de los tratamientos por separado se realizó una prueba de ANOVA *post hoc* Bonferroni por medio de la cual se comparó la temperatura febril con la respuesta a cada uno de los diferentes tiempos.

En el grupo al que se le administró solución salina, a pesar de verse un descenso de temperatura en los primeros 90 minutos que llegó hasta 37.26°C (gráfica 10), éste no fue significativo (tabla 17); a partir de ese tiempo la temperatura comenzó a aumentar nuevamente, por lo que las ratas permanecieron con fiebre durante la duración de todo el experimento.

Tabla 17. ANOVA *post hoc* Bonferroni del Grupo A Solución salina

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Entre grupos	5.198	6	0.8663	1.949	0.086	No
Dentro de los grupos	28.89	65	0.4444			
Total	34.08	71				

Comparación	t	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Fiebre vs 30'	1.96	P > 0.05	No
Fiebre vs 60'	2.542	P > 0.05	No
Fiebre vs 90'	2.343	P > 0.05	No
Fiebre vs 120'	1.776	P > 0.05	No
Fiebre vs 180'	0.5554	P > 0.05	No
Fiebre vs 240'	0.35	P > 0.05	No



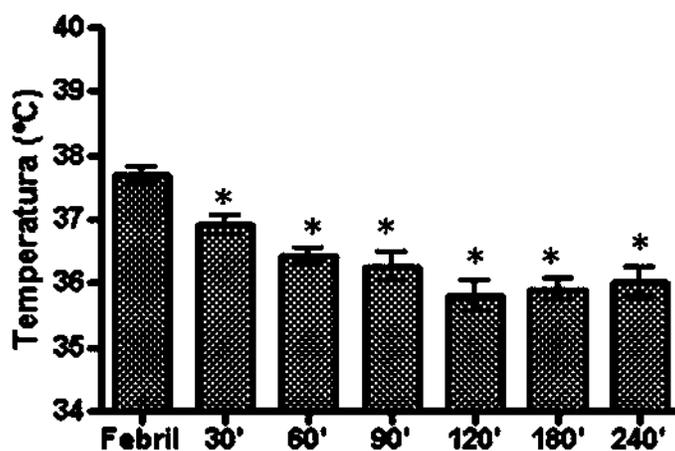
Gráfica 10. Efecto de la solución salina sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media \pm E.E. La solución salina no produjo una reducción significativa de la temperatura, puesto que las ratas se mantuvieron con una temperatura superior a los 37.2°C (ANOVA, p< 0.05).

Con el paracetamol observamos una reducción de la temperatura estadísticamente significativa desde los 30 minutos (tabla 18 y gráfica 11), que aumentó gradualmente hasta alcanzar aproximadamente 36°C donde se mantuvo hasta los 240 minutos. Dicha temperatura es incluso menor a la basal y representó una disminución de 1.88°C.

Tabla 18. ANOVA *post hoc* Bonferroni del Grupo B Paracetamol

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Entre grupos	33.64	6	5.606	16.07	P<0.0001	Sí
Dentro de los grupos	25.81	74	0.3488			
Total	59.45	80				

Comparación	t	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Fiebre vs 30'	3.321	P < 0.01	Sí
Fiebre vs 60'	5.413	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 90'	5.567	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 120'	8.136	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 180'	7.546	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 240'	6.33	P < 0.001	Sí



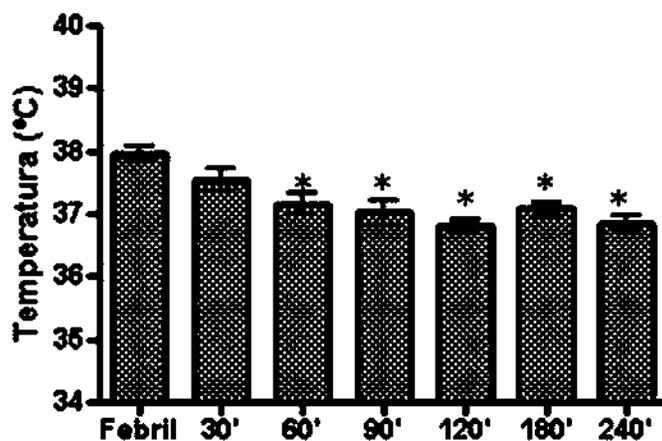
Gráfica 11. Efecto del paracetamol sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media ± E.E. El paracetamol produjo una reducción significativa de la temperatura desde los 30 minutos, siendo máxima a los 120 minutos (ANOVA *post hoc* Bonferroni, *p< 0.05).

Con el extracto crudo de flor de jamaica también se apreció un descenso gradual de la temperatura, que resultó significativo a partir de los 60 minutos y alcanzó su máximo a las dos horas (tabla 19 y gráfica 12), logrando una disminución de 1.16°C.

Tabla 19. ANOVA *post hoc* Bonferroni del Grupo C Extracto crudo

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Entre grupos	24.2	6	4.033	7.947	P<0.0001	Sí
Dentro de los grupos	73.08	144	0.5075			
Total	97.28	150				

Comparación	t	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Fiebre vs 30'	2.178	P > 0.05	No
Fiebre vs 60'	4.145	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 90'	4.331	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 120'	5.960	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 180'	4.009	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 240'	3.894	P < 0.001	Sí



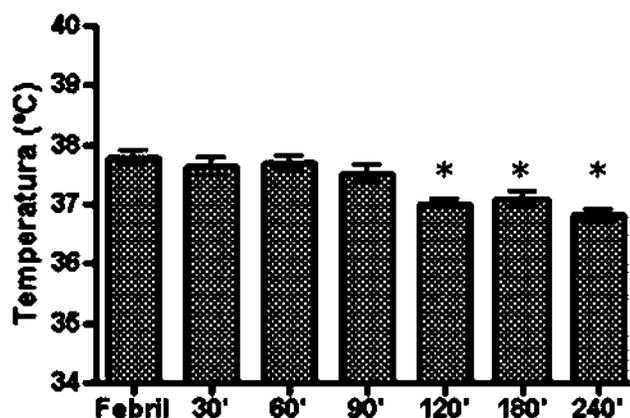
Gráfica 12. Efecto del extracto crudo de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media \pm E.E. El extracto crudo produjo una reducción de la temperatura desde los 30 minutos, que fue significativa a partir de los 60 minutos y máxima a los 120 minutos (ANOVA *post hoc* Bonferroni, *p< 0.05).

La fracción proteica de flor de jamaica produjo un descenso de la temperatura estadísticamente significativo, que se comenzó a apreciar a los 120 minutos y se mantuvo los 240 minutos, siendo éste su punto máximo, y representó una disminución de 0.98°C (tabla 20 y gráfica 13).

Tabla 20. ANOVA *post hoc* Bonferroni del Grupo D Fracción proteica

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Entre grupos	13.75	6	2.292	8.629	P<0.0001	Sí
Dentro de los grupos	30.01	113	0.2656			
Total	43.76	119				

Comparación	t	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Fiebre vs 30'	0.9511	P > 0.05	No
Fiebre vs 60'	0.4909	P > 0.05	No
Fiebre vs 90'	1.536	P > 0.05	No
Fiebre vs 120'	4.756	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 180'	3.685	P < 0.01	Sí
Fiebre vs 240'	4.885	P < 0.001	Sí



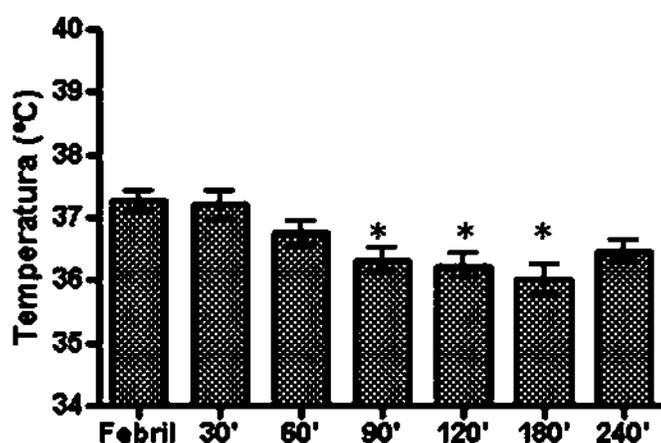
Gráfica 13. Efecto la fracción proteica de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media \pm E.E. La fracción proteica produjo una reducción significativa de la temperatura a partir de los 120 minutos, siendo máxima a los 240 minutos (ANOVA *post hoc* Bonferroni, *p< 0.05).

Los pigmentos de flor de jamaica produjeron también un descenso gradual de la temperatura que se comenzó a observar desde los 60 minutos, pero fue significativo a partir de los 90 minutos y hasta los 180 minutos, después de los cuales la temperatura volvió a aumentar (tabla 21 y gráfica 14). El máximo descenso se produjo a los 180 minutos siendo de 1.25°C.

Tabla 21. ANOVA *post hoc* Bonferroni del Grupo E Pigmentos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p < 0.05)
Entre grupos	11.11	6	1.852	5.629	0.0002	Sí
Dentro de los grupos	16.12	49	0.3289			
Total	27.23	55				

Comparación	t	Probabilidad	Significancia (p < 0.05)
Fiebre vs 30'	0.218	P > 0.05	No
Fiebre vs 60'	1.787	P > 0.05	No
Fiebre vs 90'	3.269	P < 0.05	Sí
Fiebre vs 120'	3.575	P < 0.01	Sí
Fiebre vs 180'	4.359	P < 0.001	Sí
Fiebre vs 240'	2.746	P > 0.05	No



Gráfica 14. Efecto los pigmentos de flor de jamaica sobre las ratas con fiebre. Se representa la Media \pm EE. Los pigmentos produjeron una reducción de la temperatura desde los 60 minutos, que fue significativa de los 90 minutos hasta los 180 minutos y máxima a los 180 minutos. A los 240 minutos la temperatura comenzó a incrementar nuevamente (ANOVA *post hoc* Bonferroni, *p < 0.05).

Finalmente se hizo una comparación entre los diferentes tratamientos mediante un ANOVA de dos vías *post hoc* Bonferroni (tabla 22). Como se describió anteriormente, al partir de temperaturas basales y febriles semejantes, se comprobó que las diferencias encontradas son debidas al efecto de los tratamientos durante los tiempos de monitoreo de la respuesta. Primero se realizó una comparación entre el grupo control negativo con el resto de los grupos. Después entre el control positivo con el resto de los grupos y finalmente entre los tres grupos de flor de jamaica.

Tabla 22. ANOVA dos vías *post hoc* Bonferroni de los cinco tratamientos

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Interacción	32.35	28	1.155	3.147	P<0.0001	Sí
Tratamiento	77.23	4	19.31	52.58	P<0.0001	Sí
Tiempo	59.83	7	8.547	23.28	P<0.0001	Sí
Residual	190.9	520	0.3672			
Valores omitidos	-40					

Comparación	Media 1	Media 2	Diferencia	t	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
<i>A vs B</i>	<i>Sol. salina</i>	<i>Paracetamol</i>				
Basal	36.82	36.62	-0.1936	0.7981	P > 0.05	No
Febril	38.00	37.69	-0.3077	1.268	P > 0.05	No
30'	37.47	36.92	-0.5436	2.241	P > 0.05	No
60'	37.31	36.44	-0.8699	3.586	P<0.01	Sí
90'	37.26	36.27	-0.9905	3.244	P < 0.05	Sí
120'	37.52	35.81	-1.709	7.045	P<0.001	Sí
180'	37.85	35.91	-1.937	7.659	P<0.001	Sí
240'	37.88	36.01	-1.871	5.717	P<0.001	Sí
<i>A vs C</i>	<i>Sol. salina</i>	<i>Extracto crudo</i>				
Basal	36.82	36.51	-0.3056	1.453	P > 0.05	No
Febril	38.00	37.97	-0.03333	0.1586	P > 0.05	No
30'	37.47	37.54	0.07778	0.37	P > 0.05	No
60'	37.31	37.16	-0.1454	0.6915	P > 0.05	No
90'	37.26	37.03	-0.2294	0.8498	P > 0.05	No
120'	37.52	36.81	-0.7056	3.356	P<0.01	Sí
180'	37.85	37.08	-0.7631	3.255	P<0.01	Sí
240'	37.88	36.85	-1.033	3.158	P < 0.05	Sí

Tabla 22. ANOVA dos vías *post hoc* Bonferroni de los cinco tratamientos (continuación)

Comparación	Media 1	Media 2	Diferencia	t	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
<i>A vs D</i>	<i>Sol. salina</i>	<i>Fracción proteica</i>				
Basal	36.82	36.76	-0.06166	0.2787	P > 0.05	No
Febril	38.00	37.79	-0.215	0.9717	P > 0.05	No
30'	37.47	37.63	0.1633	0.7382	P > 0.05	No
60'	37.31	37.71	0.3967	1.793	P > 0.05	No
90'	37.26	37.53	0.2706	1.003	P > 0.05	No
120'	37.52	37.01	-0.5067	2.29	P > 0.05	No
180'	37.85	37.09	-0.7538	2.98	P < 0.05	Sí
240'	37.88	36.81	-1.073	3.43	P<0.01	Sí
<i>A vs E</i>	<i>Sol. salina</i>	<i>Pigmentos</i>				
Basal	36.82	36.38	-0.4417	1.597	P > 0.05	No
Febril	38.00	37.26	-0.7375	2.667	P > 0.05	No
30'	37.47	37.2	-0.2667	0.9642	P > 0.05	No
60'	37.31	36.75	-0.5583	2.019	P > 0.05	No
90'	37.26	36.33	-0.9321	2.972	P < 0.05	Sí
120'	37.52	36.24	-1.279	4.625	P<0.001	Sí
180'	37.85	36.01	-1.833	6.51	P<0.001	Sí
240'	37.88	36.48	-1.408	4.304	P<0.001	Sí
<i>B vs C</i>	<i>Paracetamol</i>	<i>Extracto crudo</i>				
Basal	36.62	36.51	-0.112	0.5474	P > 0.05	No
Febril	37.69	37.97	0.2744	1.341	P > 0.05	No
30'	36.92	37.54	0.6214	3.038	P < 0.05	Sí
60'	36.44	37.16	0.7245	3.542	P<0.01	Sí
90'	36.27	37.03	0.7611	3.077	P < 0.05	Sí
120'	35.81	36.81	1.003	4.905	P<0.001	Sí
180'	35.91	37.08	1.174	5.139	P<0.001	Sí
240'	36.01	36.85	0.8375	2.764	P < 0.05	Sí
<i>B vs D</i>	<i>Paracetamol</i>	<i>Fracción proteica</i>				
Basal	36.62	36.76	0.1319	0.6111	P > 0.05	No
Febril	37.69	37.79	0.09269	0.4294	P > 0.05	No
30'	36.92	37.63	0.7069	3.275	P<0.01	Sí
60'	36.44	37.71	1.267	5.867	P<0.001	Sí
90'	36.27	37.53	1.261	5.098	P<0.001	Sí
120'	35.81	37.01	1.202	5.569	P<0.001	Sí
180'	35.91	37.09	1.183	4.784	P<0.001	Sí
240'	36.01	36.81	0.7975	2.775	P < 0.05	Sí

Tabla 22. ANOVA dos vías *post hoc* Bonferroni de los cinco tratamientos (continuación)

Comparación	Media 1	Media 2	Diferencia	t	Probabilidad	Significancia (p < 0.05)
<i>B vs E</i>	<i>Paracetamol</i>	<i>Pigmentos</i>				
Basal	36.62	36.38	-0.2481	0.9111	P > 0.05	No
Febril	37.69	37.26	-0.4298	1.579	P > 0.05	No
30'	36.92	37.2	0.2769	1.017	P > 0.05	No
60'	36.44	36.75	0.3115	1.144	P > 0.05	No
90'	36.27	36.33	0.05833	0.1981	P > 0.05	No
120'	35.81	36.24	0.4298	1.579	P > 0.05	No
180'	35.91	36.01	0.1042	0.3766	P > 0.05	No
240'	36.01	36.48	0.4625	1.527	P > 0.05	No
<i>C vs D</i>	<i>Extracto crudo</i>	<i>Fracción proteica</i>				
Basal	36.51	36.76	0.2439	1.364	P > 0.05	No
Febril	37.97	37.79	-0.1817	1.016	P > 0.05	No
30'	37.54	37.63	0.08556	0.4786	P > 0.05	No
60'	37.16	37.71	0.542	3.032	P < 0.05	Sí
90'	37.03	37.53	0.5	2.475	P > 0.05	No
120'	36.81	37.01	0.1989	1.113	P > 0.05	No
180'	37.08	37.09	0.009315	0.04077	P > 0.05	No
240'	36.85	36.81	-0.04	0.1392	P > 0.05	No
<i>C vs E</i>	<i>Extracto crudo</i>	<i>Pigmentos</i>				
Basal	36.51	36.38	-0.1361	0.558	P > 0.05	No
Febril	37.97	37.26	-0.7042	2.887	P < 0.05	Sí
30'	37.54	37.2	-0.3444	1.412	P > 0.05	No
60'	37.16	36.75	-0.413	1.693	P > 0.05	No
90'	37.03	36.33	-0.7028	2.729	P > 0.05	No
120'	36.81	36.24	-0.5736	2.352	P > 0.05	No
180'	37.08	36.01	-1.07	4.118	P < 0.001	Sí
240'	36.85	36.48	-0.375	1.238	P > 0.05	No
<i>D vs E</i>	<i>Fracción proteica</i>	<i>Pigmentos</i>				
Basal	36.76	36.38	-0.38	1.499	P > 0.05	No
Febril	37.79	37.26	-0.5225	2.061	P > 0.05	No
30'	37.63	37.2	-0.43	1.696	P > 0.05	No
60'	37.71	36.75	-0.955	3.767	P < 0.01	Sí
90'	37.53	36.33	-1.203	4.671	P < 0.001	Sí
120'	37.01	36.24	-0.7725	3.048	P < 0.05	Sí
180'	37.09	36.01	-1.079	3.902	P < 0.001	Sí
240'	36.81	36.48	-0.335	1.166	P > 0.05	No

Al comparar el control negativo de solución salina con el control positivo de paracetamol observamos que al mantenerse febril el control negativo y reducir su temperatura el control positivo, la diferencia entre estos dos grupos a partir de los 60 y hasta los 240 minutos es muy significativa. Esto indica que el paracetamol produce un efecto antipirético importante a partir de una hora posterior a su administración, que dura hasta las cuatro horas. En el grupo del extracto crudo de flor de jamaica, a pesar de que la disminución de la temperatura comienza desde los 30 minutos, alcanza una diferencia significativa respecto al control negativo solo a partir de los 120 minutos. Por lo que podemos afirmar que el extracto crudo presenta un efecto antipirético notable a partir de dos horas posteriores a su administración, y que dicho efecto se mantiene hasta las cuatro horas. La fracción proteica de flor de jamaica alcanza a diferenciarse del control negativo solamente a partir de los 180 minutos y la diferencia permanece a los 240 minutos. Por lo que dicha fracción genera un efecto antipirético tardío en comparación con el resto de los grupos, que se manifiesta a las tres horas posteriores a su administración. El efecto de los pigmentos de flor de jamaica permite apreciar una diferencia significativa con respecto al control negativo, a partir de los 90 minutos. Lo que demuestra los pigmentos producen un efecto antipirético apreciable desde los 90 minutos posteriores a su administración, y que permanece hasta las cuatro horas.

Al comparar el grupo control positivo con los tres grupos de jamaica vemos que también existen diferencias. Aunque el efecto del extracto crudo siga el mismo comportamiento que el del paracetamol, es decir, comience a reducir la fiebre desde los 30 minutos y continúe con una reducción gradual, la disminución debida al segundo es mayor, lo que se refleja en una diferencia significativa durante la duración de todo el experimento. Esto indica que aunque el extracto crudo presenta el efecto antipirético, no iguala el efecto del paracetamol, pues mientras el primero logró una disminución de 1.16°C , el segundo alcanzó 1.88°C . Para la fracción proteica tenemos el mismo caso. Aunque hay presencia de antipiresis a partir de los 120 minutos, la disminución de temperatura fue solamente de 0.98°C y no se iguala a la producida por el paracetamol. Por el contrario, los pigmentos de

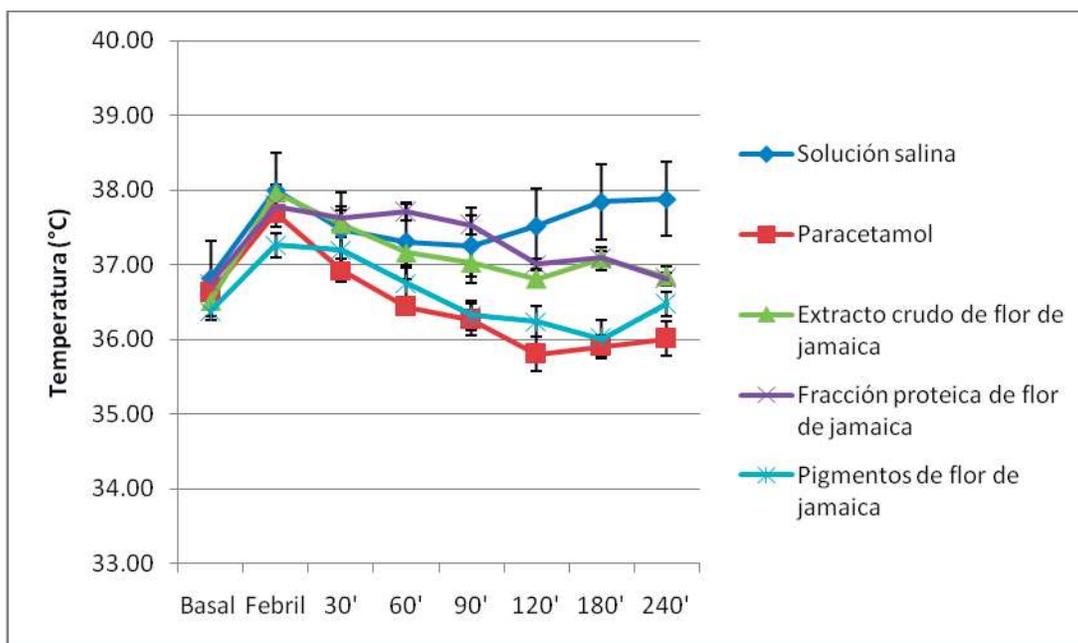
flor de jamaica a la concentración utilizada produjeron un comportamiento muy semejante al paracetamol durante todo el experimento, logrando una disminución de 1.25°C, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre estos dos tratamientos.

Al realizar la comparación entre el tratamiento con el extracto crudo y la fracción proteica de flor de jamaica vemos que a pesar de que en los primeros 90 minutos el comportamiento difiere debido a que la fracción proteica no reduce la temperatura sino hasta los 120 minutos, a partir de allí ambos grupos tienen la misma respuesta. Solo existe una diferencia significativa a los 60 minutos debida al descenso de la temperatura producida por el extracto crudo, que no se presenta en el caso de la fracción proteica. En el resto de las mediciones el efecto de ambos tratamientos es semejante, no encontrándose diferencia estadísticamente significativa entre ellas. Lo que indica que el extracto crudo produce un efecto muy semejante al que produce la fracción proteica a partir de los 120 minutos. Al comparar el grupo del extracto crudo con el de los pigmentos tenemos una diferencia significativa entre las febriles debida a que el incremento de temperatura producido por la levadura en el caso del grupo C (extracto crudo) fue de 1.46°C, mientras que para el grupo E (pigmentos) fue solamente de 0.89, por lo que la comparación del efecto de los tratamientos no es tan fiable. Sin embargo se puede apreciar un comportamiento semejante entre estos dos grupos, a excepción de los 180 minutos, donde los pigmentos presentan la reducción máxima de temperatura, con lo cual supera al extracto crudo.

Comparando el grupo de la fracción proteica con el de los pigmentos observamos que a los 30 minutos ambos tratamientos producen descenso de temperatura casi nulo, sin embargo a los 60 minutos los pigmentos producen una reducción considerable que aumenta hasta los 180 minutos, por lo tanto en este intervalo existe una diferencia significativa entre ambos tratamientos. A los 240 minutos el efecto de los pigmentos comienza a perderse, mientras que el de las proteínas permanece. Esto indica que los pigmentos inducen una respuesta más rápida y

mayor que la de las proteínas, pero que la respuesta de las proteínas se mantiene cuando la de los pigmentos se pierde.

En la gráfica 15 se ilustra la respuesta de cada grupo a su respectivo tratamiento. En ella se puede observar que los pigmentos de flor de jamaica producen el efecto más semejante al del paracetamol y que el efecto de la fracción proteica iguala al del extracto crudo a partir de los 120 minutos.



Gráfica 15. Comparación de los tratamientos. La gráfica representa la media de la temperatura rectal de las ratas antes de la inducción de fiebre (basal), después de la inducción de fiebre (febril), y 30, 60, 90 120, 180 y 240 minutos posteriores a la administración de los tratamientos. Como podemos observar el control negativo al principio presenta una disminución de la temperatura, pero después vuelve a aumentar y la fiebre se mantiene. El control positivo de paracetamol es el que tiene el mayor descenso en la temperatura, seguido por el grupo de los pigmentos de flor de jamaica, que produce un efecto comparable al del control positivo. El extracto crudo de flor de jamaica presenta un efecto menor al del paracetamol, pero comparable al de los pigmentos. El grupo de la fracción proteica presenta efecto hasta los 120 minutos, a partir de los cuales iguala al efecto producido por el extracto crudo de flor de jamaica.

EVALUACIÓN DE CONCENTRACIONES CIRCULANTES DE CITOCINAS

Para la determinación de las citocinas proinflamatorias TNF α , IL-1 α , IL-6, e IFN γ , al finalizar el monitoreo de temperatura se obtuvo sangre por punción cardiaca, se centrifugó y se separó el suero. En algunos casos no se logró obtener suficiente cantidad de suero para cuantificar las cuatro citocinas, por lo que solo tomamos en cuenta los resultados de los casos en que si se pudieron determinar todas. La cuantificación se llevó a cabo por el método de ELISA.

En la tabla 23 se muestran los resultados del grupo A, al que se le administró solución salina (control antipirético negativo). No se detectó la presencia de TNF α ni de IFN γ . La IL-1 α se encontró en niveles de alrededor de 5pg/mL, a excepción de la rata 8 en que el nivel fue un poco mayor, de 7.43pg/mL. Se observó la presencia de IL-6 en cuatro de las seis ratas, en un intervalo muy amplio, de entre 200 y 400pg/mL. En las dos ratas restantes no se manifestó la presencia de esta citocina. Por lo tanto en el grupo control negativo, a pesar de que las ratas aún presentaban fiebre al momento de tomar las muestras, ya no se encontraron presentes las citocinas TNF α e IFN γ , solamente se expresaban las citocinas IL-1 α e IL-6.

Tabla 23. Expresión de citocinas en el Grupo A Solución salina

Rata	TNF α (pg/mL)	IL-1 α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN γ (pg/mL)
2	0.00	5.34	203.90	0.00
3	0.00	5.21	0.00	0.00
4	0.00	5.50	234.59	0.00
8	0.00	7.43	0.00	0.00
11	0.00	5.40	310.82	0.00
12	0.00	5.45	397.15	0.00
Media	0.00	5.72	191.08	0.00
Desviación estándar	0.00	0.84	162.41	0.00
Error estándar	0.00	0.34	66.30	0.00

En el grupo B, al que se le administró paracetamol (control antipirético positivo), no se encontró presencia de TNF α , IFN γ ni de IL-6 (tabla 24). La IL-1 α se detectó solamente en 5 de 8 muestras, manteniéndose en un nivel de alrededor de 5pg/mL. Por lo tanto en el grupo control positivo, que fue el que manifestó el mayor descenso de temperatura, y que al momento de tomar la muestra ya no presentaba fiebre, hubo ausencia de las citocinas TNF α , IFN γ e IL-6. Solamente se manifestó la IL-1 α en aproximadamente la mitad de las ratas.

Tabla 24. Expresión de citocinas en el Grupo B Paracetamol

Rata	TNF α (pg/mL)	IL-1 α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN γ (pg/mL)
1	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	5.55	0.00	0.00
4	0.00	5.45	0.00	0.00
6	0.00	5.18	0.00	0.00
7	0.00	5.95	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00	0.00
9	0.00	5.26	0.00	0.00
10	0.00	0.00	0.00	0.00
Media	0.00	3.42	0.00	0.00
Desviación estándar	0.00	2.84	0.00	0.00
Error estándar	0.00	1.01	0.00	0.00

Las citocinas TNF α e IFN γ tampoco se encontraron presentes en el grupo C (extracto crudo de flor de jamaica) (tabla 25). La IL-1 α se encontró en concentraciones entre 5-8pg/mL en todas las ratas, mientras que la IL-6 se manifestó en concentraciones más elevadas, con un intervalo bastante amplio, desde 173.71 hasta 460.52pg/mL. Por lo tanto en el grupo de extracto crudo de jamaica, en el que la temperatura se redujo, pero no lo alcanzó el estado basal, estaban presentes las citocinas IL-1 α e IL-6.

Tabla 25. Expresión de citocinas en el Grupo C Extracto crudo

Rata	TNF α (pg/mL)	IL-1 α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN γ (pg/mL)
1	0.00	7.13	176.71	0.00
2	0.00	5.39	312.04	0.00
4	0.00	5.58	356.20	0.00
5	0.00	5.55	300.34	0.00
6	0.00	6.39	196.83	0.00
8	0.00	5.69	342.84	0.00
10	0.00	5.60	353.42	0.00
21	0.00	8.31	330.62	0.00
23	0.00	5.46	460.52	0.00
24	0.00	7.41	192.44	0.00
Media	0.00	6.25	302.20	0.00
Desviación estándar	0.00	1.02	89.48	0.00
Error estándar	0.00	0.32	28.30	0.00

En el grupo E (fracción proteica de flor de jamaica) no se encontró la presencia de TNF α ni de IFN γ (tabla 26). La IL-1 α se detectó en 5 de 12 muestras en concentraciones de entre 4-5pg/mL. La IL-6 se detectó en todas las muestras, con un intervalo amplio de concentración. La menor fue de 167.27pg/mL y la mayor de 897.85pg/mL.

Tabla 26. Expresión de citocinas en el Grupo E Fracción proteica

Rata	TNF α (pg/mL)	IL-1 α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN γ (pg/mL)
3	0.00	4.73	250.27	0.00
5	0.00	0.00	366.47	0.00
6	0.00	0.00	336.84	0.00
7	0.00	0.00	409.41	0.00
8	0.00	0.00	357.95	0.00
9	0.00	0.00	179.15	0.00
11	0.00	0.00	152.84	0.00
14	0.00	4.59	897.85	0.00
15	0.00	5.47	209.17	0.00
16	0.00	4.75	190.19	0.00
17	0.00	4.79	854.90	0.00
18	0.00	0.00	167.27	0.00
Media	0.00	2.03	364.36	0.00
Desviación estándar	0.00	2.51	254.66	0.00
Error estándar	0.00	0.73	73.51	0.00

Por último, la tabla 27 presenta los resultados del grupo F (pigmentos de flor de jamaica). Como se indica, hubo ausencia de TNF α y de IFN γ , presencia de IL-1 α en 6 de 8 muestras en concentraciones de 4-7pg/mL, y presencia de IL-6 en todas las muestras, predominando las altas concentraciones. En este grupo, al momento de tomar la muestra las ratas 2, 5, 6 y 8 ya estaban perdiendo el efecto y se volvió a manifestar un ligero aumento de temperatura, por lo que se encontró elevada la IL-6.

Tabla 27. Expresión de las citocinas en el Grupo F Pigmentos

Rata	TNF α (pg/mL)	IL-1 α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IFN γ (pg/mL)
1	0.00	0.00	196.64	0.00
2	0.00	6.63	240.88	0.00
3	0.00	6.53	634.57	0.00
4	0.00	0.00	236.67	0.00
5	0.00	4.85	838.30	0.00
6	0.00	5.18	822.02	0.00
7	0.00	5.04	905.80	0.00
8	0.00	5.30	859.10	0.00
Media	0.00	4.19	591.75	0.00
Desviación estándar	0.00	2.67	314.20	0.00
Error estándar	0.00	0.94	111.09	0.00

En ninguno de los grupos se encontró presencia de TNF α ni de IFN γ . El análisis estadístico para comparar los niveles de IL-1 α e IL-6 en los diferentes grupos se realizó por medio de pruebas paramétricas debido a que los resultados presentan distribuciones normales. Se realizaron pruebas ANOVA *post hoc* Bonferroni.

Se observaron diferencias significativas de los niveles de IL-1 α entre el control negativo y la fracción proteica, y entre el extracto crudo y la fracción proteica debido a que la fracción proteica presentó los niveles más bajos de esta interleucina (2.03pg/mL), mientras que el control negativo y el extracto crudo presentaron los niveles más elevados, 5.72 y 6.25pg/mL respectivamente (tabla 28).

Tabla 28. ANOVA *post hoc* Bonferroni para comparar los niveles de IL-1 α

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p < 0.05)
Entre grupos	117.2	4	29.31	6.047	0.0007	Sí
Dentro de los grupos	189	39	4.847			
Total	306.2	43				

Comparación (grupos)	t	Probabilidad	Significancia (p < 0.05)
A vs B	1.933	P > 0.05	No
A vs C	0.4653	P > 0.05	No
A vs D	3.356	P < 0.05	Sí
A vs E	1.288	P > 0.05	No
B vs C	2.707	P > 0.05	No
B vs D	1.389	P > 0.05	No
B vs E	0.6968	P > 0.05	No
C vs D	4.48	P < 0.001	Sí
C vs E	1.973	P > 0.05	No
D vs E	2.153	P > 0.05	No

En el caso de la IL-6 se encontraron diferencias significativas entre el control negativo y el grupo de pigmentos, puesto que éste último manifestó la mayor concentración de esta interleucina. Los tres grupos de jamaica presentaron altas concentraciones de IL-6, por lo que se encontró una diferencia significativa de estos tres grupos contra el control positivo de paracetamol, en el cual la presencia de IL-6 fue nula. También se encontró diferencia significativa entre el extracto crudo y los pigmentos (tabla 29).

Tabla 29. ANOVA *post hoc* Bonferroni para comparar los niveles de IL-6

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
Entre grupos	1522000	4	380400	9.225	P<0.0001	Sí
Dentro de los grupos	1608000	39	41240			
Total	3130000	43				

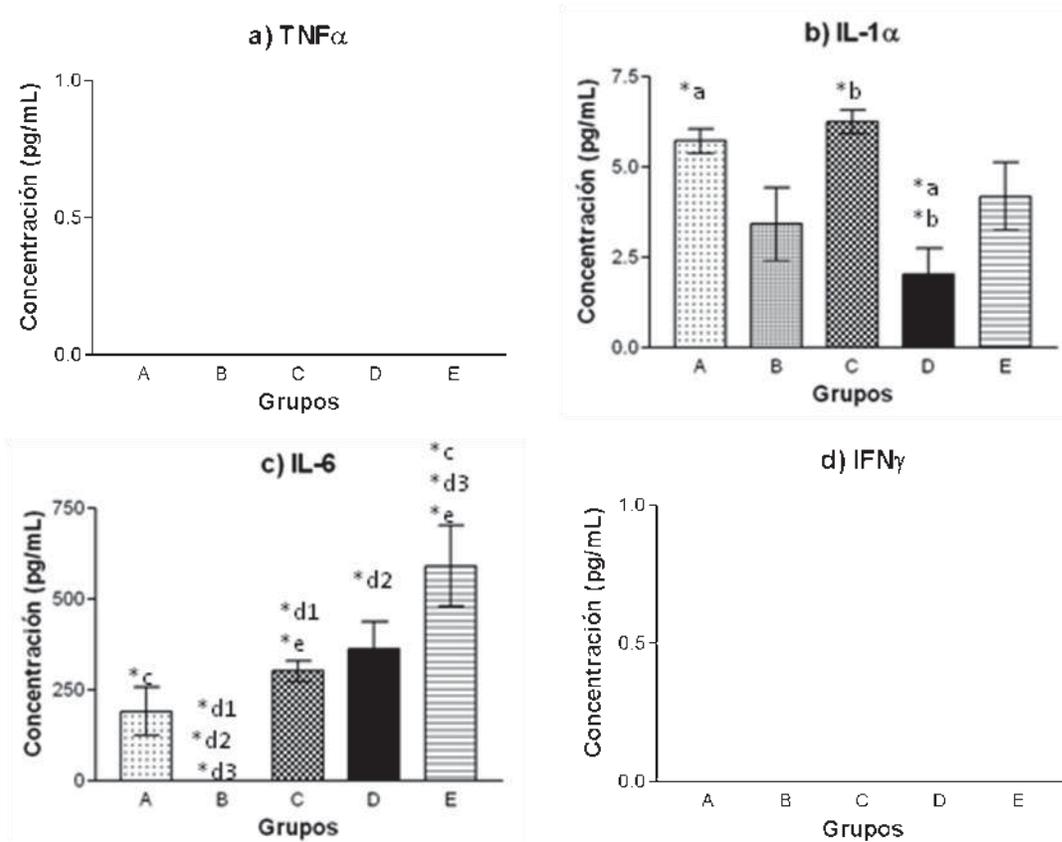
Comparación (grupos)	t	Probabilidad	Significancia (p< 0.05)
A vs B	1.742	P > 0.05	No
A vs C	1.06	P > 0.05	No
A vs D	1.707	P > 0.05	No
A vs E	3.653	P < 0.01	Sí
B vs C	3.137	P < 0.05	Sí
B vs D	3.931	P < 0.01	Sí
B vs E	5.828	P < 0.001	Sí
C vs D	0.7149	P > 0.05	No
C vs E	3.006	P < 0.05	Sí
D vs E	2.453	P > 0.05	No

Los niveles de cada citocina en los cinco grupos se presentan en la gráfica 16. Al comparar el efecto antipirético de cada grupo con los niveles de citocinas se observó que a pesar de que el control negativo continuaba febril, este grupo no fue el que presentó la mayor concentración de citocinas. El control positivo que ya no manifestaba fiebre, fue el que presentó menores niveles de citocinas, puesto que solo se detectó en este grupo la IL-1 α .

El grupo del extracto crudo de flor de jamaica fue el que presentó una mayor concentración de IL-1 α , muy semejante a la del control negativo, esto pudo deberse a que algunas de las ratas de este grupo como la 2, 4, 5 y 6 ya se comenzaba a perder el efecto antipirético y a aumentar nuevamente la temperatura. La concentración de IL-6 en este grupo también fue mayor que en los grupos control.

En el grupo de la fracción proteica de flor de jamaica la concentración de IL-1 α fue muy pequeña, incluso menor que en el grupo control positivo, pero la de IL-6 fue mayor que en los controles, e incluso mayor que en el extracto crudo.

La concentración de IL-1 α en el grupo de pigmentos de flor de jamaica fue muy semejante a la del control positivo. Lo que concuerda con que el efecto antipirético de estos dos grupos haya sido similar. Sin embargo el grupo de los pigmentos presentó un nivel de IL-6 muy elevado, mientras en el control positivo esta citocina estuvo ausente. Esto pudo deberse a que el efecto de los pigmentos comenzó a perderse a los 240 minutos, mientras que el del paracetamol permaneció.



Gráfica 16. Concentración de citocinas proinflamatorias en los grupos tratados al finalizar el monitoreo de temperatura. Se representa la Media \pm E.E. de una determinación por duplicado. Grupos: A. Control negativo: Solución salina (n=6); B. Control positivo: Paracetamol (n=8); C. Extracto crudo de flor de jamaica (n=10); D. Fracción proteica de flor de jamaica (n=12); E. Pigmentos de flor de jamaica (n=8). En ninguno de los grupos se encontró presencia de TNF α ni de IFN γ . Se observaron diferencias significativas de los niveles de IL-1 α entre el grupo A y el D (*a), y el C y el D (*b). En la IL-6 se encontraron diferencias significativas entre los grupos: A y E (*c), B y C (*d1), B y D (*d2), B y E (*d3), y C y E (*e). (ANOVA *post hoc* Bonferroni, $p < 0.05$).

VIII DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se estudió la actividad antipirética de diferentes extractos de la flor de jamaica que consisten en extracto crudo (acuoso), fracción proteica y pigmentos en los que se evaluó el efecto de cada uno teniendo un control positivo y uno negativo. Se comprobó la actividad antipirética del extracto crudo y de los pigmentos y por primera vez a nivel mundial se reporta la participación de proteínas de jamaica (lectinas) en la regulación de la piroxia.

Esta investigación derivó de una publicación previa desarrollada por Reanmongkol e Itharat en el 2007, quienes utilizaron tanto extractos acuosos como etanólicos. Los autores sugieren que algún componente de la jamaica puede actuar inhibiendo la fiebre mediante un mecanismo diferente al del ácido acetilsalicílico. Por esta razón se procedió a utilizar un extracto acuoso, llamado extracto crudo, un extracto orgánico rico en pigmentos y la fracción proteica descritos a continuación.

El extracto crudo se obtuvo por cocción de las flores, debido a que en la medicina tradicional es el modo de empleo más frecuente. Este extracto contiene tanto pigmentos como proteínas. Por reportes previos del laboratorio se sabe que dentro de las proteínas de la jamaica se encuentran lectinas, éstas son proteínas termoestables, por lo que a pesar de que se empleó calor para preparar el extracto, no se afecta ni su concentración ni su actividad (Martínez y Fenton, 2008). Por otro lado, se encuentra establecido que las lectinas son proteínas que reconocen de manera específica y reversible a los carbohidratos, y que tienen la capacidad de modular la respuesta del sistema inmune y de regular la producción de citocinas involucradas en los procesos febriles (Almkvist *et al.*, 2004; Cao *et al.*, 2009).

Los pigmentos de flor de jamaica son los componentes que le dan su característico color a las flores. En ensayos de caracterización cualitativa

realizados a extractos orgánicos de flor de jamaica se ha encontrado la presencia principalmente de las antocianinas hibiscina y delphinidina, los flavonoides quercetina, miricetina, hibiscetina, hibiscitrina y otros ácidos orgánicos como ácido hibíscico y ácido protocatéquico (Vanaclocha, Cañigueral y Vanaclocha, 2003). Existen numerosos reportes en los que se habla de que estos componentes presentan una potente actividad antioxidante y que poseen la capacidad de inhibir la expresión de citocinas proinflamatorias (Márquez *et al.*, 2007; Mohamed y Subramanian, 2007; Amin y Hamza, 2006; Ali *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2003; Ballester *et al.*, 2006)

Para la inducción de fiebre se empleó el método de inyección subcutánea de levadura de cerveza (*Saccharomyces cerevisiae*) utilizado por García *et al.* (2007). En este modelo la levadura se utiliza como fuente de lipopolisacáridos, ya que su pared celular es rica en β -glucanos y mananos, componentes con capacidad inmunogénica que actúan estimulando a los monocitos para la biosíntesis y liberación de citocinas pirogénicas como IL-1, IL-6 y TNF α , que una vez liberadas a la circulación general pasan al sistema nervioso central y estimulan la síntesis y liberación de prostaglandina (PGE₂) por las células endoteliales del hipotálamo. Esta molécula se une a los receptores EP₃ de las células del centro termorregulador hipotalámico desencadenando así los mecanismos neuronales que elevan el punto prefijado hipotalámico, que a su vez desencadena las modificaciones fisiológicas que conllevan la fiebre a través de un aumento en la producción de calor y disminución de su pérdida (Pontón, 2008; Ataoğlu *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2004, Chueh *et al.*, 2004). Esto concuerda con lo reportado recientemente donde se sabe que la primera fase de la fiebre inducida por LPS se inicia por PGE₂ sintetizado en tejidos periféricos (pulmón e hígado). La activación de la síntesis de PGE₂ en el inicio de la primera fase de la fiebre de LPS involucra la fosforilación de CPLA₂, la estimulación transcripcional de COX₂ y posiblemente otros mecanismos. La mayoría de las células productoras de PGE₂ son macrófagos. Estos descubrimientos se contraponen con la vía clásica que la fiebre se inicia exclusivamente por mediadores producidos en el nivel de la barrera

hemato-encefálica, mientras que no contradicen el papel central en las fases siguientes de la fiebre (Steiner *et al.*, 2006).

Para estandarizar el método de inducción de fiebre se llevaron a cabo tres etapas. La primera etapa se realizó tal como lo indica el método de García *et al.*, (2007). Sin embargo, el incremento de temperatura se observó solo en la mitad de las ratas, esto se puede explicar porque el incremento de temperatura es limitado y algunas veces prevenido por la acción de criógenos endógenos como los neuropéptidos arginina vasopresina, adenocorticotropina y hormona estimulante de los melanocitos (Zeisberger y Roth, 1996).

En la segunda etapa se duplicó la dosis de levadura. Al duplicar la dosis, el incremento de temperatura fue mayor, sin embargo no todas las ratas lo presentaron, por lo que en la tercera etapa se redujo el tiempo al cual se lleva a cabo la medición de la temperatura febril, de 18 a 16 horas posteriores a la inoculación (Kawai *et al.*, 1971). En la tercera etapa se logró un incremento de temperatura homogéneo, puesto que todas las ratas lo presentaron.

El grupo Cero no recibió ningún tratamiento, solamente se le realizó el monitoreo de temperatura para evaluar la influencia del ciclo circadiano de la temperatura de las ratas y la influencia del estrés producido por su manipulación (Pae *et al.*, 1985). La temperatura promedio no presentó variaciones significativas durante la duración de todo el experimento, manteniéndose entre 36.48 y 36.97°C. Con ello podemos afirmar que ninguno de los dos factores antes mencionados es representativo, y que los cambios significativos observados en el transcurso del experimento se deben tanto a la inoculación de levadura, como a la respuesta a los tratamientos administrados.

A los otros cinco grupos se les administró levadura de cerveza, con lo que se logró un incremento significativo de la temperatura, 1.18°C en el grupo A, 1.07°C en el grupo B, 1.46°C en el grupo C, 1.03°C en el grupo D y 0.89°C en el grupo E. La

media del incremento reportado al utilizar este modelo es de 1°C, con el mismo criterio de considerar solamente a los animales con aumento a partir de 0.5°C. La media del incremento de todos los grupos en nuestro ensayo fue de 1.13°C, muy próxima a la reportada (García *et al.*, 2007; Boakye-Gyasi *et al.*, 2008).

Los tratamientos para reducir la fiebre se administraron vía oral ya que es la vía tradicional que las personas utilizan para obtener el beneficio de la jamaica, así como también es el modelo utilizado por Reanmongkol e Itharat (2007) en el estudio de esta planta.

El grupo A se utilizó como control antipirético negativo, para lo cual se administró solución salina fisiológica a las ratas con fiebre. Este grupo se incluyó con la finalidad de demostrar que la fiebre inducida permanece si no se administra un tratamiento antipirético, y para ser utilizado como punto de comparación para valorar el efecto producido por el resto de los grupos. Debido a que la solución salina no tiene la propiedad de reducir la fiebre, se esperaba que las ratas se mantuvieran con la temperatura febril. Sin embargo a los 30, 60 y 90 minutos se observó un descenso de temperatura que alcanzó 0.74°C. Este descenso no se presentó en todas las ratas y pudo ser causado por la respuesta inmunológica de algunas de las ratas del grupo para combatir la fiebre. A partir de los 120 minutos la temperatura volvió a incrementar y se mantuvo alrededor de los 38°C. La reducción de temperatura presentada al inicio no fue significativa, por lo que este grupo se mantuvo febril durante todo el experimento.

Debido a que la aceptabilidad de las conclusiones procedentes de experimentos con fiebre inducida depende de que ésta pueda ser abolida por alguna droga antipirética, incluimos un grupo al que se le administró paracetamol (Bennett *et al.*, 1960). El paracetamol es un fármaco que actúa a nivel del sistema nervioso central inhibiendo el sitio activo peroxidasa de una de las isoformas de la enzima ciclooxigenasa, con lo que bloquea la conversión de ácido araquidónico a PGE₂ (Li *et al.*, 2008). Este fármaco es uno de los antipiréticos más utilizados a nivel

mundial. En dosis terapéuticas suele ser bien tolerado, pero puede llegar a provocar efectos adversos severos como la toxicidad hepática por intoxicación aguda, el coma hipoglucémico y la nefropatía asociada al consumo crónico (Sisamón, 2003).

El grupo B fue al que designamos como control antipirético positivo. La disminución de temperatura producida por la administración de paracetamol en este grupo fue estadísticamente significativa. Comenzó desde los 30 minutos, y aumentó gradualmente hasta los 120 minutos, a partir de los cuales se mantuvo cerca de los 36°C. Esto concuerda con su farmacocinética, ya que después de la administración oral, el paracetamol se absorbe rápidamente por el tracto digestivo y las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan a los 30-120 minutos, la duración de su efecto es de 3 a 4 horas, la eliminación es de 1 a 4 horas en los pacientes con la función hepática normal y su eliminación es vía renal (<http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/p006.htm>, <http://www.medicamentos.com.mx/DocHTML/16092.htm>).

La máxima disminución de temperatura producida por el paracetamol fue de 1.88 °C con respecto a la febril, lo que significa que el paracetamol provocó un descenso de temperatura que rebasó a la basal, causando hipotermia a los animales. El promedio de la temperatura basal fue de 36.62°C mientras que con el paracetamol se redujo hasta 35.81°C. La dosis que utilizamos de paracetamol fue la misma utilizada por González *et al.* (2007), quien observó un descenso de temperatura cercano a los 3°C, que también significó un estado de hipotermia en las ratas. El grado de reducción de la temperatura producido por el paracetamol es dosis dependiente, así que al utilizar una dosis elevada como en nuestro caso, el descenso es grande. Además, existen diversos reportes en los que se discute la propiedad del paracetamol para producir hipotermia (Li *et al.*, 2008).

El grupo C recibió como tratamiento el extracto crudo de flor de jamaica, obtenido por decocción de 100g de flores en un litro de agua. En el están presentes tanto

lectinas como pigmentos. El efecto antipirético se presentó desde los 30 minutos en algunos animales y en otros hasta los 60 minutos. La reducción de temperatura fue significativa a partir de los 60 minutos y máxima a los 120 minutos, alcanzando 1.16 °C. A partir de ese momento se mantuvo alrededor de 37 °C hasta los 240 minutos. Reanmongkol e Itharat (2007) observaron una disminución de temperatura con el extracto acuoso a partir de 120 minutos, la temperatura disminuyó un poco más a los 180 y se mantuvo casi constante hasta los 300 minutos. Por lo que los resultados de ambos ensayos son similares.

Al grupo D se le administró la fracción purificada de proteínas rica en lectinas. Las proteínas ingeridas vía oral normalmente no atraviesan el epitelio intestinal de manera intacta, sino que son hidrolizadas a péptidos de menor peso molecular y a sus componentes aminoacídicos, con la consecuente pérdida de actividad biológica. Sin embargo se ha demostrado que las lectinas son resistentes a la proteólisis del tracto gastrointestinal y penetran la pared del intestino a través de las células M del FAE (follicle-associated epithelium). Las células M son enterocitos del tejido linfoide asociado al intestino, especializados en la captación de antígenos luminales, que poseen la capacidad de transportar macromoléculas como péptidos (Kunzelmann *et al.*, 2004; Lyu y Park, 2008; Ramiro *et al.*, 2008). El mecanismo por medio del cual las células M transportan a las lectinas aún no se ha esclarecido; existe un reporte donde se encontró involucrada la endocitosis adsorptiva en el transporte de lectinas de tomate en sacos intestinales evertidos de rata. En cuanto a la biodisponibilidad, en ratones ha sido detectada en sangre una fracción del 5 al 10 % de la dosis de lectina administrada (Lehr y Lee, 1993).

Por lo anterior, podemos asegurar que el efecto observado en este grupo se debe a la acción de las lectinas, las cuales produjeron un descenso de la temperatura estadísticamente significativo que se comenzó a apreciar a los 120 minutos. Wang *et al.* (1998), demostraron que la lectina de cacahuete puede ser detectada en la sangre aproximadamente una hora después de su ingestión, por lo que se sugiere que el efecto tarda en presentarse debido a que su mecanismo de absorción es

lento. A los 120 minutos el extracto crudo presentó su efecto máximo, esto podría indicar que el efecto de las lectinas se suma al del resto de los componentes del extracto crudo, aumentándolo. El efecto producido por la fracción proteica se mantuvo hasta los 240 minutos, al igual que en el extracto crudo. El máximo efecto de la fracción proteica fue a los 240 minutos y representó una disminución de 0.98°C. No existe ningún reporte en la literatura en que se evalúe la intervención de este tipo de proteínas en la actividad antipirética, por lo que este hallazgo constituye el primer estudio a nivel internacional.

Los pigmentos de flor de jamaica produjeron un descenso gradual de la temperatura que se comenzó a observar desde los 60 minutos, pero fue significativo a partir de los 90 minutos y hasta los 180 minutos, después de los cuales la temperatura volvió a aumentar en la mitad de los animales. El máximo descenso se produjo a los 180 minutos siendo de 1.25°C. Los pigmentos (flavonoides, antocianinas y otros compuestos fenólicos) son absorbidos en el intestino, su biodisponibilidad y cinética varían ampliamente dependiendo de la forma en que se encuentren. Las concentraciones máximas en plasma se alcanzan entre los 90 y 330 minutos, por lo que su rápida absorción permite que el efecto se manifieste desde los primeros 60 minutos (Manach *et al.*, 2005).

Al hacer la comparación entre los grupos pudimos apreciar una diferencia significativa entre el control negativo con el resto de los tratamientos, lo que confirma que todos producen el efecto antipirético. El que lo manifestó primero fue el paracetamol, seguido de los pigmentos, el extracto crudo, y finalmente la fracción proteica. Al comparar el grupo control positivo con los tres grupos de jamaica observamos un efecto comparable entre el paracetamol y los pigmentos. Mientras que en el caso del extracto crudo y la fracción proteica no fue así ya que el efecto producido por el paracetamol es estadísticamente superior al producido por ambos. La comparación entre el grupo de extracto crudo con el de la fracción proteica refleja un comportamiento semejante sobre todo a partir de los 120 minutos. La comparación entre el grupo de extracto crudo con el de los pigmentos

es semejante durante casi todo el tiempo evaluado. Los pigmentos resultaron con un mayor efecto que la fracción proteica.

Debido a que el extracto crudo de flor de jamaica contiene tanto pigmentos como proteínas, se propone que ambos componentes contribuyen al efecto antipirético del extracto crudo, siendo los pigmentos los que actúan de manera rápida para que el efecto se presente entre los 30 y 60 minutos, mientras que las proteínas son responsables de mantener el efecto por tiempo prolongado.

Un posible mecanismo por medio del cual los extractos de jamaica podrían llevar a cabo el efecto antipirético debido a su contenido de flavonoides y lectinas, es regulando la producción de citocinas (Karlsen *et al.*, 2007; Cao *et al.*, 2007; Reanmongkol e Itharat, 2007). Para estudiar dicho mecanismo, se realizó la cuantificación de las principales citocinas que participan en la producción de fiebre, la IL-1, la IL-6 y el TNF α ; y de una citocina que juega un rol de menor importancia, el INF γ (León, 2002; Chirinos, 1996).

En ninguno de los grupos se detectó la presencia de TNF α ni de INF γ debido a que las muestras de suero fueron tomadas hasta que finalizó el ensayo, es decir, cuatro horas después de la detección de fiebre y de la administración del tratamiento, y veinte horas después de la inoculación de levadura vía subcutánea. Para ese momento las ratas que recibieron los tratamientos antipiréticos ya no presentaban fiebre. En el grupo control negativo aunque las ratas continuaban en estado febril, tampoco se detectaron estas citocinas debido a que los niveles séricos de ambas se incrementan durante la etapa inicial de la fiebre. Pasin *et al.* (2009) detectaron un incremento de TNF α a las cuatro horas de haber inoculado la levadura vía intraperitoneal, mientras que Rudolph *et al.* (1998), utilizando el modelo de fiebre inducida por ligación y punción cecal observaron que los niveles de TNF α se elevaron después de hora y media de la cirugía. En pacientes con neutropenia febril, los niveles de TNF α e INF γ se vieron incrementados al inicio de la fiebre, con un pico máximo a las dos horas (Engervall, 1995).

La IL-1 aparece a continuación del TNF α en la cascada de los mediadores de la fiebre, ya que el TNF α induce su síntesis (Chirinos, 1996). Pasin *et al.* (2009) detectaron una concentración de aproximadamente 600pg/mL de la isoforma IL-1 β a las cuatro horas de haber inoculado la levadura vía intraperitoneal. Debido al tiempo en que realizamos la toma de muestra, encontramos muy bajos niveles de IL-1 α . El grupo control negativo y el grupo de extracto crudo tuvieron los niveles más elevados de todos los grupos, 5.72 y 6.25pg/mL respectivamente. La presencia de IL-1 α en el grupo control negativo coincide con el estado febril en que se encontraban las ratas. La presencia de IL-1 α en el grupo del extracto crudo concuerda con el hecho de que algunas de las ratas a pesar de haber presentado reducción de temperatura no alcanzaron el estado basal. En los grupos de paracetamol y pigmentos la concentración de IL-1 α fue muy semejante (3.42 y 4.19pg/mL), al igual que su efecto sobre la temperatura, mientras que la fracción proteica presentó la concentración más baja (2.03pg/mL), incluso menor que el control de paracetamol.

La IL-6 aparece en el plasma después de la IL-1, ya que la IL-1 induce la síntesis de IL-6. El paracetamol inhibe la biosíntesis de prostaglandinas y citocinas, disminuye las concentraciones circulantes de IL-1 y IL-6 (Martínez y Cairo, 2001). En todos los grupos, a excepción del control de paracetamol, encontramos niveles elevados de IL-6. Los niveles elevados de IL-6 se asocian a una disminución de los niveles de IL-1 y TNF α ya que la primera induce la síntesis de las segundas (Chirinos, 1996). Dicho efecto se refleja en nuestros resultados.

En el grupo de paracetamol no se detectó la presencia de IL-6. El grupo control negativo que se mantuvo febril presentó una concentración de 191.08pg/mL, mientras que los tres grupos de jamaica a pesar de manifestar el efecto antipirético, presentaron concentraciones más elevadas que el control negativo, 302.20pg/mL en el grupo de extracto crudo, 364.36pg/mL en el de fracción proteica y 591.75pg/mL en los pigmentos. Siendo éste último grupo el de mayor concentración. Diversas investigaciones relacionan los niveles elevados de IL-6

con un incremento de temperatura. En el estudio realizado en pacientes con neutropenia febril, los niveles de IL-6 se vieron incrementados desde el inicio de la fiebre, con un pico máximo a las cuatro horas (Engervall, 1995). Por otro lado, hay reportes en que se observan discrepancias entre los niveles de IL-6 y la temperatura. Rudolph *et al.* (1998) utilizando el modelo de fiebre inducida por ligación y punción cecal observaron que los niveles de IL-6 se elevaron después de hora y media de la cirugía y se mantuvieron así hasta las 24 horas posteriores. En su ensayo, a pesar de la presencia de la IL-6 durante las primeras seis horas, las temperaturas de las ratas se mantuvieron bajas, y para las 24 horas ya se había presentado la fiebre. Esto sugiere que la elevación de IL-6 precede al episodio febril, por lo que la elevación de esta interleucina en los grupos de jamaica podría indicar que la fiebre tiende a reaparecer después del periodo en el que se concluyó el monitoreo de temperatura. Ello lo sustenta el hecho de que en los grupos de pigmentos y extracto crudo algunos animales presentaron un incremento de temperatura en la última medición. En otro ensayo, Smith y Kluger (1992) observaron que el pretratamiento de ratas con el receptor antagonista de IL-1 antes de la inoculación de lipopolisacárido produce una respuesta febril atenuada, sin embargo no modifica los niveles plasmáticos de IL-6. Con lo que se soporta el hecho de que se observe el efecto antipirético, a pesar de la presencia de IL-6.

Se ha reportado que los flavonoides como la quercetina, inhiben la actividad de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa, enzimas involucradas en la liberación de ácido araquidónico, y también inhiben la síntesis de eicosanoides como las prostaglandinas, moléculas responsables del ajuste del centro termorregulador hipotalámico, bloqueando así la respuesta de los pirógenos (Nijveldt *et al.*, 2001). De esta manera se puede explicar que aún con la presencia de una alta concentración de IL-6 en el grupo de los pigmentos, las ratas no presentaron fiebre. Adicionalmente, la IL-6 induce la liberación del criógeno endógeno ACTH (Matta, 1992).

En cuanto al grupo de la fracción proteica, los niveles de IL-6 no se vieron tan elevados como los del grupo de los pigmentos, y la IL-1 α se presentó en concentraciones más pequeñas que incluso el grupo control positivo, lo que sugiere que el efecto antipirético de las proteínas se relaciona con niveles bajos de IL-1 α .

Los resultados obtenidos de este trabajo concuerdan con lo reportado en la literatura, aunque no se evaluaron los niveles circulantes de citocinas en los diferentes tiempos en los que se evaluó la temperatura, los valores concuerdan con lo siguiente: Se sabe que TNF α es la primer citocina que aparece en la circulación sanguínea, seguida de trazas de IL-1 y con altas concentraciones de IL-6. De estas tres citocinas se considera que el más importante medidor de la fiebre es la IL-6 y solo ésta se puede medir en cantidades significativas durante el transcurso de la fiebre. Los niveles de IL-6 muestran correlación con los cambios febriles de la temperatura corporal, mismos que se observaron en este trabajo sobre todo en el control negativo y positivo.

Se ha reportado que la primera fase de la fiebre se presenta de 90 a 360 minutos. Los niveles circulantes de TNF α y IL-6 se elevan justo antes de que la temperatura corporal comience a aumentar. Posteriormente los niveles de TNF α comienzan a descender en un 90% a los 90 minutos, mientras que los niveles de IL-6 permanecen elevados. Lo que se ha observado a los 480 minutos, e incluso a los 3 días posteriores a la inducción repetida de fiebre, se sugiere que se debe a respuestas del sistema nervioso central cuyo mecanismo debe estudiarse (Roth, 1997).

IX CONCLUSIONES

Se estandarizó un modelo de inducción de pirexia en ratas.

Los controles negativo y positivo permitieron establecer los valores y parámetros de comparación con los grupos experimentales.

El grupo cero, sin tratamiento, mostró que el estrés producido por la manipulación no modifica la temperatura basal.

El extracto crudo de flor de jamaica (100g/L) presenta actividad antipirética. Exhibe una reducción de temperatura significativa a partir de los 60 minutos posteriores a su administración vía oral, que alcanza 1.16°C a los 120 minutos y permanece hasta los 240 minutos.

La fracción proteica de flor de jamaica enriquecida en lectinas (100µg/mL) presenta actividad antipirética. Produjo un descenso de la temperatura estadísticamente significativo que comenzó a los 120 minutos posteriores a su administración vía oral. Dicho efecto se mantuvo hasta los 240 minutos y representó una disminución de 0.98°C.

Los pigmentos de flor de jamaica (20%) presentan actividad antipirética. Produjeron un descenso gradual de la temperatura, significativo a partir de los 90 minutos y hasta los 180 minutos, siendo de 1.25°C.

Los componentes responsables de la actividad antipirética del extracto crudo son los flavonoides y las lectinas. El efecto de los pigmentos de flor de jamaica es comparable al del paracetamol.

El mecanismo de acción tanto de los pigmentos, como de las lectinas involucra un incremento en los niveles de IL-6.

Hasta donde sabemos, este es el primer reporte en el que se considera la participación de las proteínas en la actividad antipirética.

X PERSPECTIVAS

- Realizar las mediciones de temperatura con sistemas biotelemétricos usando transmisores implantados intraabdominalmente, con el objetivo de disminuir los errores de medición.
- Canular a las ratas para extraerles muestras de sangre para cuantificar las concentraciones de citocinas a diferentes tiempos y poder correlacionar los niveles de citocinas con el efecto observado.
- Además de cuantificar citocinas proinflamatorias, cuantificar citocinas antiinflamatorias como la IL-10, criógenos endógenos como AVP y ACTH, y PGE₂.
- Establecer un método para determinar las concentraciones de los componentes en los extractos.
- Realizar curvas dosis-respuesta de cada uno de los extractos para determinar su dosis efectiva media.
- Monitorear por más tiempo la temperatura para determinar la duración del efecto de las proteínas.

XI REFERENCIAS

- Abbas, AK., Lichtman, AH., Pober, JS. Inmunología celular y molecular 4^a Edición. Mc Graw Hill-Interamericana. España 2002: 243-279
- Alberti, MP. Los aportes de las mujeres rurales al conocimiento de plantas medicinales en México. Análisis de género. Agricultura, sociedad y desarrollo 2006; 3(2):139-153
- Ali, BH., Mousa, HM., El-Mougy, S. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L on paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. Phytother Res 2003; 17(1): 56-59
- Almeida, MC., Steiner, AA., Coimbra, NC., Branco, LGS. Thermoeffector neuronal pathways in fever: a study in rats showing a new role of the locus coeruleus. J Physiol 2004; 558(1):283-294
- Almkvist, J., Karlsoon, A. Galectins as inflammatory mediators. Glycoconjugate Journal 2004; 19: 575–581
- Álpizar, CLB., Medina, HEE., Fisiopatología de la fiebre. Rev Cubana Med Milit 1999, 28(1):49-54
- Amin, A., Hamza, AA. Effects of Roselle and Ginger on cisplatin-induced reproductive toxicity in rats. Asian J Androl 2006; 8(5): 607-612
- Ataoğlu, H., Doğan, MD., Mustafa, F., Akarsu, ES. *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* cell wall mannans produce fever in rats: role of nitric oxide and cytokines. Life Sci. 2000; 67(18): 2247-2256
- Ayoub, SS., Botting, RM., Goorha, S., Colville-Nash, PR., Willoughby, DA., Ballou, LR. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. PNAS 2004, 101(30): 11165–11169
- Ballester, I., Camuesco, D., Gálvez, J., Sánchez De Medina, F., Zarzuelo, A. Flavonoides and Inflammatory bowel disease. Ars Pharm 2006; 47 (1): 5-21
- Barba, CC., Martínez, LD., Pérez, TGP., López, SE., A Chavarría, BL., Ortiz, MI. Comparación del efecto antipirético del ibuprofeno, metamizol,

nimesulide y paracetamol en niños. *Revista Mexicana de Pediatría* 2008; 75(1): 9-13

- Bennett, IL., Bennett, IL. Jr., Nicastrì, A. Fever as a mechanism of resistance. *Bacteriol Rev* 1960; 24 (1): 16–34
- Boakye-Gyasi, E., Woode, E., Ainooson, GK., Obiri, DD., Ansah, C., Duwejua, M., Donkoh, A. Anti-Inflammatory and antipyretic effects of an ethanolic extract of *Palisota hirsuta* K. Schum roots. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2008; 2(9):191-199
- Bradford, MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein Dye Binding. *Analytical Biochem* 1976; 72: 248-254
- Cao, X., Xu, C., Zeng, B., Wang, C. Immunomodulation Activity of Lectin Isolated from *Musca Domestica* (Housefly) Pupae. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference*: 1 - 6
- Castillo, VA., Abdullaev, F., Lectinas vegetales y sus efectos en el cáncer. *Rev Invest Clin* 2005; 57(1): 55-64
- Cheng-Chia, T., Mao-Tsun, L., Jhi-Joung, W., Jyh-Fei, L., Wu-Tein, H. The antipyretic effects of baicalin in lipopolysaccharide-evoked fever in rabbits. *Neuropharmacology* 2006; 51(4): 709-717
- Chirinos, MJ. Neuroendocrinoinmunología de la Respuesta de Fase Aguda. *Revista médica del CIEM* 1996; 1(1)
- Chueh, FS., Chang, CP., Chio, CC, Lin, MT. Puerarin acts through brain serotonergic mechanism to induce thermal effects. *Journal of Pharmacological Sciences* 2004; 96(4): 420- 427.
- Cunningham, JG. *Fisiología veterinaria* 3^a Ed. Elsevier. España 2003: 541
- Didier, HB. La colección de plantas medicinales más importante de América Latina. *Ciencias* 1995; 39: 46-47
- Eisen, DP., Minchinton, RM. Impact of mannose-binding lectin on susceptibility to infectious diseases. *Clin Infect Dis.* 2003; 37(11): 1496-505

- El-Radhi, AS., Carrol, JE. Fiebre en pediatría. Mc Graw Hill Interamericana. México 1996: 1-9, 13, 14
- Engervall, P., Andersson, B., Bjorkholm, M. Clinical significance of serum cytokine patterns during start of fever in patients with neutropenia. Br. J. Haematol. 1995; 91:838-845
- Eskandari, F., Webster, JI., Sternberg, EM., Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. Arthritis Res Ther 2003; 5:251-265
- Estrada, LE. Plantas medicinales de México: Introducción a su estudio 4^a Ed. Universidad Autónoma de Chapingo 1996: 580
- Feria, RIA., López, LM., Serrano, H., Orozco, S., Lozoya, J. Aplicación de la biología molecular en el control de calidad de los fitomedicamentos. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 2007; 38(001): 49-57
- Fewell, JE. y Wong, VH. Interleukin-1[beta]-induced fever does not alter the ability of 5- to 6-day-old rat pups to autoresuscitate from hypoxia-induced apnoea. Experimental Physiology 2002; 87: 17-24
- Fundaquim, Red Propymes, Uru.Tec. Fundasol, Cooperación Técnica Alemana. Aportes para el desarrollo del sector de plantas medicinales y aromáticas en el Uruguay 2004: 8
- García, GM., Escalante, C., Díaz, C. Antipyretic effect of the aqueous extract obtained from leaves of *Neurolaena lobata* (Asteraceae) on a pyretic model induced by brewer's yeast. Revista Médica de la Universidad de Costa Rica 2007; 1(1): 20-27
- Guinart, ZN., López, L JL. ¿Qué sabemos de la fiebre? Rev Cubana Med Gen Integr 1997; 13(2)
- Hernández, CP., Pérez, CE., Martínez, ML., Ortiz, B., Martínez, G. Lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. REB 2005; 24(1): 21-27
- Hernández, DP., Martín, GO., Rodríguez, Y., Ganem, BFA. Aplicaciones de las lectinas. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1999; 15(2):91-5

- Herrera AA., Miranda SJ., Avila CP., Herrera AS., Jiménez FJE., Zamilga A., Román RR., Ponce MH., Tortoriello J. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hipertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. *Planta Medica* 2007; 73 (1): 6-12
- <http://www.iqb.es/cbasicas/farma/farma04/p006.htm> Vademecum, Paracetamol. Consultado en Octubre 2009.
- <http://www.medicamentos.com.mx/DocHTML/16092.htm> Paracetamol. Consultado el 10 de Marzo de 2010.
- <http://www.odon.edu.uy/cafispat/fiebre/fiebre.htm> Fiebre. Consultado el 15 de Octubre de 2009
- <http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/plantas-medicinal/tabla2.html> Medicina tradicional en Jesús del monte. Consultado el 15 de Octubre de 2009
- <http://www.umich.mx/museo/hist-natural/botanica/plantas-medicinal/plantas-tradic.html> Medicina tradicional en Jesús del monte. Consultado el 15 de Octubre de 2009
- Humadi S., Istudor V. Quantitative analysis of bio-active compound in *Hibiscus sabdariffa* L. extracts: I Quantitative analysis of flavonoids. *Farmacía* 2008; 56(6): 699-706
- Jawetz, E., Melnick, J., Adelberg, E. *Microbiología Médica*. 18^a Ed. Manual Moderno. México 2005: 120
- Jínez, MT., Cortés, CA., Ávila GE., Casaubon, MT., Salcedo, ER. Efecto de los niveles elevados de semilla de jamaica (*Hibiscus sabdariffa*) en dietas para pollos sobre el comportamiento productivo y funcionamiento hepático. *Vet. Mex.* 1998; 29(1): 35-40
- Karlsen, A., Retterstøl, L., Laake, P., Paur, I., Kjølrsrud-Bøhn, S., Sandvik, L., Blomhoff, R. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. *J Nutr.* 2007; 137(8):1951- 1954

- Kawai, K., Kuzuna, S., Morimoto, S., Ishii, H., Matsumoto, N. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of 6-chloro-5-cyclohexylindan-1-carboxylic acid (TAI-284) J. Pharmacol. 1971; (21): 621-639
- Kunzelmann, K., Sun, J., Schreiber, R., König, J. Effects of dietary lectins on ion transport in epithelia. British Journal of Pharmacology 2004; 142: 1219–1226
- Lehr, C-M., Lee, VHL. Binding and transport of some bioadhesive plant lectins across Caco-2 cell monolayers. Pharm Res 1993; 10(12): 1796–1799
- Leon, RL. Molecular Biology of Thermoregulation Invited Review: Cytokine regulation of fever: studies using gene knockout mice. J Appl Physiol 2002; 92: 2648-2655
- Li, S., Dou, W., Tang, Y., Goorha, S., Ballou, LR., Blatteis, CM. Acetaminophen: antipyretic or hypothermic in mice? In either case, PGHS-1b (COX-3) is irrelevant. Prostaglandins Other Lipid Mediat 2008; 85 (3-4): 89–99
- Lin, WL., Hsieh, YJ., Chou, FP., Wang, CJ., Cheng, MT., Tseng, TH. Hibiscus protocatechuic acid inhibits lipopolysaccharide-induced rat hepatic damage. Arch Toxicol 2003; 77(1): 42-47
- Lorenzo, P., Moreno, P., Leza, JC., Lizasoain, I., Moro, MH., Farmacología básica y clínica 17^a ed. Médica Panamericana. Madrid 2004: 514-515
- Lyu, SY., Park, WB. Transport of Mistletoe Lectin by M Cells in Human Intestinal Follicle-Associated Epithelium (FAE) *In Vitro*. Arch Pharm Res 2008; 31(12): 1613-1621
- Mahadevan, N., Shivali, Kamboj, P. *Hibiscus sabdariffa* Linn.- An overview. 2009 Natural Product Radiance, 8 (1): 77-83
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies^{1,2,3}. American Journal of Clinical Nutrition 2005; 81(1): 230S-242S

- Márquez, VRL., Torres, CR., Rivero, CA., Medina, MM. Actividad diurética del extracto total acuoso de los cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.* administrado en ratas albinas variedad Wistar. *Scientia Et Technica* 2007; Año XIII(33): 377-384
- Martínez, CA., Rivas, AS. Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *Rev Fac Med UNAM* 2005; 48(5) : 210-216
- Martínez Cairo C., Salvador; Salgado Legorreta, César; Martínez Zurita Fernando. Efecto del naproxeno en las concentraciones séricas de IL-1, IL-6 y TNF en pacientes con osteoarthritis. *Alergia Mex.* 2001. 48 (4): 119-122.
- Martínez, JR. y Fenton, NB. Purificación y caracterización de lectinas en flores de jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*). Tesis de Licenciatura. Escuela de Quimicofarmacobiología, UMSNH. Morelia, México, 2008
- Martínez, MSM., de La Paz, NJ., Corral, SA., Martínez, RC. Actividad diurética y antipirética de un extracto fluido de *Rosmarinus officinalis L.* en ratas. *Rev Cubana Plant Med* 2004; 9(1)
- Matta, SG., Weatherbee, J., Sharp, BM. A central mechanism is involved in the secretion of ACTH in response to IL-6 in rats: comparison to and interaction with IL-1 β . *Neuroendocrinology* 1992; 56: 516-525
- Merlín, LJC., Arce, HAA., Leyva, RA., González, GJM., Villaescusa, BR. Lectina de unión a manosa: actividad biológica y significado. *Rev Cubana Hematol Inmunol Med Transf* 2006; 22(3)
- Mohamed, EM., Subramanian, P. *Hibiscus sabdariffa* affects ammonium chloride-induced hyperammonemic rats. *eCAM* 2007; 4(3):321-325
- Mota, MRL., Criddle, DN., Alencar, NMN., Gómez, RC., Meireles, AVP., Santi-Gadelha, T., Gadelha, CAA., Oliveira, CC., Benevides, RG., Cavada, BS., Assreuy, AMS. Modulation of acute inflammation by a chitin-binding lectin from *Araucaria angustifolia* seeds via mast cells *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2006; 374:1–10
- Nava, FR., Zamora, RD. Notas sobre plantas medicinales del estado de Querétaro. *Polibotánica* 2001; 12: 1-40

- Nijveldt, R.J., Nood, V.E., VDE., *et al.* Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* 2001; 74:418-425
- Odigie, I.P., Ettarh R.R., Adigun, S.A. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1 C hypertensive rats *J Ethnopharmacol.* 2003; 86: 181-185
- Onyenekwe, P.C., Ajani, E.O., Ameh, D.A., y Gamaniel, K.S. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. *Cell Biochem Funct* 1999; 17(3): 199-206
- Owulade M.O., Eghianruwa, K.I., Daramola, F.O. Effects of aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* Calyces and *Ocimum gratissimum* leaves on intestinal transit in rats. *African Journal of Biomedical Research* 2004; 7: 31–33
- Padilla, C.J.I., Fiebre: fisiopatología, patrones y tratamiento. *Revista de la Facultad de Medicina, Universidad de Iberoamérica, UNIBE* 2009; 1(1)
- Pae, Y.S., Lai, H., Horita, A. Hyperthermia in the rat from handling stress blocked by naltrexone injected into the preoptic-anterior hypothalamus. *Pharmacol Biochem Behav* 1985; 228(2): 337-339.
- Pasin, J.S., Ferreira, A.P., Saraiva, A.L., Ratzlaff ,V., Andrighetto, R., Tomazetti, J., Avila, D.S., Alves, S.H., Rubin, M.A., Ferreira, J., Santos, A.R., Mello, C.F. Diacerein decreases TNF- α and IL-1 β levels in peritoneal fluid and prevents Baker's yeast-induced fever in young rats. *Inflamm Res.* 2010; 59(3):189-196.
- Pontón, J. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 78-82
- Qi, Y., Chin, K.L., Malekian, F., Berhane, M., Gager, J. Biological Characteristics, Nutritional and Medicinal Value of Roselle, *Hibiscus sabdariffa*. *Urban Forestry Natural Resources and Environment* 2005; (604): 1-2

- Rabinovich, GA., Riera, CM., Landa, CA., Sotomayor, CE. Galectins: a key intersection between glycobiology and immunology. Galectins in the immune system. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 1999; 32: 383-393.
- Rabinovich, GA., Rubinstein, N., Fainboim, L. Unlocking the secrets of galectins: a challenge at the frontier of glyco-immunology. Journal of Leukocyte Biology 2002; 71: 741-752
- Ramiro, PE., Pérez, CFJ., Castellote, C., Franch, A., Castell, M. El intestino: pieza clave del sistema inmunitario. Rev Esp Enferm Dig 2008; 100(1): 29-34
- Reanmongkol, W., Itharat, A. Antipyretic activity of the extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces L. in experimental animals. Songklanakarin J. Sci. Technol. 2007; 29(Suppl. 1) : 29-38
- Reverón, QA. Manejo de la fiebre en el hogar. Archivos venezolanos de puericultura y pediatría 2000; 63(Supl. 1): S6-S12
- Riedel, W. Antipyretic role of nitric oxide during endotoxin-induced fever in rabbits. Int-J-Tissue-React. 1997; 19(3-4): 171-178.
- Roth J, Hopkins SJ, Hoadley ME, Tripp A, Aslan T, Störr B, Luheshi GN, Zeisberger E. Fever and production of cytokines in response to repeated injections of muramyl dipeptide in guinea-pigs. Pflugers Arch. 1997 Sep;434(5): 525-33
- Rudolph, K., Gourine, VA., Korsak, SA., Kluger, JM. Interleukin-6 and Tumor Necrosis Factor- α during Fever Induced by Bacterial Infection. Annals of the New York Academy of Sciences 1998; (856):300 – 303
- Ruiz, AV., Boffill, CMA, González, GOL., Masjuan, PM., Blanco, MF. Efecto inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris* Rev Cubana Invest Biomed 2005; 24(1): 5-13
- Sánchez, JM. Las plantas de la flora mexicana cultivadas en España. III Congreso Hispanoamericano de de Parques y Jardines Públicos. Guadalajara, México 2003

- Sharon, N., Lis H. History of lectins: from hemagglutinin to biological recognition molecules. *Glycobiology* 2004; 14:53R-62R
- Silverman, MN., Pearce, BD., Biron, CA., Miller, AH. Immune modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal (HPA) Axis during viral infection *Viral Immunol.* 2005; 18(1): 41–78.
- Sisamón, IA. Acerca de la hepatotoxicidad del paracetamol. *Revista del Hospital Privado de Comunidad* 2003; 6(2)
- Smith, BK., Kluger, MJ. Human IL-1 receptor antagonist partially suppresses LPS fever but not plasma levels of IL-6 in Fischer rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 1992; 263: R653-R655
- Steiner AA., Ivanov AI., Serrats J., Hosokawa H., Phayre AN., *et al.* Cellular and molecular bases of the initiation of fever. *PLoS Biol* 2006; 4(9): 1517-1524
- Suárez, A., Mozo, L., Gutiérrez, M. Citocinas y quimiocinas. *Inmunología On Line* 2003. Disponible en URL: http://www.uco.es/grupos/inmunologia-molecular/texto_pdf/tema_09.pdf
- Sundgren-Andersson, AK. Östlund, P., Bartfai T. Simultaneous Measurement of Brain and Core Temperature in the Rat during Fever, Hyperthermia, Hypothermia and Sleep. *NeuroImmunoModulation* 1998; 5: 241-247
- Tijani, AY., Uguru, MO., Salawu, OA. Anti-pyretic, anti-inflammatory and anti-diarrhoeal properties of *Faidherbia albida* in rats. *African Journal of Biotechnology* 2008; 7(6): 696-700
- Tomazzetti, J., Silva, DA., Oliviera, FAP., Saibt, MJ. *et al.*, Baker yeast-induced fever in young rats: Characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J. Neurosci. Methods* 2005; (147): 29-35
- Turner MW. The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* 2003; 40(7): 423-9
- Valsecia, ME., Malgor, LA. *Farmacología médica. Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina* 1999

- Vanaclocha, B., Cañigüeral, S., Vanaclocha, FV. *Fitoterapia Vademecum de prescripción* 4ª Ed. Masson. Barcelona 2003: 290
- Villareal, AMA., Ortíz, LR., Rojas, MA., Garza, EMA., Suárez, GJ., *Lectina fijadora de manosa en la respuesta inmunitaria innata. Medicina Universitaria* 2008; 10(39):102-7
- Wang, Q., Yu, LG., Campbell, BJ., Milton, JD., Rhodes, JM. *Identification of peanut lectin in peripheral venous blood after peanut ingestion. Gastroenterology* 1998; 114: A1188-A1188
- Zeisberger, E., Roth, J. *Neurobiological concepts of fever generation and suppression. Neuropsychobiology* 1993; 28(1-2):106-109